

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 305**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2005** **E 05821182 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 1812555**

54 Título: **Métodos para expandir poblaciones de células mieloides y usos de las mismas**

30 Prioridad:

25.10.2004 US 622318 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.06.2015

73 Titular/es:

**CELLERANT THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
1531 INDUSTRIAL ROAD
SAN CARLOS CA 94070, US**

72 Inventor/es:

**FONG, TIMOTHY C.;
DOMEN, ADRIANUS GEERTRUDIS WILHELMUS y
CHRISTENSEN, JULIE LYNNE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 538 305 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para expandir poblaciones de células mieloides y usos de las mismas

5 1. REMISIÓN A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica beneficio a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) a la solicitud nº de serie 60/622.318, titulada "Métodos para expandir poblaciones de células mieloides y usos de los mismos", presentada el 25 de octubre de 2004.

10 2. CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para la reconstitución a corto plazo del sistema hematopoyético, y usos de los mismos para el tratamiento de afecciones asociadas con hematopoyesis alterada o destruida.

15 3. INTRODUCCIÓN

20 El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) es una terapia convencional para diversas malignidades hematológicas, y en algunos casos, es la única opción de tratamiento viable, particularmente cuando la enfermedad es refractaria a quimioterapia. La médula ósea, sangre periférica, o sangre umbilical sirven como fuentes típicas de células madre hematopoyéticas (HSC), pero las células de la sangre periférica presentan características de injerto más rápido y pueden movilizarse por tratamiento del donante por citoquinas G-CSF, GM-CSF, o con fármacos citorreductores. La sangre umbilical está fácilmente disponible, muestra bajas incidencias de enfermedad de injerto 25 contra hospedador pero se caracteriza por un injerto retardado. Antes del trasplante, al destinatario se le dan dosis mieloablativas de quimioterapia y/o radiación para tratar la enfermedad subyacente y hacer al destinatario adecuado para el injerto de las HSC donantes.

30 Generalmente, existen dos tipos de HSCT: autólogo y alogénico. El trasplante autólogo implica la infusión de las células del propio destinatario después de tratamiento mieloablativo. Los trasplantes de células autólogas minimizan el riesgo de enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) y provocan complicaciones reducidas. Como se usa quimioterapia con agentes mieloablativos para eliminar las células malignas en las preparaciones de HSC, el trasplante autólogo es problemático si la enfermedad es insensible a quimioterapia. El trasplante alogénico implica la infusión de células madre donantes, típicamente usando un donante que coincida con el MHC del destinatario. Una ventaja 35 de los trasplantes alogénicos es la reacción de injerto contra hospedador mediada por células que los acompaña que puede desarrollarse contra células malignas. Sin embargo, los trasplantes de donantes coincidentes no relacionados (MUD) también están asociados con una reacción de injerto contra hospedador más fuerte, y por tanto provocan tasas de mortalidad superiores.

40 Existen varias complicaciones añadidas asociadas con la terapia mieloablativa y HSCT, más notablemente neutropenia y trombocitopenia. Ambas afecciones surgen de hematopoyesis alterada y la incapacidad del sistema hematopoyético de reponer adecuadamente las células mieloides diferenciadas de forma terminal asociadas con cada trastorno. La neutropenia y trombocitopenia también pueden desarrollarse por otras causas de hematopoyesis alterada, tal como exposición no pretendida a dosis letales de radiación ionizante, inmunodeficiencias hereditarias, 45 infecciones víricas que afectan a la médula ósea, y trastornos metabólicos (por ejemplo, deficiencias de vitaminas).

La neutropenia es una afección caracterizada por cantidades anormalmente bajas de glóbulos blancos, particularmente neutrófilos, que son de vida corta y representan el leucocito más abundante en la sangre periférica. Los neutrófilos y otros leucocitos polimorfonucleares migran a sitios de infección a través de la acción de diversas 50 quimioquinas para proporcionar una respuesta inmune crítica contra los agentes infecciosos. Durante el periodo de tiempo necesario para la recuperación del sistema hematopoyético después de trasplante, el destinatario del trasplante tiene niveles bajos de neutrófilos en circulación y es susceptible a infecciones bacterianas y fúngicas, particularmente a infecciones oportunistas por microorganismos habitualmente existentes, tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Aspergillus fumigatus*. La neutropenia prolongada, particularmente la resultante de injerto retardado de 55 HSC donantes, aumenta la probabilidad de infección y está asociada con altas tasas de mortalidad.

Una terapia convencional para neutropenia es la administración de G-CSF. Esta citoquina promueve el desarrollo de granulocitos y también potencia las respuestas efectoras inmunes de los neutrófilos. G-CSF acelera la recuperación después de trasplante de células madre hematopoyéticas, pero puede no ser eficaz para sujetos tratados con 60 quimioterapia de alta dosis en ausencia de HSCT a causa de los bajos números de células madre hematopoyéticas sensibles en el paciente.

Otro enfoque terapéutico implica la infusión de neutrófilos (transfusiones de granulocitos) como medida temporal para proteger contra infecciones. Después del tratamiento del donante con G-CSF o GM-CSF, se recogen células por leucoféresis de sangre periférica y se administran en el destinatario para elevar los niveles en circulación de 65 neutrófilos (véase, por ejemplo, Lin, Y-W et al., *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4892-4893 (2003)). Los sujetos tratados por

este método muestran supervivencia aumentada, pero la eficacia clínica de este enfoque parece incierta, posiblemente debido a la corta vida de los neutrófilos diferenciados después de trasplante o debido a los efectos adversos de almacenamiento sobre la actividad de los neutrófilos (McCullough, J. et al., *Transfusion* 23(1):20 (1983)). Además, como la eficacia de la transfusión de neutrófilos se correlaciona con la cantidad de células administradas, la disponibilidad limitada de células donantes, habitualmente un hermano compatible o progenitor haplocoincidente, y la incapacidad de almacenar las células puede limitar la aplicabilidad general de este enfoque.

La trombocitopenia es una afección asociada con otra célula diferenciada de forma terminal del linaje mielóide, el megacariocito, y se caracteriza por niveles anormalmente bajos de plaquetas. Las plaquetas son esenciales para el proceso de coagulación sanguínea y son necesarias para limitar la filtración de eritrocitos de los vasos sanguíneos. Niveles por debajo del normal de plaquetas provoca un riesgo aumentado de hemorragia, y puede provocar hemorragia espontánea cuando los niveles de plaquetas descienden por debajo de un nivel crítico. La trombocitopenia puede surgir a partir de la producción alterada de plaquetas y/o tasa aumentada de eliminación. La aparición de trombocitopenia en el entorno HSCT resulta del desarrollo alterado de megacariocitos, y se intensifica por injerto retardado de HSC, complicaciones por infecciones, e incidencias de GVHD. Como con la neutropenia, el tratamiento de la trombocitopenia es crítico después de cualquier tratamiento mieloablativo para minimizar las complicaciones potencialmente mortales.

La transfusión de plaquetas es una terapia rutinaria para tratar la trombocitopenia, y es eficaz en la reducción de problemas hemorrágicos graves asociados con bajos niveles de plaquetas. El uso de plaquetas de donantes de MHC coincidente minimiza cualquier respuesta inmune adversa contra las plaquetas del donante. La asociación entre infecciones y trombocitopenia, sin embargo, sugiere que la neutropenia puede complicar la afección trombocitopénica, requiriendo transfusiones más frecuentes en dichos pacientes. Además, el uso de terapia con G-CSF para tratar la neutropenia está contraindicado para trombocitopenia a causa de la acelerada destrucción de plaquetas correlacionada con la administración de G-CSF.

Aunque la infusión de células protectoras inmunes para neutropenia y transfusiones de plaquetas para trombocitopenia siguen siendo enfoques viables para tratar estas afecciones, es deseable aumentar la duración de la protección, y para la neutropenia, tener disponible un suministro más constante de células de administración. Además, los tratamientos capaces de abordar ambos trastornos de forma concurrente, en lugar de por separado, mejorarán el manejo de estas complicaciones de hematopoyesis alterada.

4. SUMARIO

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición terapéutica para reconstituir de forma transitoria la hematopoyesis en un ser humano, que comprende:

a) cultivar una población celular de partida que comprende células madre hematopoyéticas humanas CD34+CD90+ (HSC) de una pluralidad de donantes alogénicos no relacionados y al menos parcialmente desiguales, donde existe al menos una desigualdad parcial en el MHC entre los donantes y el destinatario, *ex vivo* en un medio de cultivo que comprende una mezcla de citoquinas y factores de crecimiento para producir una población celular expandida que comprende más del 50% de células progenitoras mieloides CD34⁺CD90^{neg} donde las células progenitoras mieloides son una mezcla de células progenitoras mieloides alogénicas que comprenden al menos una desigualdad parcial en el MHC entre sí, y con el destinatario; y

b) resuspender dichas células progenitoras mieloides en un medio farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un ser humano. La presente descripción describe composiciones y métodos útiles en el tratamiento de complicaciones que surgen de hematopoyesis alterada. La incapacidad de generar células diferenciadas de forma terminal del linaje mielóide en sujetos con hematopoyesis insuficiente conduce a varias afecciones potencialmente mortales, de forma más notable neutropenia y trombocitopenia. Reemplazando de forma transitoria la población celular asociada con estas afecciones, se mejoran o evitan las complicaciones que surgen del agotamiento de células mieloides diferenciadas hasta el momento en que pueda regenerarse el sistema hematopoyético endógeno o reconstituido del paciente.

Por consiguiente, los métodos para preparar composiciones terapéuticas de células progenitoras mieloides para reconstituir la hematopoyesis en un hospedador mamífero pueden comprender: a) cultivar *ex vivo* una población celular de partida que incluya células madre hematopoyéticas en un medio de cultivo adecuado para expandir dicha población de células y aumentar la cantidad de células progenitoras mieloides dentro de dicha población celular; y b) resuspender dichas células progenitoras mieloides en un medio farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un hospedador mamífero. De forma ventajosa, como se demuestra en este documento, la población inicial de células puede derivarse de un donante alogénico o, aún más preferiblemente, de una pluralidad de donantes alogénicos, produciendo células progenitoras mieloides alogénicas expandidas *ex vivo* obtenidas de uno o una pluralidad de donantes. Los donantes pueden estar relacionados o no relacionados entre sí, y en el entorno de trasplante, relacionados o no relacionados con el destinatario.

Sorprendentemente, como se demuestra adicionalmente en este documento, los presentes inventores han determinado que las células progenitoras mieloides expandidas de la presente invención pueden crioconservarse

después de la expansión y aún retener su funcionalidad en la reconstitución de la hematopoyesis en un entorno terapéutico, incluyendo progenitores de granulocitos/macrófagos. Aunque se sabe que las células madre hematopoyéticas retienen su funcionalidad después de crioconservación, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.004.681, la crioconservación de su descendencia más diferenciada no ha sido uniformemente satisfactoria, complicando de este modo su implementación práctica como terapia clínica basada en células. Los progenitores mieloides expandidos proporcionados en este documento tienen esta característica ventajosa, y en una realización preferida se crioconservan antes de resuspensión y administración a un paciente.

La población inicial de células para la expansión puede derivarse de sangre periférica, sangre periférica movilizada, sangre de cordón umbilical, médula ósea, y/u otros órganos que se sabe que albergan células madre hematopoyéticas, tales como hígado fetal. Las poblaciones celulares pueden ser mezclas de células obtenidas de una fuente o células aisladas, particularmente como una población enriquecida o sustancialmente pura, en base a un fenotipo de marcadores celulares deseados (por ejemplo, células CD34+ y/o CD90+ y/o AC133+ y/o ALDH+). La población celular de partida puede enriquecerse para HSC en base a la presencia del marcador celular CD34+ o CD90+; o la población celular de partida es HSC purificada que son tanto CD34+ como CD90+, particularmente para la expansión de células progenitoras mieloides humanas. Las células también pueden tener el fenotipo de marcadores celulares Lin^{neg/low}.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende la población celular o composición terapéutica de acuerdo con la invención. Las composiciones terapéuticas por tanto pueden incluir las células progenitoras mieloides expandidas resultantes de los métodos de la invención. La composición terapéutica puede comprender o consistir esencialmente en células progenitoras mieloides expandidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la composición terapéutica puede comprender o consistir esencialmente en células progenitoras mieloides expandidas crioconservadas en un medio de crioconservación. Las células progenitoras mieloides expandidas pueden ser alogénicas, y pueden ser una mezcla de células progenitoras mieloides alogénicas. La mezcla de células progenitoras mieloides alogénicas puede comprender al menos una desigualdad parcial en el MHC, donde la desigualdad del MHC es entre el MHC de los diversos donantes o entre los donantes y el destinatario, o una desigualdad total o completa en el MHC. Por consiguiente, dichas mezclas de células alogénicas pueden comprender una desigualdad parcial en el MHC entre algunas células y una desigualdad completa entre otras células en la población. Las células progenitoras que experimentan injerto temporal (por ejemplo, poblaciones de células progenitoras que aparecen temprano en el linaje mieloides) pueden seleccionarse por tener una coincidencia o una desigualdad parcial en el MHC mientras que células progenitoras más diferenciadas tienen una desigualdad parcial o completa en el MHC.

Las mezclas de células progenitoras mieloides alogénicas pueden ser mezclas de células aisladas. Estas incluyen CMP aisladas, GMP aisladas, MEP aisladas, o combinaciones de las mismas. Las células para las mezclas pueden obtenerse de células progenitoras mieloides expandidas, o de cultivos celulares expandidos *ex vivo* descritos en este documento. Para mezclas de células expandidas alogénicas, las células alogénicas pueden mezclarse antes de la expansión o después de la expansión.

La presente descripción también proporciona métodos para generar células progenitoras mieloides a través de su expansión *ex vivo* en cultivo. En los métodos, las células capaces de producir células progenitoras mieloides tales como, por ejemplo, células madre hematopoyéticas (HSC), se ponen en contacto con un medio de cultivo que comprende una mezcla de citoquinas y factores de crecimiento que da soporte a la expansión de células progenitoras mieloides, y las células después se cultivan en condiciones adecuadas que facilitan su expansión. Las citoquinas adecuadas para propósitos de expansión *ex vivo* se seleccionan entre IL-1 (es decir, [IL-1β](#)), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, y análogos de las mismas. Factores de crecimiento adecuados para propósitos de expansión *ex vivo* se seleccionan entre ligando de c-kit (SCF o SF), ligando de FLT-3 (FL), trombopoyetina (TPO), eritropoyetina (EPO), y análogos de los mismos. Como se usa en este documento, los análogos incluyen variantes de las citoquinas y factores de crecimiento que tienen la actividad biológica característica de las formas de origen natural.

En una realización preferida, el medio es un medio químicamente definido que carece de componentes indefinidos (cualitativa o cuantitativamente), incluyendo materiales de expansión basados en células tales como células estromáticas u otras células de alimentación. De forma significativa, la inclusión de dichos materiales puede ser problemática desde una perspectiva de fabricación y regulación, y la selección y desarrollo de una alternativa químicamente definida que expanda apropiadamente los tipos celulares deseados representa otra contribución adicional significativa de la presente invención.

En una realización, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento en su composición básica tiene factor de células madre (SCF), ligando de FLT-3 (FL), y trombopoyetina (TPO). En realizaciones preferidas, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene una citoquina adicional seleccionada entre IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, y combinaciones de las mismas, y particularmente entre IL-3, IL-6, IL-11, y combinaciones de las mismas. Por tanto, en una realización, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición SCF, FL, TPO, e IL-3, mientras que en otra realización, la mezcla tiene la composición SCF, FL, TPO, e IL-6. Una combinación de la

citoquina adicional es IL-6 e IL-11 de modo que la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tenga la composición SCF, FL, TPO, IL-6 e IL-11.

Las formas de las citoquinas y factores de crecimiento son sus productos de origen natural, productos recombinantes, variantes o análogos, o formas modificadas que tienen actividad biológica similar a las formas de origen natural. Las citoquinas se eligen para que sean activas sobre las células usadas para expansión, y por tanto su fuente generalmente reflejará el origen de las células iniciales usadas para expansión, aunque esta correspondencia entre la forma de la citoquina y el origen de las células no tiene que ser rigurosa ya que se sabe de reactividad cruzada entre las formas para diversas citoquinas y factores de crecimiento, y se puede ensayar fácilmente. Por tanto, en una realización, las citoquinas usadas son rhIL-1 humana recombinante (rhu), (es decir, rhuIL-1 β), rhIL-3, rhIL-6, rhIL-11, rhuG-CSF, rhuGM-CSF, o análogos de las mismas. Asimismo, los factores de crecimiento usados son rhuSCF, rhuFL, rhuTPO, rhuEPO, humanos recombinantes o análogos de los mismos.

La población celular de partida se cultiva en condiciones que dan soporte a la expansión de células progenitoras mieloides hasta niveles definidos. Las células progenitoras mieloides expandidas obtenidas de acuerdo con la presente invención generalmente comprenden células progenitoras mieloides comunes (CMP), células progenitoras de granulocitos/macrófagos (GMP), y células progenitoras de megacariocitos/eritroides (MEP). Por tanto, en un aspecto, los cultivos expandidos *ex vivo* comprenden CMP expandidas en que la población celular CMP se expande a al menos aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 30 veces. En la preparación de cultivo celular final (por ejemplo, en el momento de la recogida de las células), el cultivo expandido comprende una población CMP que es al menos aproximadamente un 0,5%, al menos aproximadamente un 1%, al menos aproximadamente un 2%, al menos aproximadamente un 5%, y al menos aproximadamente un 10% de las células totales en el cultivo.

En otro aspecto, los cultivos expandidos *ex vivo* comprenden GMP expandidas en que la población de células GMP se expande al menos aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 40 veces, y preferiblemente al menos aproximadamente 80 veces. En la preparación de cultivo celular final, los cultivos expandidos comprenden una población GMP que es al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 30%, y preferiblemente al menos aproximadamente un 50% de las células totales en cultivo. La población celular MEP en los cultivos se expande al menos aproximadamente 0,1 vez, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 5 veces, y al menos aproximadamente 10 veces. En la preparación de cultivo celular final, los cultivos expandidos comprenden una población celular MEP que es al menos aproximadamente un 0,5%, aproximadamente un 1%, aproximadamente un 2%, y al menos aproximadamente un 5% de las células totales en el cultivo.

De forma colectiva, el total combinado de las células progenitoras mieloides en la preparación de cultivo celular final es mayor del 50% de células progenitoras mieloides CD34+90^{neg}, aún más preferiblemente al menos aproximadamente del 60% o 70%, más preferiblemente al menos del 80% o 90%, y de forma ideal al menos aproximadamente del 95% de las células totales en el cultivo expandido.

Las células preparadas por expansión *ex vivo* pueden resuspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y usarse directamente o como alternativa pueden someterse a procesamiento por diversas técnicas de purificación celular disponibles para los especialistas en la técnica, tales como clasificación FACS, separación por afinidad magnética, y columnas inmunoafinidad. Las poblaciones celulares aisladas de los cultivos expandidos incluyen, entre otras, células progenitoras mieloides aisladas, CMP aisladas, GMP aisladas y MEP aisladas. Preferiblemente, la población celular aislada es una población sustancialmente pura de células.

Las células descritas en este documento tienen diversas aplicaciones en entornos terapéuticos y no terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las células se usan para tratar a sujetos con hematopoyesis alterada o destruida. Las células se administran a un sujeto, tal como por infusión intravenosa, en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico, de forma profiláctica para disminuir la aparición de afecciones adversas asociadas con hematopoyesis alterada o para tratar a un sujeto que ya padece complicaciones asociadas con hematopoyesis alterada. En un aspecto adicional, las células se usan para tratar a sujetos en el entorno HSCT, de forma concurrente con o posterior al HSCT.

La neutropenia y trombocitopenia están asociadas con hematopoyesis alterada, particularmente donde el sujeto ha experimentado terapia mieloablativa, aunque las afecciones pueden aparecer en otros contextos. Las células descritas en este documento se pueden aplicar para el tratamiento de estas afecciones, como una medida profiláctica para reducir la aparición de las afecciones o cuando el sujeto está afectado con las afecciones. Como con las otras aplicaciones terapéuticas, las células en forma terapéutica incluyen células progenitoras mieloides expandidas o no expandidas. Como la neutropenia y trombocitopenia están asociadas con insuficiencia de tipos celulares mieloides específicos, las poblaciones celulares elegidas pueden adaptarse a la afección específica que se esté tratando. En una realización, las células son CMP, lo que es útil para cualquier afección ya que las CMP se desarrollan finalmente en neutrófilos y megacariocitos. En situaciones de neutropenia, las células pueden ser GMP ya que las GMP finalmente se desarrollan en neutrófilos. En situaciones para trombocitopenia, las células pueden ser MEP ya que las MEP finalmente se desarrollan en megacariocitos. Como será evidente para los especialistas en

la técnica, combinaciones de poblaciones celulares encuentran aplicación en el tratamiento de estas afecciones, así como las afecciones descritas anteriormente. Las combinaciones de GMP y MEP aisladas son útiles para tratar neutropenia y trombocitopenia de forma concurrente. La adición de CMP a la combinación debe proporcionar protección más prolongada que surge del injerto temporal de CMP y posterior producción de neutrófilos y megacariocitos. Otras combinaciones incluyen CMP y GMP si la neutropenia es el foco principal de tratamiento, aunque la combinación puede ser CMP y MEP si la trombocitopenia es el foco principal de tratamiento.

Las células se administran por métodos bien conocidos en la técnica. En una realización, la administración es por infusión intravenosa. La administración de células puede ser a través de una única administración o sucesivas administraciones. Cuando están implicadas sucesivas administraciones, pueden usarse diferentes cantidades de células y/o diferentes poblaciones de células para cada administración. Por tanto, una primera administración puede ser de una población celular o una combinación de poblaciones celulares que proporciona un beneficio terapéutico inmediato así como efecto más prolongado (CMP+ GMP + neutrófilos) mientras que la segunda administración incluye células que proporcionan efecto prolongado (por ejemplo, CMP) para prolongar el efecto terapéutico de la primera administración. Estas y otras estrategias serán evidentes para los especialistas en la técnica.

En realizaciones adicionales, las células progenitoras mieloides de acuerdo con la invención descrita en este documento se usan en combinación con otros compuestos terapéuticos que son eficaces para tratar las afecciones asociadas con hematopoyesis alterada, y/o complicaciones de neutropenia y trombocitopenia. En una realización, los tratamientos complementarios son compuestos antibacterianos, antifúngicos, o antivirales para prevenir infecciones oportunistas o infecciones ya en progreso en el sujeto.

En otra realización, los tratamientos complementarios son compuestos terapéuticos que aumentan la diferenciación de células progenitoras mieloides en la vía mieloide. Estos tratamientos complementarios tienen el efecto de inducir diferenciación y movilización de células progenitoras mieloides que son endógenas, o administradas al sujeto como parte de la terapia. En una realización, particularmente para tratar o prevenir la neutropenia, se administra G-CSF o GM-CSF de forma concurrente con o después de administración de las células. Otro tratamiento complementario implica la administración de EPO o TPO, en particular como tratamientos complementarios para trombocitopenia ya que EPO induce la diferenciación de MEK en proeritroblastos y células eritroides maduras mientras que TPO parece inducir el crecimiento y diferenciación de células madre hematopoyéticas y células progenitoras mieloides tempranas en megacariocitos y plaquetas maduras.

La presente descripción proporciona kits que contienen la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento, células iniciales para expansión, medios y otros componentes necesarios para realizar los métodos de expansión *ex vivo*. Se proporcionan kits dirigidos al uso de las poblaciones celulares, expandidas o no expandidas, para aplicaciones terapéuticas, tales como para tratamientos para neutropenia y trombocitopenia. Los kits pueden incluir adicionalmente, a modo de ejemplo y sin limitación, tampones, marcadores, reactivos, e instrucciones para métodos de uso de los kits.

5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un esquema de un diseño experimental que muestra (A) poblaciones celulares clasificadas y analizadas. (B) Derivación de progenitores mieloides a partir de HSC en cultivo, puede usarse cultivo derivado de células MP fresco o criopreservado. (C) El uso de progenitores mieloides para proteger a ratones neutropénicos de una exposición fúngica.

La FIG. 2 muestra la derivación de progenitores mieloides a partir de HSC en cultivo.

La FIG. 3 muestra la protección de ratones neutropénicos por progenitores mieloides derivados de cultivos alogénicos.

La FIG. 4 muestra una comparación de progenitores mieloides frescos y criopreservados.

La FIG. 5 muestra la reconstitución con progenitores mieloides en ratones.

La FIG. 6 muestra la respuesta a dosis en protección por progenitores mieloides derivados de cultivo.

La FIG. 7 muestra el tiempo hasta protección eficaz usando progenitores mieloides en ratones.

La FIG. 8 muestra protección de ratones neutropénicos por progenitores mieloides derivados de cultivo alogénico mixto.

La FIG. 9A muestra la capacidad radioprotectora de progenitores cultivados alogénicos completamente desiguales en MHC y quimerismo detectable de donante (FIG. 9B).

La FIG. 10 muestra radioprotección de 30 días a partir de ratones irradiados de forma letal trasplantados con progenitores mieloides alogénicos completamente desiguales en MHC frescos y congelados. Las FIG. 11A-B muestran datos de expansión humana en bolsas AFC de 7 ml y matraces.

5 La FIG. 12 muestra fotografías de células de cultivos de progenitores mieloides humanos y tratadas con factores de crecimiento.

La FIG. 13 muestra datos de expansión humana en bolsas AFC de 7 ml.

10 La FIG. 14 muestra datos de expansión humana en bolsas AFC de 72 ml.

La FIG. 15 muestra formación de colonias de progenitores mieloides humanos.

15 La FIG. 16 muestra el análisis FACS de cultivos de progenitores mieloides humanos para poblaciones madre y progenitoras.

La FIG. 17 muestra el efecto de IL-3 e IL-6, solas y en combinación sobre células progenitoras mieloides humanas.

20 La FIG. 18 muestra los resultados de un ensayo de formación de colonias de los cultivos de progenitores mieloides con IL-3, IL-6 o en combinación.

La FIG. 19 muestra las cantidades absolutas de CFU en cultivos de progenitores mieloides con IL-3, IL-6 o en combinación.

25 La FIG. 20 muestra sensibilidad de células progenitoras mieloides humanas hacia G-CSF.

La FIG. 21 es un esquema para mostrar la sensibilidad de células progenitoras mieloides humanas a G-CSF *in vivo*.

30 La FIG. 22 es un análisis FACS de médula ósea y bazo de ratón que muestra injerto de MP humanas una semana después de trasplante y su respuesta a G-CSF.

La FIG. 23 es un fenotipo FACS de los progenitores mieloides derivados de cultivo humano en ratones NOD/SCID.

35 6. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente descripción describe métodos para generar células útiles para el tratamiento de afecciones asociadas con un sistema hematopoyético deficiente o alterado, tal como neutropenia y trombocitopenia que se desarrolla después de terapia mieloablativa y trasplante de células madre hematopoyéticas, quimioterapia para enfermedades malignas, o como consecuencia de exposición no deseada a altas dosis de radiación ionizante. Las células expandidas descritas en este documento comprenden células progenitoras mieloides comprometidas (MP) generadas por contacto de una población inicial de células madre y células progenitoras con una mezcla definida de citoquinas y factores de crecimiento permisiva para el desarrollo de las células progenitoras mieloides comprometidas. En las condiciones definidas de cultivo, las células progenitoras mieloides se expanden preferentemente hasta niveles definidos. Las células expandidas se usan como conjunto, o se someten a purificación para proporcionar células aisladas que tienen un fenotipo definido de marcadores celulares y un potencial característico de diferenciación. Las poblaciones celulares aisladas incluyen progenitores mieloides comunes (CMP), progenitores de granulocitos/macrófagos (GMP), progenitores de megacariocitos/eritroides (MEP), y combinaciones de los mismos. La infusión de estas células progenitoras mieloides comprometidas en un paciente inmunodeficiente provoca injerto y/o producción a corto plazo de células diferenciadas de forma terminal del linaje mieloides. Esto proporciona una reposición temporal pero prolongada de células diferenciadas de forma terminal, particularmente neutrófilos y megacariocitos, complementando de ese modo el periodo de hematopoyesis deficiente.

En el campo de HSCT, las técnicas de expansión se han dirigido principalmente hacia el aumento de la población de HSC con propósitos de trasplante y restauración permanente de hematopoyesis (Devine, S.M. et al., *Bone Marrow Transplantation* 31:241-252 (2003); Henschler, R. et al., *Blood* 84(9):2898-2903 (1994); Bhatia, M. et al., *J. Exp. Med.* 186:619-624 (1997)). Las combinaciones de citoquinas y factores de crecimiento empleadas generalmente intentan causar expansión preferente de HSC limitando al mismo tiempo su diferenciación en células comprometidas de los linajes mieloides y linfoides. La cantidad de HSC expandidas en el contexto de HSCT es especialmente relevante ya que las características de injerto de las células infundidas y la supervivencia del destinatario del trasplante se correlaciona con cantidades crecientes de HSC infundidas, particularmente cuando existe una desigualdad en el MHC del donante y el destinatario (Ketterer N. et al., *Blood* 91:3148-3155 (1998)). Las condiciones de cultivo que inducen diferenciación de las células madre son indeseables a causa de las bajas cantidades de HSC producidas. Como las HSC tienen capacidad de auto-renovación, se usan cultivos a largo plazo en algunos casos para seleccionar poblaciones HSC de auto-reposición (Piacibillo, W. et al., *Blood* 93(11):3736-3749 (1999)).

65

En contraste, las células progenitoras mieloides comprometidas tienen capacidad limitada o ausente de auto-renovación, y por tanto las condiciones de cultivo adecuadas para la expansión de HSC no son óptimas para la expansión de estas células. Por otro lado, la presencia de citoquinas que promueven el desarrollo rápido de las células cultivadas en células diferenciadas de forma terminal (por ejemplo, neutrófilos y megacariocitos) es indeseable porque estas poblaciones celulares expandidas pueden no proporcionar la protección prolongada producida por infusión de células progenitoras menos diferenciadas que se encuentran en fases iniciales de la vía de diferenciación mieloide (Reichle, A. et al., *Bone Marrow Transplantation* 32:299-305 (2003); Zimmerman, T.M. et al., *Bone Marrow Transplantation* 26:505-510 (2000); Reiffers, J. et al., *Lancet* 354:1092-1093 (1999)). Por tanto, el enfoque de expansión descrito en este documento limita la generación de HSC aumentando al mismo tiempo las cantidades de MP, particularmente células CMP y GMP. Las HSC presentes en la población celular expandida son principalmente células madre hematopoyéticas de repoblación a corto plazo (ST-HSC), y generalmente son menos del 10% de las células expandidas, más preferiblemente menos del 5%, y típicamente en el intervalo del 2-5% de la población celular expandida. Los métodos de expansión son aplicables a células usadas en el entorno de trasplante autólogo o alogénico.

De forma ventajosa, para aumentar adicionalmente la cantidad de células disponibles para expansión y/o terapia y para hacer la aplicación clínica expandida comercialmente factible, las poblaciones celulares descritas en este documento preferiblemente incluyen mezclas de células progenitoras mieloides alogénicas. Típicamente, no se usan células alogénicas para HSCT a causa de posible GVHD y reacciones de hospedador contra injerto, ambos cuales pueden retardar el injerto de HSC en el destinatario del trasplante. En su lugar, generalmente se usa un único donante que tiene una coincidencia completa o parcial en el MHC como fuente de HSC. A diferencia del contexto HSCT, sin embargo, el uso de células progenitoras mieloides comprometidas alogénicas que no coinciden con el MHC del hospedador no es adverso para su eficacia terapéutica ya que el injerto permanente no es el propósito ni el efecto producido por la infusión de estas células diferenciadas. La pérdida de HSC, y HSC de repoblación a largo plazo en particular, no es perjudicial para el efecto terapéutico ya que la protección temporal contra la neutropenia y/o trombocitopenia se proporciona por las células progenitoras mieloides comprometidas. Las mezclas de células mieloides alogénicas pueden prepararse a partir de células expandidas o no expandidas.

6.1 Definiciones

En referencia a la presente descripción, los términos técnicos y científicos usados en las descripciones en este documento tendrán los significados habitualmente comprendidos por un especialista en la técnica, salvo que se defina específicamente de otro modo. Por consiguiente, los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados:

"Alogénico" se refiere a derivado de, originarse en, o ser miembros de la misma especie, donde los miembros están genéticamente relacionados o genéticamente no relacionados pero genéticamente similares. Un "trasplante alogénico" se refiere a transferencia de células u órganos de un donante a un destinatario, donde el destinatario es de la misma especie que el donante.

"Autólogo" se refiere a derivar de u originarse en el mismo sujeto o paciente. Un "trasplante autólogo" se refiere a la recogida y re-infusión o trasplante de las células u órganos del propio paciente. El uso exclusivo o complementario de células autólogas puede eliminar o reducir muchos efectos adversos de la administración de las células de nuevo en el hospedador, en particular la reacción de injerto contra hospedador.

"Químicamente definido" como se usa en este documento se refiere al medio de cultivo de composición química conocida, tanto cuantitativa como cualitativamente, sin suplementos no caracterizados añadidos deliberadamente, aunque dicho medio puede contener contaminantes traza en sus componentes. Un medio químicamente definido necesariamente carece de suero animal, células de alimentación tales como células estromáticas, y matrices extracelulares basadas en células derivadas de, por ejemplo, fibroblastos y similares.

"Célula progenitora mieloide comprometida" o "célula progenitora mieloide" se refiere a una célula progenitora multipotente o unipotente capaz de desarrollarse finalmente en cualquiera de las células diferenciadas de forma terminal del linaje mieloide, pero que no se diferencia típicamente en células del linaje linfóide. Por tanto, "célula progenitora mieloide" se refiere a cualquier célula progenitora en el linaje mieloide. Células progenitoras comprometidas del linaje mieloide incluyen CMP oligopotentes, GMP, y MEP como se define en este documento, pero también abarca células progenitoras eritroides unipotentes, progenitoras de megacariocitos, progenitoras de granulocitos, y progenitoras de macrófagos. Las diferentes poblaciones celulares de células progenitoras mieloides se pueden distinguir de otras células por su potencial de diferenciación, y la presencia de un conjunto característico de marcadores celulares.

"Célula progenitora linfóide comprometida" o "célula progenitora linfóide" se refiere a una célula progenitora oligopotente o unipotente capaz de desarrollarse finalmente en cualquiera de las células diferenciadas de forma terminal del linaje linfóide, tal como célula T, célula B, célula NK, o células dendríticas linfoides, pero que no se diferencia típicamente en células del linaje mieloide. Como con células del linaje mieloide, las diferentes poblaciones

celulares de progenitores linfoides se pueden distinguir de otras células por su potencial de diferenciación, y la presencia de un conjunto característico de marcadores celulares.

5 "Célula progenitora linfoide común" o "CLP" se refiere a una célula oligopotente caracterizada por su capacidad de dar lugar a progenitores de células-B (BCP), progenitores de células-T (TCP), células NK, y células dendríticas. Estas células progenitoras tienen poca o ninguna capacidad de auto-renovación, pero son capaces de dar lugar a linfocitos T, linfocitos B, células NK, y células dendríticas linfoides.

10 "Célula progenitora mielóide común" o "CMP" se refiere a una célula caracterizada por su capacidad de dar lugar a células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP) y células progenitoras de megacariocitos/eritroides (MEP). Estas células progenitoras tienen capacidad limitada o ausente de auto-renovación, pero son capaces de dar lugar a células dendríticas mieloides, eritroides mieloides, eritroides, megacariocitos, granulocitos/macrófagos, granulocitos, y macrófagos.

15 "Congénico" se refiere a derivado de, originarse en, o ser miembros de la misma especie, donde los miembros son genéticamente idénticos excepto por una pequeña región genética, típicamente un único locus genético (es decir, un único gen). Un "trasplante congénico" se refiere a la transferencia de células u órganos de un donante a un destinatario, donde el destinatario es genéticamente idéntico al donante excepto por un único locus genético.

20 "Citoquina" se refiere a compuestos o composiciones que en su estado natural se crean por células y afectan a los estados fisiológicos de las células que producen la citoquina (es decir, factores autocrinos) u otras células. Citoquina también abarca cualquier compuesto o composición preparada por procesos recombinantes o sintéticos, donde los productos de esos procesos tienen estructura y actividad biológica idéntica o similar a las formas de origen natural. Linfoquinas se refiere a formas naturales, sintéticas o recombinantes de citoquinas producidas de forma natural por linfocitos, incluyendo, aunque sin limitación, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, y similares.

30 "Expansión" en el contexto de células se refiere al aumento en la cantidad de un tipo celular característico, o tipos celulares, a partir de una población inicial de células, que pueden ser idénticas o no. Las células iniciales usadas para la expansión no tienen que ser iguales a las células generadas a partir de la expansión. Por ejemplo, las células expandidas pueden producirse por crecimiento y diferenciación de la población inicial de células. Excluidos del término expansión están los ensayos de dilución limitante usados para caracterizar el potencial de diferenciación de las células.

35 "Funcional" en el contexto de células se refiere a células capaces de funcionar o células que retienen las funciones regulares o actividades asociadas con el tipo celular específico, como se identifica por un ensayo o ensayos funcionales definidos. Por ejemplo, una "célula GMP funcional" es una célula progenitora capaz de diferenciarse finalmente en granulocitos y macrófagos, donde las células diferenciadas de forma terminal funcionan como granulocitos y macrófagos normales.

40 "Respuesta de injerto contra hospedador" o "GVH" o "GVHD" se refiere a una respuesta celular que sucede cuando los linfocitos de una clase diferente de MHC se introducen en un hospedador, provocando la reacción de los linfocitos donantes contra el hospedador.

45 "Célula progenitora de granulocitos/macrófagos" o "GMP" se refiere a una célula derivada de células progenitoras mieloides comunes, y caracterizada por su capacidad de dar lugar a células granulocitos y macrófagos, pero que no da lugar típicamente a células eritroides o megacariocitos del linaje mielóide.

50 "Factor de crecimiento" se refiere a un compuesto o composición que en su estado natural afecta a la proliferación celular, supervivencia celular, y/o diferenciación. Un factor de crecimiento, aunque tenga el efecto indicado sobre la célula, también puede afectar a otros procesos fisiológicos, tales como secreción, adhesión, respuesta a estímulos externos, y similares. Aunque muchos factores de crecimiento se crean por las células, los factores de crecimiento usados en este documento también abarcan cualquier compuesto o composición preparada por procesos recombinantes o sintéticos, donde el producto de esos procesos tiene estructura y actividad biológica idéntica o similar que el factor de crecimiento de origen natural. Ejemplos de factores de crecimiento incluyen factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), factor de células madre (SCF), y ligando de flt-3 (FL), y análogos de los mismos.

60 "Aislado" se refiere a un producto, compuesto, o composición que está separado de al menos otro producto, compuesto, o composición con el que está asociado en su estado de origen natural, sea natural o preparado sintéticamente.

65 "Célula madre hematopoyética" o "HSC" se refiere a una célula clonogénica pluripotente de auto-renovación, capaz de diferenciarse finalmente en todos los tipos celulares del sistema hematopoyético, incluyendo células B, células T, células NK, células dendríticas linfoides, células dendríticas mieloides, granulocitos, macrófagos, megacariocitos, y células eritroides. Como con otras células del sistema hematopoyético, las HSC típicamente se definen por la presencia de un conjunto característico de marcadores celulares. "Enriquecido" cuando se usa en el contexto de

HSC se refiere a una población celular seleccionada en base a la presencia de un único marcador celular, generalmente CD34+, mientras que "purificado" en el contexto de HSC se refiere a una población celular resultante de una selección en base a dos o más marcadores, preferiblemente CD34+ CD90+.

5 "Fenotipado de marcadores" se refiere a la identificación de marcadores o antígenos en células para determinar su fenotipo (por ejemplo, estado de diferenciación y/o tipo celular). Esto puede hacerse por inmunofenotipado, que usa anticuerpos que reconocen antígenos presentes en una célula. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, pero generalmente se eligen por tener reactividad cruzada mínima con otros marcadores celulares. Debe entenderse que ciertos marcadores de diferenciación celular o superficie celular son únicos para la especie animal de la cual se obtienen las células, mientras que otros marcadores celulares serán comunes entre especies. A estos marcadores que definen tipos celulares equivalentes entre especies se les da la misma identificación de marcador aunque haya diferencias de especie en la estructura (por ejemplo, secuencia de aminoácidos). Los marcadores celulares incluyen moléculas de superficie celular, también mencionadas en ciertas situaciones como marcadores de diferenciación celular (CD), y marcadores de expresión génica. Los marcadores de expresión génica son aquellos conjuntos de genes expresados indicativos del tipo celular o estado de diferenciación. En parte, el perfil de expresión génica reflejará los marcadores de superficie celular, aunque pueden incluir moléculas no de superficie celular.

20 "Célula progenitora de megacariocitos/eritroides" o "MEP" se refiere a una célula derivada de células progenitoras mieloides comunes, y caracterizada por su capacidad de dar lugar a células eritroides y megacariocitos, pero que no da lugar típicamente a granulocitos, macrófagos, o células dendríticas mieloides.

25 "Alogénico desigual" se refiere a derivar de, originarse en, o ser miembros de la misma especie que tiene antígenos no idénticos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (es decir, proteínas) determinados típicamente por ensayos convencionales usados en la técnica, tales como análisis serológico o molecular de una cantidad definida de antígenos MHC. Una "disparidad parcial" se refiere a apareamiento parcial de los antígenos MHC ensayados entre miembros, típicamente entre un donante y un receptor. Por ejemplo, una "semi-disparidad" se refiere a que el 50% de los antígenos MHC ensayados muestran diferente tipo de antígeno MHC entre dos miembros. Una disparidad "total" o "completa" se refiere a que todos los antígenos MHC ensayados son diferentes entre dos miembros.

35 "Mieloablato" o "mieloablación" se refiere a alteración o destrucción del sistema hematopoyético, típicamente por exposición a un agente citotóxico o radiación. La mieloablación abarca la mieloablación completa producida por elevadas dosis de agente citotóxico o irradiación corporal total que destruye el sistema hematopoyético. También incluye un estado mielodestruido menos que completo causado por condicionamiento no mieloablato. Por tanto, el condicionamiento no mieloablato es el tratamiento que no destruye completamente el sistema hematopoyético del sujeto.

40 "Neutropenia" se refiere a una cantidad inferior que la normal de neutrófilos y otros leucocitos polimorfonucleares en la sangre periférica. Típicamente, una afección neutropénica se diagnostica en base al recuento absoluto de neutrófilos (ANC), que se determina multiplicando el porcentaje de grupos y neutrófilos en un diferencial por el recuento total de glóbulos blancos. Clínicamente, un ANC anormal es mejor de aproximadamente 1500 células por ml de sangre periférica. La severidad de la neutropenia se clasifica como leve para un ANC de 1000-1500 células por ml, moderada para un ANC de 500-1000 células por ml, y severa para un ANC de menos de 500 células por ml.

45 "Auto-renovación" se refiere a la capacidad de una célula de dividirse y generar al menos una célula hija con las características idénticas (por ejemplo, auto-renovación) de la célula precursora. La segunda célula hija puede comprometerse a una vía de diferenciación particular. Por ejemplo, una célula madre hematopoyética de auto-renovación se divide y forma una célula madre hija y otra célula hija comprometida a diferenciación en la vía mieloides o linfoides. Una célula progenitora comprometida típicamente ha perdido la capacidad de auto-renovación, y tras división celular produce dos células hijas que presentan un fenotipo más diferenciado (es decir, restringido).

50 "Células madre hematopoyéticas de repoblación a corto plazo" o "ST-HSC" se refiere a células madre hematopoyéticas que tienen capacidad limitada de auto-renovación a corto plazo, y se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en células del linaje mieloides y linfoides. Las ST-HSC se distinguen de las HSC de repoblación a largo plazo (LT) por su longitud limitada de actividad de auto-renovación en ensayos de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 8 semanas; véase, Christensen, J.L. y Weissman, I.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001)).

55 "Clasificación" en lo que se concierne a células se refiere a la separación de células en base a características físicas (tales como, por ejemplo, elutriación u otras técnicas basadas en tamaño) o presencia de marcadores (tal como clasificación usando dispersión lateral (SSC) y dispersión directa (FSC), o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos marcados), o análisis de células basado en la presencia de marcadores celulares, por ejemplo, FACS son clasificación, e incluyendo también técnicas de inmovilización tales como, por ejemplo, sistemas de separación celular magnética.

65

5 "Población celular sustancialmente pura" se refiere a una población de células que tiene un marcador celular específico característico y un potencial de diferenciación que es al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 75-80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 85-90%, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de las células que componen la población celular total. Por tanto, una "población celular sustancialmente pura" se refiere a una población de células que contienen menos de aproximadamente el 50%, preferiblemente menos de aproximadamente el 20-25%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10-15%, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de células que no presentan un marcador específico característico y potencial de diferenciación en condiciones de ensayo designadas.

10 "Sujeto" o "paciente" se usan de forma intercambiable y se refieren a, excepto cuando se indique, mamíferos tales como seres humanos y primates no humanos, así como conejos, ratas, ratones, cabras, cerdos, y otras especies de mamíferos.

15 "Singénico" se refiere a derivar de, originarse en, o ser miembros de la misma especie que son genéticamente idénticos, particularmente con respecto a antígenos o reacciones inmunológicas. Estos incluyen gemelos idénticos que tienen tipos MHC coincidentes. Por tanto, un "trasplante singénico" se refiere a la transferencia de células u órganos de un donante a un destinatario que es genéticamente idéntico al donante.

20 "Trombocitopenia" se refiere a un recuento de plaquetas inferior a lo normal, generalmente menor de aproximadamente $100 \times 10^9/l$, que da lugar a un tiempo de coagulación aumentado y un riesgo aumentado de hemorragia espontánea, particularmente a niveles de plaquetas de aproximadamente $10-50 \times 10^9/l$ o inferior. La afección aparece cuando se pierden plaquetas de la circulación a una tasa más rápida de la de reposición por los megacariocitos. La trombocitopenia puede resultar del fallo en la síntesis de plaquetas y/o la tasa aumentada de destrucción de plaquetas.

25 "Xenogénico" se refiere a derivar de, originarse en, o ser miembros de diferentes especies, por ejemplo, ser humano y roedor, ser humano y cerdo, ser humano y chimpancé, etc. Un "trasplante xenogénico" se refiere a la transferencia de células u órganos de un donante a un destinatario donde el destinatario es una especie diferente de la del donante.

30 6.2 Tipos celulares y fuentes de células para expansión

35 Los tipos celulares relevantes para la presente descripción son aquellos del sistema hematopoyético, particularmente células madre hematopoyéticas y células del linaje mieloide. Las descripciones de células en este documento usarán las conocidas para los especialistas en la técnica, con la comprensión de que estas descripciones reflejan el estado actual del conocimiento en la técnica y la invención no es limitada de ese modo a solamente aquellos marcadores fenotípicos descritos en este documento.

40 Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células madre pluripotentes con capacidad de auto-renovación y se caracterizan por su capacidad de dar lugar en condiciones permisivas a todos los tipos celulares del sistema hematopoyético. La auto-renovación de las HSC se refiere a la capacidad de una célula HSC de dividirse y producir al menos una célula hija con el mismo potencial de auto-renovación y diferenciación de una HSC; es decir, la división celular da lugar a HSC adicionales. La auto-renovación proporciona una fuente continua de células madre indiferenciadas para la reposición del sistema hematopoyético. Los fenotipos de marcadores útiles para identificar HSC serán aquellos habitualmente conocidos en la técnica. Para HSC humanas, los fenotipos de marcadores celulares preferibles incluyen $CD34^+ CD38^- CD90(Thy1)^+ Lin^-$. Para HSC de ratón, un fenotipo de marcador celular ejemplar es $Sca-1^+ CD90^+$ (véase, por ejemplo, Spangrude, G.J. et al., *Science* 1:661-673 (1988)) o $c-kit^+ Thy1^0 Lin^- Sca-1^+$ (véase, Uchida, N. et al., *J. Clin. Invest.* 101(5):961-966 (1998)). Marcadores alternativos de HSC tales como aldehído deshidrogenasa (véase Storms et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 96:9118-23 (1999) y AC133 (véase Yin et al., *Blood* 90:5002-12 (1997) también pueden encontrar uso ventajoso.

55 Las HSC dan lugar a células progenitoras linfoides o mieloides comprometidas. Como se usa en este documento células progenitoras mieloides comprometidas se refiere a poblaciones celulares capaces de diferenciarse en cualquiera de las células diferenciadas de forma terminal del linaje mieloide. Se abarca dentro de las células progenitoras mieloides las células progenitoras mieloides comunes (CMP), una población celular caracterizada por una capacidad limitada o ausente de auto-renovación pero que tiene capacidad de división celular para formar células progenitoras de granulocitos/macrófagos (GMP) y células progenitoras de megacariocitos/eritroides (MEP). Células sin auto-renovación se refiere a células que experimentan división celular para producir células hijas, ninguna de las cuales tiene el potencial de diferenciación del tipo celular precursor, pero en su lugar genera células hijas diferenciadas. Los fenotipos de marcadores útiles para identificar CMP incluyen aquellos habitualmente conocidos en la técnica. Para células CMP de origen murino, la población celular se caracteriza por el fenotipo de marcador $c-Kit^{high} (CD117) CD16^{low} CD34^{low} Sca-1^{neg} Lin^{neg}$ y se caracteriza adicionalmente por los fenotipos de marcadores $Fc\gamma R^{lo} IL-7R\alpha^{neg} (CD127)$. La población celular CMP murina también se caracteriza por la ausencia de expresión de marcadores que incluyen B220, CD4, CD8, CD3, Ter119, Gr-1 y Mac-1. Para células CMP de origen humano, la población celular se caracteriza por $CD34^+ CD38^+$ y se caracteriza adicionalmente por los fenotipos de marcadores $CD123^+ (IL-3R\alpha) CD45RA^{neg}$. La población celular CMP humana también se caracteriza por la ausencia

de marcadores celulares CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, y CD234a. Las descripciones de fenotipos de marcadores para diversas células progenitoras mieloides se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.465.247 y 6.761.883; Akashi, *Nature* 404:193-197 (2000).

5 Otra célula progenitora comprometida del linaje mieloide es la célula progenitora de granulocitos/macrófagos (GMP). Las células de esta población de células progenitoras se caracterizan por su capacidad de dar lugar a granulocitos (por ejemplo, basófilos, eosinófilos, y neutrófilos) y macrófagos. Similar a otras células progenitoras comprometidas, las GMP carecen de capacidad de auto-renovación. Las GMP murinas se caracterizan por el fenotipo de marcador c-Kit^{hi} (CD117) Sca-1^{neg}FcDR^{hi} (CD16) IL-7R^{neg} CD34^{pos}. Las GMP murinas también carecen de la expresión de marcadores B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1, Mac-1, y CD90. Las GMP humanas se caracterizan por el fenotipo de marcador CD34⁺ CD38⁺ CD123⁺ CD45RA⁺. Las poblaciones celulares GMP humanas también se caracterizan por la ausencia de marcadores CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, y CD235a.

15 Cuando resulta relevante para el análisis, las células progenitoras de megacariocitos/eritroides (MEP), que se derivan de las CMP, se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en células progenitoras de megacariocitos y progenitoras eritroides comprometidas. Los megacariocitos maduros son células poliploides que son precursores para la formación de plaquetas, un proceso de desarrollo regulado por trombopoyetina. Las células eritroides se forman a partir de las células progenitoras eritroides comprometidas a través de un proceso regulado por eritropoyetina, y finalmente se diferencian en glóbulos rojos maduros. Las MEP murinas se caracterizan por el fenotipo de marcador celular c-Kit^{hi} e IL-7R^{neg} y se caracterizan adicionalmente por fenotipos de marcadores FcGR^{lo} y CD34^{low}. Las poblaciones celulares MEP murinas también se caracterizan por la ausencia de marcadores B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1, y CD90. Otro fenotipo de marcadores ejemplar para MEP de ratón es c-kit^{high} Sca-1^{neg} Lin^{neg/low} CD16^{low} CD34^{low}. Las MEP humanas se caracterizan por fenotipos de marcadores CD34⁺ CD38⁺ CD123^{neg} CD45RA^{neg}. Las poblaciones celulares MEP humanas también se caracterizan por la ausencia de marcadores CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, y CD235a.

30 Células progenitoras restringidas adicionales en el linaje mieloide son el progenitor de granulocitos, progenitor de macrófagos, progenitor de megacariocitos, y progenitor eritroide. Las células progenitoras de granulocitos se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en granulocitos diferenciados de forma terminal, incluyendo eosinófilos, basófilos, neutrófilos. Las GP típicamente no se diferencian en otras células del linaje mieloide. Con respecto a la célula progenitora de megacariocitos (MKP), estas células se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en megacariocitos diferenciados de forma terminal pero generalmente no en otras células del linaje mieloide (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/024875).

35 Para el linaje linfoide, una "célula progenitora linfoide comprometida" se refiere a una célula capaz de diferenciarse en cualquiera de las células diferenciadas de forma terminal del linaje linfoide. Se abarca dentro de las células progenitoras linfoides las células progenitoras linfoides comunes (CLP), una población celular caracterizada por una capacidad limitada o ausente de auto-renovación pero que tiene capacidad de división celular para formar células progenitoras de linfocitos T y linfocitos B, células NK, y células dendríticas linfoides. Los fenotipos de marcadores útiles para identificar CLP serán aquellos habitualmente conocidos en la técnica. Para células CLP de ratón, la población celular se caracterizan por la presencia de marcadores descritos en Kondo, M. et al., *Cell* 91:661-672 (1997), aunque para CLP humanas, puede usarse un fenotipo de marcador de CD34⁺ CD38⁺ CD10⁺ IL7R⁺ (Galy, A et al., *Immunity*, 3:459-473 (1995); Akashi, K. et al., *Int. J. Hematol.* 69(4):217-226 (1999)).

45 Se proporciona un resumen de los marcadores preferidos de superficie celular murina en la siguiente Tabla 1, donde se muestra una indicación aproximada de los niveles de tinción por los colores de las celdas en las tablas: "N" indica ausencia de tinción, "L" indica bajo nivel de tinción y "H" indica tinción intermedia o elevada.

Tabla 1

HSC	CD117 H	CD90.1 L	Lin1 N	Sca-1 H		
CLP	CD117 H	CD90.1 N	Lin1 N	Sca-1 H	CD127 H	
MP	CD117 H	Sca-1 N	Lin2 N			
CMP	CD117 H	Sca-1 N	Lin2 N	CD16/32 L	CD34 H	CD9 N
GMP	CD117 H	Sca-1 N	Lin2 N	CD 16/32 H	CD34 H	CD9 N
MEP	CD117 H	Sca-1 N	Lin2 N	CD 16/32 L	CD34 L	CD9 N
MKP	CD117 H	Sca-1 N	Lin2 N	CD16/32 L	CD34 L	CD9 H

Lin1: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, TER119

Lin2: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD90.1, CD127, TER119

50 Se proporciona un resumen de marcadores preferidos de superficie celular humana en la siguiente Tabla 2, donde se muestra una indicación aproximada de los niveles de tinción por los colores de las celdas en las tablas: "N" indica ausencia de tinción, "L" indica bajo nivel de tinción y "H" indica tinción intermedia o elevada.

Tabla 2

HSC	CD34 H	CD90 H	Lin1 N		
-----	--------	--------	--------	--	--

CLP	CD34 H	CD127 H	CD10 H	CD38/CD90 N	Lin N
MP	CD34 H	CD90 N	Lin2 N		
CMP	CD34 H	CD90 N	Lin2 N	CD45RA H	CD123 L
GMP	CD34 H	CD90 N	Lin2 N	CD45RA H	CD123 H
MEP	CD34 H	CD90 N	Lin2 N	CD45RA L	CD123 L

Lin1: CD2, CD3, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD56, CD235a

Lin2a: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235a

Lin2b: CD10, CD11b, CD14, CD19, CD235a

5 Actualmente se conocen otros numerosos marcadores de superficie celular adecuados por los especialistas en la técnica, o se identificarán y caracterizarán en su momento, y dichos marcadores encontrarán uso ventajoso en los métodos y composiciones descritos en este documento. Por ejemplo, varios marcadores murinos potenciales adicionales se han identificado recientemente para las diversas poblaciones de células progenitoras mieloides en base al análisis en serie de la expresión de ARNm. Véase, por ejemplo, Iwasaki-Arai, et al. J.Exp.Med. 197:1311-1322 (2003); Akashi, et al. Nature 404:193-197 (2000); Miyamoto, et al. Dev. Cell 3:137-147 (2002); Traver, et al. Blood 98:627-635 (2001); Akashi, et al. Blood 101:383-390 (2003); Terskikh, A., et al. Blood 102:102:94-101 (2003). En base a este mismo tipo de análisis de expresión de ARNm, marcadores de superficie celular adicionales tales como CD110, CD114, CD116, CD117, CD127, y CD135 también pueden encontrar uso para el aislamiento de una o más de las subpoblaciones progenitoras mieloides identificadas en seres humanos, como se describe en Manz, et al. Proc Natl Acad Sci USA 99:11872-11877 (2002).

Para los métodos descritos en este documento, las células para expansión serán células capaces de diferenciarse finalmente en células del linaje mieloides, es decir, granulocitos, macrófagos, megacariocitos, células eritroides, y/o células dendríticas mieloides. Estas incluyen, entre otras, HSC, y células progenitoras mieloides comprometidas CMP, GMP, y MEP. Estas células tendrán las características relevantes, particularmente el potencial de diferenciación y las características de marcadores celulares descritas anteriormente. En una realización, las células iniciales para la expansión comprenden células con fenotipo de marcador CD34⁺. Como el marcador CD34 se encuentra en diferentes tipos de células progenitoras, la población celular inicial para expansión puede ser una mezcla de células progenitoras que expresan CD34. En otra realización, las células son células que comprenden el fenotipo de marcador celular Sca-1^{pos}, un marcador celular encontrado en ratón, y otros roedores. La selección para células Sca-1^{pos} también puede producir una mezcla de células que presentan el fenotipo de marcador celular, aunque también seleccionará principalmente HSC porque las células progenitoras mieloides comprometidas de ratón son Sca-1^{neg}. Por tanto, en otras realizaciones para la expansión de células mieloides de roedor, se usa el fenotipo de marcador celular de Lin^{neg/low}, que incluye HSC, CMP, y GMP.

En un aspecto adicional, las células iniciales para la expansión son células aisladas. Estas incluyen HSC aisladas, que en presencia de la mezcla indicada de citoquinas y factores de crecimiento, se desarrollan en CMP que se expanden adicionalmente en otras células progenitoras del linaje mieloides. En otra realización, las células iniciales para la expansión son CMP con el potencial de diferenciación y fenotipos de marcadores celulares característicos como se ha descrito anteriormente. Las CMP pueden tener capacidad limitada de auto-renovación, y por tanto pueden expandirse para generar CMP adicionales para una cantidad limitada de divisiones celulares también diferenciándose al mismo tiempo en GMP y MEP.

Las células para expansión pueden obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo médula ósea, sangre periférica, sangre umbilical, y otras fuentes conocidas por albergar células progenitoras hematopoyéticas y mieloides, incluyendo hígado, particularmente hígado fetal. La sangre periférica y umbilical es una fuente rica de HSC y células progenitoras. Las células se obtienen usando métodos conocidos y habitualmente practicados en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos para preparar células de médula ósea en Sutherland et al., *Bone Marrow Processing and Purging: A Practical Guide* (Gee, A.P. ed.), CRC Press Inc. (1991)). La sangre de cordón umbilical o la sangre de cordón placentario se obtiene típicamente por punción de la vena umbilical, ya sea a término o pre-término, antes o después del desprendimiento de la placenta (véase, por ejemplo, Turner, C.W. et al., *Bone Marrow Transplant*. 10:89 (1992); Bertolini, F. et al., *J. Hematother*. 4:29 (1995)). Las HSC y las células progenitoras mieloides también pueden obtenerse de sangre periférica por leucoféresis, un procedimiento en que sangre extraída de un sujeto adecuado se procesa por centrifugación de flujo continuo (por ejemplo, separadores de células sanguíneas Cobe BCT Spectra) para retirar los glóbulos blancos mientras que los otros componentes de la sangre se devuelven al donante. Otro tipo de procedimiento de aislamiento es centrifugación a través de un medio de densidad variable, tal como Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Las células se derivan de cualquier especie animal con un sistema hematopoyético, como se describe en líneas generales en este documento. Preferiblemente, los animales adecuados serán mamíferos, incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, roedores, conejos, caninos, felinos, cerdos, caballos, vacas, primates (por ejemplo, seres humanos), y similares. Las células para la expansión pueden obtenerse de un único sujeto, o una pluralidad de sujetos. Una pluralidad se refiere a al menos dos (por ejemplo, más de uno) donantes. Cuando las células obtenidas son de una pluralidad de donantes, sus relaciones pueden ser singénicas, alogénicas, o xenogénicas, como se define en este documento. Una realización preferida de la presente descripción se refiere a una mezcla de células

progenitoras mieloides alogénicas obtenidas mediante los métodos de expansión de este documento, como se describe adicionalmente a continuación. Las células alogénicas pueden expandirse por separado y mezclarse las células después de la expansión, o mezclarse las células antes de la expansión, como se analiza adicionalmente a continuación.

5 Cuando sea aplicable, las células madre y células progenitoras pueden movilizarse desde la médula ósea a la sangre periférica antes de la administración de citoquinas o fármacos al sujeto (véase, por ejemplo Lapidot, T. et al., *Exp. Hematol.* 30:973-981 (2002)). Las citoquinas y quimioquinas capaces de inducir movilización incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (Kiessinger, A. et al., *Exp. Hematol.* 23:609-612 (1995)), factor de células madre (SCF), AMD3100 (AnorMed, Vancouver, Canadá), interleuquina-8 (IL-8), y variantes de estos factores (por ejemplo, pegfilgrastim, darbopoyetina). Combinaciones de citoquinas y/o quimioquinas, tales como G-CSF y SCF o GM-CSF y G-CSF, pueden actuar de forma sinérgica para promover la movilización y pueden usarse para aumentar la cantidad de HSC y células progenitoras en la sangre periférica, particularmente para sujetos que no muestran movilización eficaz con una única citoquina o quimioquina (Morris, C. et al., *J. Haematol.* 120:413-423 (2003)).

Pueden usarse agentes citoablativos para inducir dosis (es decir, dosis citorreductoras) para también movilizar HSC y células progenitoras, y sin útiles solos o en combinación con citoquinas. Este modo de movilización es aplicable cuando el sujeto tiene que experimentar tratamiento mieloablativo, y se realiza antes de la dosis mayor de quimioterapia. Los fármacos citorreductores para la movilización incluyen, entre otros, ciclofosfamida, ifosfamida, etopósido, arabinósido de citosina, y carboplatino (Montillo, M. et al., *Leukemia* 18:57-62 (2004); Dasgupta, A. et al., *J. Infusional Chemother.* 6:12 (1996); Wright, D.E. et al., *Blood* 97:(8):2278-2285 (2001)).

25 Las células para expansión también pueden someterse a selección adicional y purificación, que puede incluir métodos de selección tanto positiva como negativa, para obtener una población sustancialmente pura de células. En un aspecto, la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), también mencionada como citometría de flujo, se usa para clasificar y analizar las diferentes poblaciones celulares. Las células que tienen los marcadores celulares específicos para HSC o una población de células progenitoras se marcan con un anticuerpo, o típicamente una mezcla de anticuerpos, que se unen a los marcadores celulares. Cada anticuerpo dirigido a un marcador diferente se conjuga con una molécula detectable, particularmente un colorante fluorescente que puede distinguirse de otros colorantes fluorescentes acoplados a otros anticuerpos. Se pasa una corriente de células marcadas o "teñidas" a través de una fuente de luz que excita el fluorocromo y se detecta el espectro de emisión de las células para determinar la presencia de un anticuerpo marcado particular. Por detección concurrente de diferentes fluorocromos, también mencionado en la técnica como clasificación celular por fluorescencia multicolor, pueden identificarse células que presentan diferentes conjuntos de marcadores celulares y aislarse de otras células en la población. Otros parámetros FACS incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, dispersión lateral (SSC), dispersión directa (FSC), y tinción con colorante vital (por ejemplo, con yoduro de propidio) permiten la selección de células en base al tamaño y la viabilidad. La clasificación FACS y el análisis de HSC y células progenitoras se describe en, entre otras, las patentes de Estados Unidos N° 5.137.809, 5.750.397, 5.840.580; 6.465.249; Manz, M.G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11872-11877 (2002); y Akashi, K. et al., *Nature* 404(6774):193-197 (2000). Se describen directrices generales sobre la clasificación celular activada por fluorescencia en, por ejemplo, Shapiro, H.M., *Practical Flow Cytometry*, 4ª Ed., Wiley-Liss (2003) y Ormerod, M.G., *Flow Cytometry: A Practical Approach*, 3ª Ed., Oxford University Press (2000).

Otro método para aislar las poblaciones celulares iniciales usa un sustrato sólido o insoluble al cual que se unen anticuerpos o ligandos que interaccionan con marcadores específicos de superficie celular. En técnicas de inmunoadsorción, las células se ponen en contacto con el sustrato (por ejemplo, columna de perlas, matraces, partículas magnéticas) que contiene los anticuerpos y se retira cualquier célula no unida. Las técnicas de inmunoadsorción pueden aumentarse a escala para tratar directamente con las grandes cantidades de células en una recogida clínica. Sustratos adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, plástico, celulosa, dextrano, poliacrilamida, agarosa, y otros conocidos en la técnica (por ejemplo, microperlas Pharmacia Sepharose 6MB). Cuando se usa un sustrato sólido que comprende perlas magnéticas o paramagnéticas, las células unidas a las perlas pueden aislarse fácilmente por un separado magnético (véase, por ejemplo, Kato, K. y Radbruch, A., *Cytometry* 14(4):384-92 (1993); kit de aislamiento directo CD34⁺, Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania). Las separaciones celulares por cromatografía de afinidad típicamente implican pasar una suspensión de células sobre un soporte que alberga un ligando selectivo inmovilizado a su superficie. El ligando interacciona con su molécula diana específica sobre la célula y se captura en la matriz. La célula unida se libera mediante la adición de un agente de elución al tampón de ejecución de la columna y la célula libre se lava a través de la columna y se recoge como una población homogénea. De forma evidente para los especialistas en la técnica, las técnicas de adsorción no se limitan a las que emplean anticuerpos específicos, y pueden usarse adsorción no específica. Por ejemplo, la adsorción a sílice es un procedimiento simple para retirar fagocitos de preparaciones celulares.

FACS y la mayoría de las técnicas de inmunoadsorción por lotes pueden adaptarse a procedimientos de selección tanto positiva como negativa (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.877.299). En selección positiva, las células deseadas se marcan con anticuerpos y se retiran de las restantes células no marcadas/indeseadas. En

selección negativa, las células indeseadas se marcan y retiran. Otro tipo de selección negativa que puede emplearse es el uso de tratamiento con anticuerpo/complemento o inmunotoxinas para retirar las células indeseadas.

Debe entenderse que la purificación de células también incluye combinaciones de los métodos descritos anteriormente. Una combinación típica puede comprender un procedimiento inicial que es eficaz para retirar la mayor parte de células indeseadas y material celular, por ejemplo leucoféresis. Una segunda etapa puede incluir aislamiento de células que expresan un marcador común a una o más de las poblaciones de células progenitoras por inmunoadsorción en anticuerpos unidos a un sustrato. Por ejemplo, perlas magnéticas que contienen anticuerpos anti-CD34 son capaces de unirse y capturar células HSC, CMP, y GMP que expresan habitualmente el antígeno CD34. Una etapa adicional que proporciona mayor resolución de diferentes tipos celulares, tal como clasificación FACS con anticuerpos contra un conjunto de marcadores celulares específicos, puede usarse para obtener poblaciones sustancialmente puras de las células deseadas. Otra combinación puede implicar una separación inicial usando perlas magnéticas unidas con anticuerpos anti-CD34 seguida de una ronda adicional de purificación con FACS.

La determinación del potencial de diferenciación de las células, y por tanto el tipo de células madre o células progenitoras aisladas, se realiza típicamente por exposición de las células a condiciones que permiten el desarrollo en diversas células diferenciadas de forma terminal. Estas condiciones comprenden generalmente una mezcla de citoquinas y factores de crecimiento en un medio de cultivo permisivo para el desarrollo del linaje mielóide o linfóide. Los ensayos de cultivo de formación de colonias dependen del cultivo de las células *in vitro* mediante dilución limitante y la evaluación de los tipos de células que surgen de su desarrollo continuado. Un ensayo común de este tipo se basa en medio de metilcelulosa suplementado con citoquinas (por ejemplo, MethoCult, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá; Kennedy, M. et al., *Nature* 386:488-493 (1997)). Las formulaciones de citoquinas y factores de crecimiento permisivas para la diferenciación en la vía hematopoyética se describen en Manz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(18):11872-11877 (2002); la patente de Estados Unidos N° 6.465.249; y Akashi, K. et al., *Nature* 404(6774): 193-197 (2000)). Las citoquinas incluyen SCF, ligando de FLT-3, GM-CSF, IL-3, TPO, y EPO. Otro ensayo *in vitro* es ensayo celular de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC), que típicamente usa células estromáticas para soportar la hematopoyesis (véase, por ejemplo, Ploemacher, R.E. et al., *Blood*. 74:2755-2763 (1989); y Sutherland, H.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3745 (1995)).

Otro tipo de ensayo adecuado para determinar el potencial de diferenciación de células aisladas se basa en la administración *in vivo* de células en un animal hospedador y evaluación de la repoblación del sistema hematopoyético. El destinatario está inmunocomprometido o es inmunodeficiente para limitar el rechazo y permitir la aceptación de trasplantes celulares alogénicos o xenogénicos. Un sistema animal útil de este tipo es el ratón NOD/SCID (Pflumio, F. et al., *Blood* 88:3731 (1996); Szilvassym S.J. et al., "Hematopoietic Stem Cell Protocol," en *Methods in Molecular Medicine*, Humana Press (2002); Greiner, D.L. et al., *Stem Cells* 16(3):166-177 (1998); Piacibello, W. et al., *Blood* 93(11):3736-3749 (1999)) o ratón Rag2 deficiente (Shinkai, Y. et al., *Cell* 68:855-867 (1992)). Las células originarias de las células infundidas se evalúan por recuperación de las células de la médula ósea, bazo, o sangre del animal hospedador y determinación de la presencia de células que presentan marcadores celulares específicos (es decir, fenotipado de marcadores) típicamente por análisis FACS. La detección de marcadores específicos para las células trasplantadas permite distinguir entre células endógenas y trasplantadas. Por ejemplo, anticuerpos específicos para formas humanas de los marcadores celulares (por ejemplo, antígenos HLA) identifican células humanas cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes adecuados (véase, por ejemplo, Piacibello, W. et al., *supra*).

Las poblaciones iniciales de células obtenidas por los métodos anteriores se usan directamente para expansión o se congelan para su uso en una fecha posterior. Se conoce en la técnica una diversidad de medios y protocolos para congelar células. Generalmente, el medio de congelación comprenderá DMSO de aproximadamente el 5-10%, el 10-90% de albúmina sérica, y el 50-90% de medio de cultivo. Otros aditivos útiles para conservar células incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, disacáridos tales como trehalosa (Scheinkonig, C. et al., *Bone Marrow Transplant*. 34(6):531-6 (2004)), o un expansor de volumen plasmático, tal como hetaalmidón (es decir, hidroxietil almidón). En algunas realizaciones, pueden usarse soluciones de tampón isotónico, tales como solución salina tamponada con fosfato. Una composición crioconservadora ejemplar tiene medio de cultivo celular con HSA al 4%, dimetilsulfóxido (DMSO) al 7,5%, y hetaalmidón al 2%. Otras composiciones y métodos para crioconservación son bien conocidos y se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Broxmeyer, H.E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(2):645-650 (2003)). Las células se conservan a una temperatura final de menos de aproximadamente -135°C.

6.3 Expansión ex vivo de células progenitoras mieloides

La población inicial de células obtenida anteriormente se expande *ex vivo* en cultivo poniendo en contacto las células con un medio que tiene una mezcla de citoquinas y factores de crecimiento permisivos para la expansión de células progenitoras mieloides. Las citoquinas en su contexto natural son típicamente proteínas fabricadas por células que modulan el estado fisiológico de las células, sea la célula otra célula o la célula que produce la citoquina. Las citoquinas fabricadas por los linfocitos a menudo se describen como linfocinas (IL), pero son citoquinas como se define en este documento. Las citoquinas típicamente actúan mediante receptores celulares sobre las células moduladas por la citoquina. Asimismo, los factores de crecimiento en su contexto natural también son compuestos

típicamente fabricados por las células, que afectan a la proliferación y diferenciación de las células, sea la célula otra célula o la célula que produce el factor de crecimiento. Como las citoquinas, los factores de crecimiento generalmente actúan sobre las células mediante receptores. Referencias a una citoquina o factor de crecimiento en la presente descripción, sin embargo, no pretende ser excluyente ya que ciertas citoquinas tienen efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células similares a los factores de crecimiento. Por tanto, las descripciones de citoquinas y factores de crecimiento específicos en este documento reflejan el estado del conocimiento en la técnica y no pretenden limitar el alcance de esta descripción.

Para los métodos de expansión de este documento, se eligen citoquinas y factores de crecimiento para expandir poblaciones de células progenitoras mieloides comprometidas, tales como células CMP, GMP, y MEP. Como estas células tienen capacidad limitada o ausente de auto-renovación, las condiciones de cultivo se eligen para dar soporte a la división de células que se desarrollan en estas células mieloides limitando o minimizando al mismo tiempo el crecimiento y expansión de otros tipos celulares que no son progenitores mieloides comprometidos.

Por consiguiente, las citoquinas para las condiciones de expansión se seleccionan generalmente entre IL-1 (es decir, IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, CM-CSF, y análogos de las mismas. Formas de las citoquinas son productos de origen natural, productos recombinantes, variantes, o formas modificadas que tienen actividad biológica similar a las formas de origen natural tales como, por ejemplo, peptidomiméticos. Las citoquinas también pueden seleccionarse entre el grupo de proteínas de fusión o citoquinas modificadas por ingeniería, incluyendo los ejemplos no limitantes adecuados PIXY321 (Curtis, B. M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991 88,5809-5813) una proteína híbrida sintética de GM-CSF e IL-3, Epo-IL-3 (Lu, L., et al. Exp. Hematol. 1995 23. 1130-1134), IL-2-IL-6 (Zhao, C, et al. Stem Cells 1994, 12, 1130-1134).

La fuente de las citoquinas se elige para que sean activas sobre las células usadas para expansión, y por tanto generalmente reflejarán el origen de las células iniciales usadas para la expansión. Por ejemplo, si las células progenitoras son de origen humano, se usan formas humanas de la citoquina, naturales o recombinantes. Por consiguiente, en una realización, las citoquinas son rhIL-1 humana recombinante, (es decir, rhIL-1 β), rhIL-3, rhIL-6, rhIL-11, rhuG-CSF, rhuGM-CSF, y análogos de las mismas. Sin embargo, la asociación entre la forma de la citoquina y el origen de las células no tiene que ser rigurosa. Por ejemplo, la IL-6 humana es capaz de provocar efectos en células de ratón y rata, aunque IL-6 de ratón no tiene efecto sobre células humanas. Este tipo de reactividad cruzada será evidente para los especialistas en la técnica y puede ensayarse fácilmente por métodos conocidos. La estructura y función de las citoquinas especificadas se referirán a las siguientes descripciones, que reflejan el estado del conocimiento en la técnica.

IL-1 es un grupo de citoquinas que tiene papeles importantes en la regulación positiva y negativa de la inflamación aguda (por ejemplo, activación de células endoteliales y linfocitos), formación y remodelado de huesos, secreción de insulina, e inducción de fiebre. La familia IL-1 de citoquinas comparte una similitud estructural global, que está compuesta por un barril β con un pseudo eje de tres pliegues (véase, por ejemplo, Priestle, J. P. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9667-71 (1989)). Pertinente para los métodos de este documento es la IL-1 β , que típicamente se secreta por macrófagos junto con IL-1 α . Los dos agonistas se obtienen por escisión enzimática de proteínas precursoras (pro-IL-1 α y pro-IL-1 β), y ejercen sus efectos fisiológicos por unión a receptores de IL-1. Las secuencias de aminoácidos y sus secuencias correspondientes de ácido nucleico para IL- β son conocidas a partir de diversas fuentes incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, murina (Telford, J.L. et al., *Nucleic Acids, Res.* 14(24):9955-9963 (1986)); de conejo (Young PR y Sylvester D., *Protein Eng.* 2(7):545-51 (1989)); de rata (Nº de acceso NP 113700 [gi: 13928692]); porcina (Huether, M.J, et al., *Gene* 129(2):285-289 (1993)); bovina (Leong S.R., *Nucleic Acids Res.* 16:9054-9054 (1988)); felina (Daniel, S.L. et al., *Anim. Biotechnol.* 3:117-121 (1992)); equina (Howard, R.D. et al., *Am. J. Vet. Res.* 59:704-711(1998)); humana (March, C.J. et al., *Nature* 315:641 (1985); y humana recombinante (Meyers, C. et al., *J. Biol. Chem.* 262(23):11176-11181 (1987)). Se describen variantes de IL-1 β en Boraschi, D. et al., *Frontiers in Bioscience* 1:270-308 (1995)). También están disponibles diversas formas recombinantes en el mercado (véase, por ejemplo, IL-1 β humana, Promega, Madison, WI, EEUU; IL-1 β murina, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá; y IL-1 β de rata, Chemicon Int., Temacula, CA, USA). Se describen variantes de IL-1 β en, entre otros, Gronenborn, A.M. et al., *Eur. J. Biochem.* 161(1):37-43 (1986); Antoni, Ge et al., *J. Immunol.* 137(10):3201-4 (1986); Palaszynski, E.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147(1):204-11 (1987); y Huang, J.J. et al., *FEBS Lett.* 223(2):294-8 (1987)).

IL-3, también conocida como multi-CSF, es una citoquina/factor de crecimiento celular multilinaje secretado por linfocitos, células epiteliales, y astrocitos, que estimula la proliferación clonal y diferenciación de diversos tipos de células sanguíneas y tisulares, particularmente la diferenciación y función de granulocitos y macrófagos. Se considera uno de los factores de estimulación de colonias hematopoyéticas (véase, por ejemplo, Wagemaker, G. et al., *Biotherapy* 2(4):337-45 (1990)). Se han identificado secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para IL-3 de diversos organismos incluyendo, entre otras, murina (Fung M.-C. et al., *Nature* 307:233-237(1984)); de rata (Cohen, D.R. et al. *Nucleic Acids Res.* 14:3641-3658(1986)); de oveja (McInnes C.J. et al., *Gene* 139:289-290 (1994)); bovina (Mwangi S.M. et al., *Gene* 162:309-312(1995)); de chimpancé/monos (Burger H. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1217:195-198(1994)); y humana (Yang Y.-C. et al., *Cell* 47:3-10 (1986); Otsuka T. et al., *J. Immunol.* 140:2288-

2295(1988)). Se describen variantes de IL-3 en Lopez, A.F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24):11842-6 (1992); Barry, S.C. et al., *J Bio. Chem.* 269(11):8488-92 (1994); y Olins, P.O. et al., *J Biol Chem.* 270(40):23754-60 (1995).

5 Se conoce IL-6 como factor 2 estimulador de células B (BSF-2) e interferón- β 2, y está implicada en la regulación de la diferenciación de células B en células secretoras de inmunoglobulina, inducción de crecimiento de mieloma/plasmacitoma, y diferenciación de células nerviosas. La unión de IL-6 a receptores de IL-6 induce la formación de un complejo de múltiples subunidades que contiene proteína GP130, que es común para la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I. IL-6 parece tener una estructura común compuesta por un haz de cuatro hélices, donde las caras de las hélices interaccionan con el receptor. Se han identificado secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para IL-6 para, entre otras, de ratón (Chiu, CP. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(19):7099-103 (1988); de rata (Northemann, W. et al., *J. Biol. Chem.* 264(27): 16072-82 (1989); de conejo (Perkins, H.D. et al., *Cytokine* 12(6):555-65 (2000)); de oveja (Ebrahimi, B. et al., *Cytokine.* 7(3):232-236 (1995)); bovina (Droogmans, L. et al., *DNA Seq.* 2(6):411-3 (1992)); equina (Swiderski, C.E. et al., *Vet Immunol Immunopathol.* 77(3-4):213-20 (2000)); y humana (Hirano T. et al., *Nature* 324: 73-76 (1986)). Se describen variantes de IL-6 en Dagan, S. et al., *Protein Expr. Purif.* 3(4):290-4 (1992); Zhang, J.G. et al., *Eur J Biochem.* 207(3):903-13 (1992); y Skelly, S.M. et al., *J Biotechnol.* 34(1):79-86 (1994). Se describen formas recombinantes en Stoyan, T. et al., *Eur J Biochem.* 216(1):239-45 (1993); Orita, T. et al., *J Biochem (Tokio)* 115(2):345-50 (1994), y también están disponibles en el mercado.

20 IL-11 pertenece al grupo de IL-6 de citoquinas estructural y funcionalmente relacionadas que, como se ha indicado anteriormente, usan la glucoproteína transmembrana gp130 para ejercer su actividad fisiológica. IL-11 también se conoce como factor inhibidor de adipogénesis (AGIF) y oprelvequina. IL-11 actúa de forma sinérgica con otras citoquinas y factores de crecimiento para estimular la proliferación y diferenciación de células madre en células progenitoras comprometidas y para promover la megacariopoyesis y trombopoyesis. Se observan efectos opuestos de IL-11 *in vivo* e *in vitro* en que potencian el injerto *in vivo* mientras que *in vitro*, IL-11 puede mantener la población primitiva de células madre. Siendo una citoquina de clase 1, también se cree que IL-11 comprende una estructura de haz de cuatro hélices. Se han identificado secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de IL-11 para, entre otras, murina (Morris, J.C. et al., *Exp. Hematol.* 24:1369 (1996); primate (Paul, S.R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(19):7512-6 (1990); y humana (Ohsumi, J. et al., *FEBS Lett.* 288:13 (1991)). Se describen formas recombinantes y variantes de IL-11 en Miyadai, K. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(3):541-2 (1996); Tacken, I. et al., *Eur J Biochem.* 265(2):645-55 (1999).

35 G-CSF o el factor estimulador de colonias de granulocitos actúa induciendo a la médula ósea a producir granulocitos, y promoviendo la supervivencia, proliferación, diferenciación y función de células progenitoras de granulocitos neutrófilos y neutrófilos maduros. Se produce por varios tipos celulares diferentes, tales como células endoteliales y macrófagos. Aunque está en forma de glucoproteína de forma natural, G-CSF en su forma no glucosilada preparado a través de técnicas recombinantes es completamente activo. Estructuralmente, G-CSF está relacionado con la familia de citoquinas de clase 1, como se indica por la presencia de un haz de cuatro hélices alfa (Hill, C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90(11):5167-71 (1993); Lovejoy, B. et al., *J Mol Biol.* 234(3):640-53 (1993). Se han identificado secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para G-CSF para, entre otras, murino (Tsuchiya, M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(20):7633-7 (1986); de rata (Han, S.W. et al., *Gene* 175(1-2):101-4 (1996)); bovino (Heidari, M. y Kehrl, M.E., *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73(2):183-91 (2000); de oveja (O'Brien, P.M., *DNA Seq.* 4(5):339-42 (1994)); felino (Dunham, S.P. y Onions, D.E., *Cytokine* 14(6):347-51 (2001)); porcino (Kulmburg, P. et al., *Gene* 197(1-2):361-5 (1997)); y humano (Nagata, S. et al., *EMBO J.* 5:575-581 (1986)). Se describen formas recombinantes y variantes de G-CSF en Lu, H.S. et al., *Arch Biochem Biophys.* 268(1):81-92 (1989); Kuga, T. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 159(1):103-11 (1989); y Fujii, I. et al., *FEBS Lett.* 410(2-3):131-5 (1997)), y están disponibles en el mercado con la marca filgrastim; lenograstim; pluripoyetina, Neupogen®, granuloquina (Amgen, Thousand Oaks, CA, EEUU), y granocyte (Rhône-Poulenc).

50 GM-CSF o el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos, también conocido como factor 2 estimulador de colonias estimula el crecimiento y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas de diversos linajes, incluyendo granulocitos, macrófagos, eosinófilos y eritrocitos. También es parte de la familia de citoquinas de clase 1, que tiene una estructura de haz de cuatro hélices, y ejerce su efecto fisiológico por unión al receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos. Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico conocidas para GM-CSF incluyen, entre otros, de ratón (Gough, N.M. et al., *Nature* 309:763-767(1984); de oveja (McInnes, C.J. y Haig, M.C.K., *Gene* 105:275-279(1991); bovino (Maliszewski, C.R., *Mol. Immunol.* 25:843-850(1988)); y humano (Cantrell, M.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6250-6254 (1985); Lee, F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(13):4360-4 (1985)). Se describen formas recombinantes y variantes de GM-CSF en DeLamarter, J.F. et al., *EMBO J.* 4(10):2575-81 (1985); Shanafelt A.B. y Kastelein, R.A., *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(13):4872-6 (1989), y están disponibles en el mercado con la marca molgramostim y sargramostim.

65 Los factores de crecimiento para propósitos de expansión se seleccionan entre factor de células madre (SCF o SF), ligando de FLT-3 (FL), trombopoyetina (TPO), eritropoyetina (EPO), y análogos de los mismos. Como con las citoquinas, las formas de los factores de crecimiento son productos de origen natural o son formas recombinantes que tienen actividad biológica similar a los factores de origen natural. Por consiguiente, en una realización, los factores de crecimiento son rhuSCF, rhuFL, rhuTPO, rhuEPO humano recombinante, y análogos de los mismos.

Como con la selección de citoquinas, se eligen factores de crecimiento que son activos sobre las células usadas para expansión, y por tanto generalmente reflejarán el origen de las células iniciales, aunque la asociación no tiene que ser rigurosa, como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, SCF de rata y ratón son activos sobre células humanas, pero la proteína humana es mucho menos activa sobre células de ratón o rata. Este tipo de actividad cruzada será evidente para los especialistas en la técnica y puede ensayarse fácilmente por métodos conocidos. La estructura y función de los factores de crecimiento especificados se referirán a las siguientes descripciones, que reflejan el estado del conocimiento en la técnica y no pretenden ser limitantes.

SCF, también conocido como ligando de c-kit, factor de crecimiento de mastocitos, o factor de Steel, actúa sobre múltiples niveles de la jerarquía hematopoyética para promover supervivencia, proliferación, diferenciación, adhesión y activación funcional celular en combinación con otras citoquinas. Es de particular importancia en los linajes mieloides, particularmente en el desarrollo de mastocitos, pero también actúa sobre células madre multipotentes y progenitoras, megacariocitos, y un subconjunto de progenitores linfoides (Broudy, V.C., *Blood* 90(4): 1345-1364 (1997)). SCF ejerce sus efectos biológicos por unión a su receptor, C-KIT. SCF de origen natural se sintetiza por células estromáticas de médula ósea como una forma transmembrana o una forma soluble, ambas cuales son biológicamente activas. La estructura global de SCF tiene un plegamiento de haz de cuatro hélices anti-paralelo (Zhang, Z. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14):7732-7 (2000)). Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico conocidas para SCF incluyen, entre otros, murino (Lyman, S.D. et al., *Cell* 75(6):1157-67 (1993)), de rata (Martin, F.H. et al., *Cell* 63(1):203-11 (1990)); felino (Dunham, S.P. y Onions, D.E., *DNA Seq.* 6(4):233-7 (1996); de oveja (McInnes, C.J. et al., *Cytokine* 11(4):249-56 (1999)); canino (Shin, I.S. et al., *J Vet Sci.* 2(3):159-66 (2001)); y humano (Martin, F.H. et al., *supra*). Se describen SCF recombinantes y variantes en Jones, M.D. et al., *J. Biol. Chem.* 271:11301 (1996); Lu, H.S. et al., *J. Biol. Chem.* 271:11309 (1996); Langley, K.E. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 295:21 (1992); Lev, S. et al., *Mol Cell Biol.* 13(4):2224-34 (1993); y Langley, K.E. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 311:(1):55-61 (1994).

El "ligando de FLT-3", también conocido como "FL" o "citoquina SL" o "ligando de tirosina quinasa 3 relacionada con FMS" es un factor que se une al receptor flt-3 (también, "ACD135" o "Aflk2"), una molécula de receptor tirosina quinasa generalmente encontrada en células madre hematopoyéticas y células progenitoras primitivas, incluyendo células CD34+. Actúa en sinergia con otros factores tales como CD117 (c-kit) para estimular la proliferación de células madre hematopoyéticas *in vitro* y estimular la expansión y movilización de células progenitoras *in vivo* (Lyman, S.D. y Williams, D.E., *Curr. Opin. Hematol.* 2(3):177-81 (1995)). Tanto el ligando de FLT-3 de longitud completa (compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular) como un dominio extracelular soluble son biológicamente activos (Lyman, S.D. et al., *Cell* 75:1157 (1993); Lyman, S.D. et al., *Blood* 83:2795 (1994)). Preferiblemente, el ligando de FLT-3 es la forma soluble que contiene la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de longitud completa. La estructura del ligando de FLT-3 soluble revela la presencia de dos haces alfa-helicoides de cadena corta, similares a SCF y G-CSF (Savvides, S.N. et al., *Nat. Struct. Biol.* 7(6):486-91 (2000)). Se han identificado secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de FL para, entre otros, murinos (Rosnet, O. et al., *Oncogene.* 6(9):1641-50 (1991); felinos (Yang S. y Sim, G.K., *DNA Seq.* 11(1-2):163-6 (2000); caninos (Yang, S., *supra*); y seres humanos (Rosnet, O. et al., *Blood.* 82(4):1110-9 (1993)). Se describen formas recombinantes y variantes del ligando de FLT-3 en, entre otros, Sudo, Y. et al., *Blood* 89:3186 (1997) y McClanahan, T. et al., *Blood* 88:3371-3382 (1996)).

La trombopoyetina o "TPO", también conocida como factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (MGDF) o ligando de c-Mpl, estimula la proliferación y diferenciación de megacariocitos, y por tanto potencia la producción de plaquetas *in vitro* e *in vivo* (véase, por ejemplo, Lok, S. et al., *Stem Cells* 12(6):586-98 (1994)). La TPO ejerce sus efectos mediante la unión a un receptor de superficie celular específico codificado por el proto-oncogén c-mpl. Como con muchas otras citoquinas y factores de crecimiento, la TPO se caracteriza por la presencia de un plegamiento de haz de cuatro hélices antiparalelas (Feese, M.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(7):1816-21 (2004)). Se conocen secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para trombopoyetina para, entre otros, murinos (Lok, S., *Nature* 369 (6481):565-568 (1994)); ratas (Ogami, K. et al., *Gene* 158(2):309-10 (1995)); y seres humanos (Foster, D.C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(26):13023-13027 (1994); Bartley, T.D. et al., *Cell* 77 (7):1117-1124 (1994)). Se describen formas recombinantes y variantes de TPO en, entre otros, Souryi, M. et al., *Cell* 63:1137-1147 (1990); Gurney, A.L. et al., *Blood* 85(4):981-8 (1995); Wada, T. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 213(3):1091-8 (1995); Park, H. et al., *J Biol Chem.* 273(1): 256-61 (1998); y Jagerschmidt, A. et al., *Biochem. J.* 333 (Pt 3):729-34(1998).

La eritropoyetina o EPO regula la producción de glóbulos rojos estimulando la expansión y maduración del desarrollo de eritrocitos y megacariocitos inmaduros (véase, por ejemplo, Fisher, J.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216(3):358-69 (1997)). Ejerce su efecto por unión al receptor de EPO. Aunque el sitio principal para la síntesis de EPO es la corteza renal del riñón, se sintetizan niveles inferiores de EPO por el hígado y los macrófagos de la médula ósea. La EPO es estructuralmente similar a la TPO, caracterizada por la presencia de un haz de cuatro hélices (Feese, M.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(7):1816-21 (2004)). Se conocen secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para EPO para, entre otros, ratón (Shoemaker, C.B. y Mitscock, L.D. et al., *Mol Cell Biol.* 6(3):849-58 (1986)); rata (Nagao, M. et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1171(1):99-102 (1992)); oveja (Fu, P. et al., *Mol Cell Endocrinol.* 93(2):107-16 (1993); canino (Wen, D. et al., *Blood* 82(5): 1507-16 (1993)); bovino (Suliman, H.B. et al., *Gene* 171(2):275-80 (1996)); conejo (Vilalta A. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 284(3):823-7 (2001)); porcino (Wen, D. et al., *supra*; David, R.B. et al., *Domesi. Anim. Endocrinol.* 20(2): 137-47 (2001); mono (Lin, F.K. et al., *Gene.*

44(2-3):201-9 (1986)); y ser humano (Lin, F.K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (22): 7580-7584 (1985); Gasson, J.C. et al., *Nature* 315(6022):768-71 (1985)). Se describen formas recombinantes y variantes de EPO en Barbone, F.P. et al., *Nephrol Dial Transplant.* 14 Supl. 2:80-4 (1999); Boissel, J.P. et al., *J. Biol. Chem.* 268(21):15983-93 (1993). La EPO está disponible en el mercado con las marcas Epogen® (Amgen, Thousand Oaks, CA, EEUU), Epogin® (Chugai Pharmaceuticals, Japón), Eprex® (Janssen-Cilag, Saunderton, RU), Recormon® (Roche, Basel, Suiza), y Procrit® (Ortho Biotech., Bridgeagua, NJ, EEUU).

Las variantes usadas en este documento incluyen sustituciones, deleciones, inserciones de cualquier aminoácido en la secuencia de citoquina o factor de crecimiento, donde la variante retiene la actividad biológica asociada con cada citoquina o factor de crecimiento. Pueden hacerse sustituciones de uno o más restos de aminoácido conservando al mismo tiempo la actividad biológica, y típicamente implica la sustitución de un aminoácido con un aminoácido homólogo, también mencionada en este documento como "sustitución conservativa". En algunos casos, también pueden hacerse sustituciones no conservativas. Los aminoácidos homólogos pueden clasificarse en base al tamaño de la cadena lateral y el grado de polarización incluyendo, no polares pequeños (por ejemplo, cisteína, prolina, alanina, treonina); polares pequeños (por ejemplo, serina, glicina, aspartato, asparagina); polares intermedios (por ejemplo, tirosina, histidina, triptófano); no polares grandes (por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, valina). Los aminoácidos homólogos también pueden agruparse del siguiente modo: grupos R polares no cargados (por ejemplo, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina); aminoácidos ácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); y aminoácidos básicos (lisina, arginina, e histidina). Ejemplos de variantes conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, o metionina por otro; la sustitución de un resto polar por otro resto polar, tal como sustitución de una arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina; y la sustitución de un aminoácido hidroxilado serina o treonina por otro.

Las deleciones varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos, aunque en algunos casos, las deleciones pueden ser mucho más grandes, particularmente cuando la citoquina o factor de crecimiento tiene dominios estructurales y/o funcionales físicamente separables. Por ejemplo, una variante de FL es el dominio extracelular escindido que, como se ha analizado anteriormente, retiene la actividad biológica cuando se separa de las secuencias que contienen los dominios transmembrana y citoplásmico. Además, pueden añadirse aminoácidos al extremo amino o carboxi, o en las secuencias de aminoácidos que unen dominios estructurales, tales como una región peptídica que une hélices alfa o láminas beta presentes en la citoquina o factor de crecimiento. Las variantes para cada una de las citoquinas y factores de crecimiento serán evidentes para los especialistas en la técnica, de los cuales se han dado anteriormente referencias ejemplares.

Se eligen combinaciones de citoquinas y factores de crecimiento para expandir las células progenitoras mieloides comprometidas limitando al mismo tiempo la expansión de HSC y restringiendo la producción de células diferenciadas de forma terminal del linaje mieloides. En una realización, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición básica SCF, FL, y TPO. Esta mezcla de citoquinas y factores de crecimiento permite la expansión limitada de HSC y es permisiva para la diferenciación de HSC y otras células progenitoras en MP incluyendo, entre otras, CMP, GMP, y MEP.

En un aspecto adicional, la composición básica se suplementa con una citoquina adicional, incluyendo IL-3, IL-6, o IL-11, o combinaciones de las mismas. Por tanto, en una realización, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición SCF, FL, TPO, e IL-3, una mezcla de citoquinas que parece expandir de forma eficaz células progenitoras mieloides humanas. En otra realización, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición SCF, FL, TPO, e IL-6, una mezcla de citoquinas que parece expandir de forma eficaz células progenitoras mieloides murinas. En otra realización más, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición SCF, FL, TPO, IL-6, e IL-11.

En casos donde se desean células más maduras del linaje mieloides para potenciar la protección inmediata contra neutropenia y/o trombocitopenia, se añade la citoquina G-CSF o GM-CSF a las anteriores mezclas de citoquinas. Esto puede hacerse después del periodo inicial de crecimiento en medio que carece de G-CSF o GM-CSF para permitir la expansión de células progenitoras mieloides más primitivas antes de promover la diferenciación en las células progenitoras que están más avanzadas en el linaje mieloides.

Debe entenderse que pueden usarse diferentes mezclas de citoquinas y factores de crecimiento anteriores para favorecer la expansión de células progenitoras especificadas. La expansión preferente de ciertas poblaciones celulares es deseable si las células tienen que usarse para tratar una única afección o una combinación de afecciones (por ejemplo, neutropenia y trombocitopenia), y la duración del efecto terapéutico dado. Por ejemplo, la presencia de CMP proporcionará mejora prolongada tanto de neutropenia como de trombocitopenia ya que las CMP son capaces de diferenciarse en granulocitos, macrófagos, megacariocitos, y células eritroides. Por otro lado, una población celular que tenga una proporción significativa de GMP, en comparación con CMP y MEP, proporcionará mejora de neutropenia pero tendrá menos impacto terapéutico sobre trombocitopenia ya que las GMP se diferencian en granulocitos y macrófagos pero no en megacariocitos. A la inversa, una población celular que tenga una proporción significativa de MEP, en comparación con CMP y GMP, proporcionará mejora de trombocitopenia pero

tendrá menor impacto terapéutico sobre neutropenia ya que las MEP se diferencian en células eritroides y megacariocitos pero no en granulocitos y macrófagos.

5 La cantidad de citoquinas y factores de crecimiento en el medio de expansión es la cantidad suficiente para dar
 10 soporte a la expansión de células progenitoras mieloides a los niveles especificados en el cultivo celular. Como
 realizaciones representativas, se usa SCF en una cantidad suficiente para dar soporte a la expansión, generalmente
 15 en la cantidad de al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 ng/ml, y preferiblemente de
 aproximadamente 50 a aproximadamente 100 ng/ml. Se usa FL en una cantidad suficiente para dar soporte a la
 20 expansión, generalmente en la cantidad de al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 ng/ml, y
 preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 ng/ml. Se usa TPO en una cantidad suficiente
 para dar soporte a la expansión, generalmente en la cantidad de al menos aproximadamente 0,5 a
 25 aproximadamente 500 ng/ml, y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 ng/ml. Se usa IL-1 en
 una cantidad suficiente para dar soporte a la expansión, generalmente en la cantidad de al menos aproximadamente
 1 a aproximadamente 100 ng/ml, y preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 ng/ml. Se usa
 IL-3 en una cantidad suficiente para dar soporte a la expansión, generalmente en una cantidad de al menos
 aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ng/ml, y preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente
 50 ng/ml. Se usa IL-11 en una cantidad suficiente para dar soporte a la expansión, generalmente en la cantidad de al
 menos aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ng/ml, y preferiblemente de aproximadamente 10 a
 aproximadamente 50 ng/ml. Se usa G-CSF en una cantidad suficiente para dar soporte a la expansión,
 generalmente en la cantidad de al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 ng/ml, y preferiblemente de
 aproximadamente 10 a aproximadamente 100 ng/ml. Se usa GM-CSF en una cantidad suficiente para dar soporte a
 la expansión, generalmente en la cantidad de al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ng/ml, y
 preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 ng/ml. Cuando se usa, EPO se usa en una
 cantidad suficiente para dar soporte a la expansión, generalmente en la cantidad de al menos aproximadamente 1 a
 aproximadamente 30 U/ml, y preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 U/ml. Como guía
 general, la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento reforzará el crecimiento de células progenitoras mieloides
 limitando al mismo tiempo la expansión de células madre hematopoyéticas.

30 La expansión de células progenitoras mieloides se realiza en un medio basal, que se suplementa con la mezcla de
 citoquinas y factores de crecimiento descrita anteriormente, suficiente para dar soporte a la expansión de células
 progenitoras mieloides. El medio basal comprenderá aminoácidos, fuentes de carbono (por ejemplo, piruvato,
 glucosa, etc.), vitaminas, proteínas séricas (por ejemplo, albúmina), sales inorgánicas, cationes divalentes,
 35 antibióticos, tampones, y otros componentes definidos preferiblemente que dan soporte a la expansión de células
 progenitoras mieloides. Los medios basales adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, medio RPMI,
 medio de Iscove, medio esencial mínimo, medio de Eagle modificado por Dulbecco, y otros conocidos en la técnica
 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.733.746). Medios basales disponibles en el mercado
 incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, Stemline™ (Sigma Aldrich), StemSpan™ (StemCell Technologies,
 40 Vancouver, Canadá), Stempro™ (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EEUU) HPGM™ ((Cambrex,
 Walkersville, MD, EEUU), QBSF™ (Quality Biological, Gaithersburg, MD, EEUU), X-VIVO (Cambrex Corp.,
 Walkersville, MD, EEUU) y Mesencult™ (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Las formulaciones de estos y
 otros medios serán evidentes para los especialistas en la técnica.

45 La población inicial de células se pone en contacto con la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento en el medio
 basal, y se cultiva para expandir la población de células progenitoras mieloides. La expansión se hace durante
 aproximadamente 2 días a aproximadamente 14 días, preferiblemente de aproximadamente 4 días a 10 días, más
 preferiblemente de aproximadamente 4 días a 8 días y/o hasta obtener el factor de expansión indicado y las
 poblaciones celulares características.

50 En una realización, la preparación de cultivo celular final se caracteriza por una población celular CMP que se
 expande a al menos aproximadamente 0,5 veces, aproximadamente 1 vez, aproximadamente 5 veces,
 aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, o preferiblemente al menos aproximadamente 30 veces.
 En el cultivo final, la población celular mieloides comprenderá CMP que son al menos aproximadamente el 0,5%, al
 menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 2%, al menos aproximadamente el 5%, y al menos
 55 aproximadamente el 10% de las células totales en el cultivo.

En otra realización, la preparación de cultivo celular final se caracteriza por una población celular GMP que se
 expande al menos aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 40 veces, y
 preferiblemente al menos aproximadamente 80 veces. En el cultivo final, la población celular mieloides comprenderá
 60 GMP que son al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente
 el 30%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 50% de las células totales en el cultivo. Por tanto, en
 realizaciones preferidas, las poblaciones celulares se expanden hasta enriquecerse preferentemente para células
 GMP.

65 En una realización adicional más, las preparaciones de cultivo celular final se caracterizan por una población celular
 MEP que se expande al menos aproximadamente 0,1 veces, aproximadamente 1 vez, aproximadamente 2 veces,
 aproximadamente 5 veces, y preferiblemente aproximadamente 10 veces. En los cultivos finales, la población celular

mieloide comprenderá MEP que son al menos aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 5% de las células totales en el cultivo.

5 Generalmente, en el cultivo final, la expansión de células con características HSC se limitará a menos de aproximadamente 25 veces, preferiblemente menos de aproximadamente 15 veces, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10 veces, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente 5 veces. Generalmente, la cantidad de células HSC será menor de la cantidad total de células progenitoras mieloides (es decir, CMP, GMP, y MEP) en cultivo.

10 Aunque es menos preferido por razones prácticas, en algunos casos, pueden usarse medios de cultivo más indefinidos que incluyen células de alimentación para aproximarse al microentorno en la médula ósea donde sucede la hematopoyesis. Las células estromáticas de la médula ósea, las células endoteliales, y las células mesenquimáticas pueden producir factores que dan soporte al desarrollo y mantenimiento de células hematopoyéticas en cultivo, y pueden usarse para la expansión de células progenitoras mieloides. Los cultivos de células de alimentación también pueden suplementarse con la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento descrita anteriormente para promover la expansión celular y desarrollo de células progenitoras mieloides específicas. Los cultivos basados en células de alimentación se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.879.940; Dexter, T.M. et al., *J. Cell Physiol.* 91:335-344 (1976); Okubo, T. et al., *Cell Structure and Function* 25:133-139 (2000); Shapiro, F. et al., *J Hematother* 5(6):655-62 (1996); Coutinho, L.H. et al., "Clonal and long term bone marrow cultures using human bone marrow," en *Haematology: A Practical Approach*, Testa, N.G. y Molineux, G. eds., Oxford University, Oxford, RU (1992). Típicamente, se cultivan células mononucleares de médula ósea en medio adecuado (por ejemplo, medio de Dulbecco modificado por Iscove) hasta que se forma una capa de células estromáticas. Los cultivos después se irradian y siembran con la población inicial de células usadas para expansión.

25 Otro método basado en cultivos de células de alimentación se describe en Feugier, P. et al., *J Hematother Stem Cell Res* 11 (1):127-38 (2002)). Esta técnica usa células endoteliales de médula ósea inmortalizadas modificadas para expresar citoquinas y factores de crecimiento suficientes para dar soporte al crecimiento de HSC y/o células progenitoras. Los vectores de expresión recombinantes que codifican las citoquinas y factores de crecimiento especificados se introducen en la línea celular inmortalizada, y las células se cultivan para generar la capa de células endoteliales que producen factor. Las células después se irradian y el cultivo se siembra con células usadas para la expansión. Generalmente, las HSC y las células progenitoras son débilmente adherentes o no adherentes en estas condiciones de cultivo, lo que permite retirar por lavado las células expandidas de las células endoteliales. Para los propósitos de este documento, los genes de citoquinas y factores de crecimiento introducidos en las células inmortalizadas reflejarán las combinaciones suficientes para dar soporte a la expansión de las células progenitoras mieloides comprometidas. Por consiguiente, en una realización, los genes de citoquinas se seleccionan entre aquellos que codifican IL-1 (es decir, IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, o CM-CSF, o CM-CSF. Asimismo, los genes de factores de crecimiento se seleccionan entre aquellos que codifican SCF, FL, TPO, y EPO.

40 De acuerdo con lo anterior, en una realización, se introducen vectores de expresión que comprenden genes que codifican SCF, FL, y TPO en las células de alimentación. En una realización adicional, se usa un vector de expresión que comprende genes que codifican una citoquina adicional, incluyendo IL-3, IL-6, o IL-11, o combinaciones de las mismas, con la combinación de factores de crecimiento. Por tanto, en una realización, los genes introducidos en las células de alimentación codifican SCF, FL, TPO, e IL-3. En una realización adicional, los genes introducidos en las células codifican SCF, FL, TPO, e IL-6. En una realización adicional más, los genes codifican SCF, FL, TPO, IL-6, e IL-11. Las secuencias génicas se eligen para expresar formas de citoquina y factor de crecimiento que sean activas sobre las células usadas para expansión, y por tanto generalmente reflejarán el origen de las células iniciales usadas para la expansión. Por ejemplo, si las células progenitoras son de origen humano, se usan secuencias de ácido nucleico que codifican formas humanas de la citoquina. Cuando las células para expansión son de origen murino, se usan secuencias de ácido nucleico que codifican formas murinas u otras formas de roedor de la citoquina. Las secuencias de ácido nucleico que pueden usarse incluyen aquellas que codifican formas recombinantes o variantes conocidas en la técnica. Serán evidentes para los especialistas en la técnica otras diversas combinaciones génicas suficientes para dar soporte a la expansión de células progenitoras mieloides.

55 Las células expandidas por los métodos anteriores se usan sin purificación adicional, o se aíslan en diferentes poblaciones celulares por diversas técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de inmunoafinidad, inmunoadsorción, clasificación FACS, u otros procedimientos como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, se usa clasificación FACS o inmunoadsorción. Por ejemplo, una estrategia de selección FACS tiene una selección inicial de células vivas basada en parámetros característicos de dispersión directa (tamaño de célula) y dispersión lateral (densidad de célula), y una segunda selección para la expresión de marcadores celulares para células progenitoras mieloides o células no mieloides (por ejemplo, Sca-1^{neg} c-kit^{hi}).

60 Las poblaciones celulares aisladas pueden comprender células progenitoras mieloides comprometidas aisladas, CMP aisladas, GMP aisladas, MEP aisladas, como se define en este documento. En algunas situaciones, se prepara una población celular no mieloide aislada por retirada de células mieloides comprometidas del cultivo expandido. Las células aisladas generalmente son poblaciones sustancialmente puras de células, y típicamente tendrán al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 75-80%, más preferiblemente al menos

aproximadamente el 85-90%, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de las células indicadas con el fenotipo de marcadores celulares y potencial de diferenciación característicos.

6.4 Mezclas alogénicas de células progenitoras mieloides

Como se ha analizado anteriormente, para proporcionar cantidades suficientes de células con propósitos de tratamiento, y para posibilitar la producción de un producto clínico comercialmente factible, las poblaciones celulares son preferiblemente una mezcla de células progenitoras mieloides alogénicas obtenidas de una pluralidad de donantes alogénicos. Aunque existe la posibilidad de una respuesta inmune contra las células terapéuticas desiguales con el MHC del destinatario, la presente terapia pretende proporcionar protección temporal en oposición a la protección más permanente producida por la reconstitución de la hematopoyesis por HSC.

De forma significativa, como se describe en este documento, la posibilidad de GVHD se minimiza enormemente usando células progenitoras mieloides comprometidas aisladas que están agotadas de células linfoides maduras. En una realización, esto se consigue por retirada de dichas células de la población celular expandida antes de la administración. En una realización alternativa y preferida, esto se consigue partiendo con una población sustancialmente pura de HSC CD34+ CD90+.

Las mezclas de células alogénicas incluyen, mezclas de células progenitoras mieloides alogénicas, mezclas de CMP aisladas, mezclas de GMP aisladas, mezclas de MEP aisladas, o combinaciones de las mismas. Las células en la mezcla pueden ser células alogénicas completamente coincidentes, alogénicas parcialmente desiguales, y/o alogénicas totalmente desiguales con respecto al MHC del destinatario del trasplante, y pueden ser de donantes relacionados, habitualmente hermanos con los mismos alelos parentales, o donantes no relacionados. La determinación del grado de disparidad del MHC empleará ensayos convencionales conocidos y usados en la técnica.

Por ejemplo, existen al menos seis categorías principales de genes MHC en seres humanos, identificadas como importantes en la biología de trasplantes. HLA-A, HLA-B, HLA-C codifican las proteínas HLA de clase I mientras que HLA-DR, HLA-DQ, y HLA-DP codifican las proteínas HLA de clase II. Genes dentro de cada uno de estos grupos son altamente polimórficos, como se refleja en los numerosos alelos o variantes de HLA encontrados en la población humana, y diferencias en estos grupos entre individuos se asocian con la fuerza de la respuesta inmune contra células trasplantadas. Métodos convencionales para determinar el grado de coincidencia del MHC examinan alelos dentro de los grupos HLA-B y HLA-DR, o HLA-A, HLA-B y HLA-DR. Por tanto, se hacen ensayos de al menos 4, y preferiblemente al menos 6 antígenos MHC dentro de los dos o tres grupos HLA, respectivamente.

En ensayos serológicos de MHC, se hacen reaccionar anticuerpos dirigidos contra cada tipo de antígeno HLA con células de un sujeto (por ejemplo, donante) para determinar la presencia o ausencia de ciertos antígenos MHC que reaccionan con los anticuerpos. Esto se compara con el perfil de reactividad del otro sujeto (por ejemplo, destinatario). La reacción del anticuerpo con un antígeno MHC se determina típicamente incubando el anticuerpo con células, y después añadiendo el complemento para inducir la lisis celular (es decir, ensayo de linfocitotoxicidad). La reacción se examina y clasifica de acuerdo con la cantidad de células lisadas en la reacción (Mickelson, E. y Petersdorf, E.W., *Hematopoietic Cell Transplantation*, Thomas, E.D. et al. eds., pág. 28-37, Blackwell Scientific, Maiden, MA (1999). Otros ensayos basados en células incluyen citometría de flujo usando anticuerpos marcados o inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA).

Los métodos moleculares para determinar el tipo de MHC generalmente emplean sondas y/o cebadores sintéticos para detectar secuencias génicas específicas que codifican la proteína HLA. Pueden usarse oligonucleótidos sintéticos como sondas de hibridación para detectar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción asociados con tipos particulares de HLA (Vaughn, R.W., *Methods in Molecular Biology: MHC Protocols* 210:45-60 (2002)). Como alternativa, pueden usarse cebadores para amplificar las secuencias HLA (por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa o reacción en cadena de ligamiento), cuyos productos pueden examinarse adicionalmente por secuenciación directa de ADN, análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), o hibridación con una serie de cebadores oligonucleotídicos específicos de secuencia (SSOP) (Petersdorf, E.W. et al., *Blood* 92(10):3515-20 (1998); Morishima, Y. et al., *Blood* 99(11):4200-6 (2002); y Middleton, D. y Williams, F., *Methods in Molecular Biology: MHC Protocols* 210:67-112 (2002)).

Aunque la descripción de "alogénico coincidente" o "alogénico desigual" se da para el MHC humano, debe entenderse que puede realizarse un análisis similar para MHC para diversas especies animales. Estas incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, ratón, rata (Gill, T.J. et al., *Transplant Proc.* 27(2): 1495-500 (1995)), vaca (Lewin, H.A. et al., *Immunol Rev.* 167:145-58 (1999)), canino (Wagner, J.L. et al., *J. Hered.* 90(1):35-8 (1999)), felino (O'Brien, S.J. y Yuhki, N., *Immunol Rev.* 167:133-44 (1999)), cerdo (Chardon, P. et al., *Genet Sel Evol.* 32(2):109-28 (2000)), caballo (Kydd, J. et al., *Vet Immunol Immunopathol.* 42(1):3-60 (1994)), y primate (Heise, E.R. et al., *Genetica* 73(1-2):53-68 (1987)).

Las mezclas de células progenitoras mieloides alogénicas pueden tener grados variables de coincidencia en el MHC. Por tanto, en una realización, pueden aislarse células progenitoras que experimentan injerto temporal y

diferenciación de un donante que tenga un grado mayor de coincidencia del MHC con el destinatario que las células pretendidas para proporcionar un beneficio terapéutico más inmediato. Por ejemplo, las CMP pueden ser un donante que tenga una coincidencia completa o parcial con el MHC del destinatario, mientras que las GMP y MEP pueden ser de donantes desiguales. Otras combinaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica.

Las mezclas alogénicas de células pueden prepararse de diversos modos. En una realización, se obtienen células de diferentes donantes y se mezclan antes de su expansión en cultivo. En otra realización, se expanden células progenitoras mieloides de diferentes donantes por separado y después se mezclan después de la expansión para generar las mezclas de células progenitoras alogénicas. En otro aspecto, las mezclas de células alogénicas se preparan a partir de células no expandidas obteniendo células progenitoras mieloides de diferentes donantes y mezclando las células antes de su inclusión en el destinatario. Se usen células expandidas o no expandidas, se demuestra en las realizaciones de este documento que las células progenitoras mieloides alogénicas son eficaces para proteger a sujetos mamíferos con hematopoyesis comprometida de afecciones neutropénicas y/o trombocitopénicas potencialmente letales.

6.5 Células progenitoras mieloides crioconservadas

Sorprendentemente, como se demuestra por primera vez en este documento, la población expandida de células descrita en este documento puede crioconservarse y almacenarse para uso futuro y aún retendrá su funcionalidad. Como se ha descrito anteriormente, se conoce en la técnica una diversidad de medios y protocolos para congelar células. Generalmente las células se concentran, suspenden en un medio suplementado con un crioprotector y/o estabilizante, se congelan y almacenan a una temperatura de 0°C o menos. En algunas realizaciones, las células se almacenan a -70°C o menos, por ejemplo, -80°C, o en nitrógeno líquido o en fase de vapor de nitrógeno líquido. Las células pueden almacenarse en cualquier crioprotector conocido en la técnica. Por ejemplo, el crioprotector puede ser dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol. En algunas realizaciones, el medio de congelación comprende DMSO aproximadamente al 5-10%, albúmina sérica al 10-90%, y medio de cultivo al 50-90%. En algunas realizaciones, el medio de crioconservación comprenderá DMSO aproximadamente al 7,5%, albúmina sérica aproximadamente al 42,5%, y medio de cultivo aproximadamente al 50%. Las células pueden almacenarse en cualquier estabilizante conocido en la técnica. Por ejemplo, el estabilizante puede ser metilcelulosa o suero.

Antes de la congelación, las células pueden repartirse en varios recipientes diferentes para crear un banco de células. Las células pueden almacenarse, por ejemplo, en un vial o tubo de vidrio o plástico o una bolsa. Cuando las células se necesitan para uso futuro, puede seleccionarse una parte de las células crioconservadas (de uno o más recipientes) del banco de células, descongelarse y usarse.

6.6 Tratamiento

Las células preparadas por los métodos descritos en este documento se usan para el tratamiento de diversos trastornos relacionados con deficiencias en la hematopoyesis causadas por enfermedad o tratamientos mieloablativos. Como se usa en este documento, "tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico o profiláctico, o una medida supresora para la enfermedad, trastorno o afección indeseable. Tratamiento abarca la administración de las presentes células en una forma apropiada antes de la aparición de síntomas de enfermedad y/o después de manifestaciones clínicas, u otras manifestaciones de la enfermedad o afección para reducir la gravedad de la enfermedad, detener la progresión de la enfermedad, o eliminar la enfermedad. La prevención de la enfermedad incluye prolongar o retardar la aparición de síntomas del trastorno o enfermedad, preferiblemente en un sujeto con susceptibilidad aumentada al trastorno.

Las afecciones adecuadas para tratamiento con las células descritas en este documento incluyen neutropenia, una afección caracterizada por disminución en la cantidad de neutrófilos en circulación, y trombocitopenia, una afección caracterizada por niveles inferiores a los normales de plaquetas en la sangre periférica. Ambas afecciones pueden ser el resultado de trastorno adquirido o hereditario.

El desarrollo defectuoso de células madre hematopoyéticas que se sabe que crea bajas cantidades de neutrófilos incluye, entre otros, disgenesia reticular, anemia Fanconi, síndrome de Chediak-Higashi, y neutropenia cíclica. Para trombocitopenia, los bajos niveles de plaquetas se manifiestan en, entre otros, síndrome de Wiskott-Aldrich, trombocitopenia con radios ausentes (TAR), y lupus sistémico eritematoso. Existen formas adquiridas de neutropenia y trombocitopenia en circunstancias similares, tales como con malignidades hematológicas, deficiencia de vitaminas, exposición de radiación ionizante, infecciones víricas (por ejemplo, mononucleosis, CMV, VIH, etc.), y después de tratamiento con diversos fármacos citotóxicos.

Para los presentes propósitos, las células pueden usarse de forma profiláctica para reducir la aparición de neutropenia y trombocitopenia, y sus complicaciones asociadas, particularmente para atenuar la infección por patógenos oportunistas en pacientes que se han tratado con agentes mieloablativos o han experimentado HSCT. En el entorno de trasplante, pueden usarse células mieloides de forma concurrente o posterior al trasplante de células madre hasta que los destinatarios poseen HSC o las HSC trasplantadas empiezan a restaurar la hematopoyesis y elevan los niveles de neutrófilos y plaquetas suficientemente. La infusión de células progenitoras mieloides aumenta

la cantidad de neutrófilos y megacariocitos en el sujeto tratado, proporcionando de este modo protección temporal pero necesaria durante el periodo neutropénico o trombocitopénico. El uso de poblaciones de células progenitoras mieloides, en oposición a neutrófilos y plaquetas más diferenciadas, proporciona protección de mayor duración a causa del injerto temporal de progenitores mieloides y su diferenciación *in vivo*.

Además, las células que comprenden una mezcla de CMP, GMP, y MEP tienen la capacidad de generar un efecto terapéutico más amplio que la protección producida por infusión de una población cualquiera de células únicas. Esto surge del rápido efecto sobre los niveles de neutrófilos y/o plaquetas a partir de los progenitores más diferenciados en la población celular mientras los progenitores mieloides comprometidos más primitivos se injertan y desarrollan en el tiempo para suministrar los neutrófilos y megacariocitos necesarios después de que las células más diferenciadas se hayan quedado agotadas. La infusión con una población celular que comprende una mezcla de células progenitoras puede ser apropiada para sujetos que ya padecen neutropenia o trombocitopenia, mientras que la infusión de poblaciones celulares aisladas puede ser adecuada para la profilaxis en pacientes donde los niveles de neutrófilos o plaquetas aún no han caído por debajo de un nivel crítico. Debe apreciarse que aunque los tratamientos pueden proporcionar un aumento detectable en el recuento de células periféricas o ANC, este aumento no es un indicador fiable del injerto satisfactorio transitorio o eficacia. Por tanto pueden usarse otras medidas, tales como tasas de infección reducida y/o supervivencia aumentada para determinar la eficacia del tratamiento.

La cantidad de las células necesarias para conseguir un efecto terapéutico se determinará de forma empírica de acuerdo con procedimientos convencionales para el propósito particular. Generalmente, para administrar las células para propósitos terapéuticos, las células se dan a una dosis farmacológicamente eficaz. Por "cantidad farmacológicamente eficaz" o "dosis farmacológicamente eficaz" es una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o cantidad capaz de conseguir el resultado deseado, particularmente para tratar el trastorno o afección patológica, incluyendo reducir o eliminar uno o más síntomas o manifestaciones del trastorno o enfermedad. Como ilustración, la administración de células a un paciente que padece neutropenia proporciona un beneficio terapéutico no solamente cuando la afección subyacente se erradica o mejora, sino también cuando el paciente presenta una disminución en la gravedad o duración de los síntomas asociados con la enfermedad. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente, independientemente de si se logra una mejora. La dosis farmacológicamente eficaz, definida anteriormente, también se aplicará a compuestos terapéuticos usados en combinación con las células, como se describe adicionalmente a continuación.

Las células para infusión incluyen las poblaciones celulares expandidas sin purificación adicional, o poblaciones celulares aisladas tienen fenotipo definido de marcadores celulares y potencial de diferenciación característico como se describe en este documento. Las células expandidas pueden derivarse de un único sujeto, donde las células son autólogas o alogénicas al destinatario. Por consiguiente, en una realización, las células terapéuticas comprenden progenitores mieloides comprometidos aislados. En otras realizaciones, las células comprenden CMP aisladas, GMP aisladas, MEP aisladas, o combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, las células usadas para la infusión comprenden células no mieloides preparadas como se describe en este documento.

Debe entenderse que las células aisladas directamente de un sujeto donante sin expansión en cultivo pueden usarse para los mismos propósitos terapéuticos que las células expandidas. Preferiblemente, las células aisladas son una población sustancialmente pura de células. Estas células no expandidas pueden ser autólogas, donde las células a infundir se obtienen del destinatario, tal como antes del tratamiento con agentes citoablativos. En otra realización, las células no expandidas son alogénicas al destinatario, donde las células tienen una coincidencia completa, o desigualdad parcial o total con el MHC del destinatario. Como se ha descrito anteriormente, las células no expandidas aisladas se obtienen preferiblemente de diferentes donantes para proporcionar una mezcla de células mieloides alogénicas.

El trasplante de células en un hospedador apropiado se consigue por métodos generalmente usados en la técnica. El método preferido de administración es infusión intravenosa. La cantidad de células trasfundidas tendrá en consideración factores tales como el sexo, edad, pero, los tipos de enfermedad o trastorno, fase del trastorno, el porcentaje de las células deseadas en la población celular (por ejemplo, pureza de población celular), y la cantidad de células necesaria para producir un beneficio terapéutico. Generalmente, las cantidades de células expandidas infundidas pueden ser de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^5 células/kg, de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 10×10^6 células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 5×10^6 células/kg de peso corporal, o más según lo necesario. En algunas realizaciones, las células están en un vehículo farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 5×10^9 células. Las células se administran en una infusión, o a través de infusiones sucesivas sobre un periodo de tiempo definido suficiente para generar un efecto terapéutico. Pueden infundirse diferentes poblaciones de células cuando el tratamiento implica infusiones sucesivas. Un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se describe adicionalmente a continuación, puede usarse para infusión de las células en el paciente. Éstos típicamente comprenderán, por ejemplo, solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) o medio de cultivo celular basal sin suplementar, o medio conocido en la técnica.

6.7 Tratamientos complementarios

- 5 Puede usarse una diversidad de tratamientos complementarios con las células, expandidas o no expandidas, descritas anteriormente. Para tratar la neutropenia y afecciones relacionadas, las células expandidas pueden usarse en combinación con otros agentes y compuestos que potencian el efecto terapéutico de las células infundidas o tratan complicaciones que surgen de la neutropenia. En un aspecto, los tratamientos complementarios incluyen, entre otros, agentes anti-fúngicos, agentes anti-bacterianos, y agentes anti-virales. El uso de estos agentes también es adecuado para la trombocitopenia, como profilaxis para reducir la aparición de infecciones o abordar cualquier infección en curso que conduzca a destrucción de las plaquetas.
- 10 En un aspecto, el agente administrado de forma complementaria es un agente anti-fúngico. Las infecciones fúngicas son una de las causas principales de mortalidad en pacientes que padecen neutropenia, que es un problema significativo en pacientes que han experimentado terapia mieloablativa y HSCT. Los destinatarios con injerto retardado y pacientes que desarrollan GVHD típicamente tienen neutropenia prolongada, y por tanto están en alto riesgo de infecciones fúngicas. Los tipos de infecciones fúngicas son variados, e incluyen, entre otros, candidiasis (por ejemplo, con *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*), aspergilosis (por ejemplo, con *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*), mucormicosis (por ejemplo, con *Rhizobium arrhizus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*), criptococcosis, *histoplasma capsulatum*, y *coccidioides immitis*.
- 15 Los agentes anti-fúngicos para administración complementaria generalmente serán un agente anti-fúngico sistémico. Un agente anti-fúngico útil de este tipo es anfotericina B de la familia de antibióticos de macrólido polieno. La anfotericina B está disponible en diversas formulaciones, incluyendo en forma de un complejo con desoxicolato; en una suspensión coloidal con sulfato de colestearilo; y encapsulada en liposomas hecho de lecitina de soja, colesterol, y diestearoilfosfatidilglicerol. Se conocen otras formulaciones en la técnica.
- 20 Otros agentes anti-fúngico es flucitosina, una pirimidina fluorada. Las desaminación de flucitosina por el hongo genera 5-fluorouracilo, un anti-metabolito es inhibidor de la síntesis de ADN. La flucitosina se usa típicamente para infecciones por *criptococos* y candidiasis. Aunque se usa sola, la flucitosina se usa generalmente en combinación con anfotericina B.
- 25 Los imidazoles y triazoles representan una amplia clase de agentes anti-fúngicos basados en azol. Se cree que los imidazoles y triazoles inhiben la esteroil 14-D-desmetilase, provocando la biosíntesis alterada de ergosterol y la alteración de actividades basadas en membrana celular, tales como transporte de electrones. Los anti-fúngicos basados en azol son eficaces contra ciertos tipos de candidiasis, tales como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, y *Candida neoformans*. Anti-fúngicos de azol ejemplares adecuados para administración sistémica incluyen, entre otros, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, econazol, voriconazol, y tercanazol.
- 30 Además de a infecciones fúngicas, un paciente con neutropenia es susceptible a infección con una diversidad de patógenos bacterianos. Los pacientes que experimentan regímenes mieloablativos y HSCT tienen altas tasas de infección bacteriana con bacterias tanto Gram positivas (por ejemplo, *estreptococos* y *Staphylococcus aureus*) como Gram negativas (por ejemplo, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). La septicemia es un suceso común. Además, el injerto retardado y la restauración alterada de las respuestas inmunes contra bacterias encapsuladas, tales como *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae*, aumenta la tasa de morbilidad para destinatarios de trasplante con GVHD.
- 35 La terapia antibacteriana complementaria puede usarse cualquier antibiótico conocido adecuado para el patógeno bacteriano particular. Estos incluyen tanto antibióticos de amplio espectro como compuestos anti-bacterianos más dirigidos. Diversas clases de agentes anti-bacterianos adecuados con las células mieloides expandidas incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, quinolonas y fluoroquinolonas, antibióticos de β -lactama, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, y diversos congéneres de los mismos. Los compuestos ejemplares de quinolona incluyen ciprofloxacina, ofloxacina, esparfloxacina, lomefloxacina, y moxifloxacina. Antibióticos ejemplares de β -lactama incluyen penicilinas (por ejemplo, penicilina G, penicilina V), ampicilina, carbenicilina, meticilina, carbapenem, y cefalosporinas (por ejemplo, cefalotina, cefamandol, cefaclor, cefonicid, cefotetano, cefatoxima, ceftazidima, ceftizoxima, cefepima). Aminoglucósidos ejemplares incluyen neomicina, estreptomina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, y netilmicina. Macrólidos ejemplares incluyen eritromicina, claritromicina, y azitromicina.
- 40 Otros antibióticos serán evidentes para los especialistas en la técnica.
- 45 Las infecciones víricas también son problemáticas en pacientes con mieloablación y HSCT. Generalmente el riesgo aumentado de infección vírica resulta de la inmunidad mediada por células alterada ocasionada por la terapia mieloablativa. Muchas de estas infecciones surgen de la reactivación de virus latente que existe en un paciente seropositivo o en las células de un donante seropositivo. Los virus habitualmente encontrados incluyen, entre otros, citomegalovirus, virus del herpes simple, virus varicella zoster, herepesvirus-6, virus Epstein Barr; adenovirus, y similares. Como complemento a las infusiones celulares, los compuestos anti-virales seleccionados son aquellos apropiados para los virus encontrados por el paciente. Los compuestos antivirales útiles incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, aciclovir, cidofovir, ganciclovir, idoxuridina, penciclovir, valganciclovir, valaciclovir, vidarabina, amantadina, rimantadina, zanamivir, fomivirsén, imiquimod, y ribavirina. Los agentes terapéuticos dirigidos contra retrovirus incluyen, entre otros, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (por ejemplo,
- 50
- 55
- 60
- 65

zidovudina, didanosina, estavudina, zalcitabina, lamivudina), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (por ejemplo, nevirapina, efavirenz, delvirudina), e inhibidores de proteasa (por ejemplo, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, y lopinavir).

5 Los agentes anti-fúngicos, antibacterianos, y antivirales pueden usarse como profilaxis para reducir la aparición de infecciones, o tras aparecer la enfermedad. La profilaxis está particularmente indicada para infecciones fúngicas comunes en pacientes inmunosuprimidos, y para infecciones víricas en pacientes seropositivos o donantes seropositivos de trasplante. Por consiguiente, las realizaciones para propósitos terapéuticos incluyen combinaciones de las células progenitoras mieloides expandidas o aisladas y los compuestos anti-fúngicos, antibacterianos, o
10 antivirales.

Un tratamiento complementario adicional para trombocitopenia y afecciones relacionadas incluye transfusiones con plaquetas como medida temporal para restaurar el recuento de plaquetas a niveles seguros. Las transfusiones se continúan hasta la recuperación de la producción de plaquetas por las células transfundidas.

15 En una realización adicional, el agente administrado de forma complementaria es una citoquina o factor de crecimiento que potencia la diferenciación y movilización de células mieloides diferenciadas de forma terminal, particularmente granulocitos, macrófagos, megacariocitos y células eritroides. Para potenciar el desarrollo de granulocitos, pueden usarse las citoquinas C-CSF y GM-CSF. G-CSF es eficaz para acelerar el injerto y producción de neutrófilos en HSCT. En otra realización, la citoquina o factor de crecimiento es trombopoyetina. La administración de TPO potencia el injerto de células progenitoras trasplantadas y promueve el desarrollo de megacariocitos y plaquetas (Fox, N et al., *J. Clin. Invest.* 110:389-394 (2002); Akahori, .H. et al., *Stem Cells* 14(6):678-689 (1996)).

25 Puede usarse una diversidad de vehículos y excipientes y vías de administración para terapia complementaria, como será evidente para los especialistas en la técnica. La tecnología de formulación representativa se muestra en, *inter alia*, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) y *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª Ed, Kibbe, A.H. ed., Washington DC, American Pharmaceutical Association (2000).

30 Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenderán un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacológicamente eficaz de los compuestos, o mezcla de los mismos, o sales adecuadas de los mismos. La composición farmacéutica puede formularse como polvos, gránulos, soluciones, suspensiones, aerosoles, sólidos, píldoras, comprimidos, cápsulas, geles, cremas tópicas, supositorios, parches transdérmicos, y otras formulaciones conocidas en la técnica.

35 Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" comprende cualquiera de los vehículos convencionales farmacéuticamente aceptados conocidos para los especialistas en la técnica de formulación de composiciones farmacéuticas. Por tanto, los compuestos, por sí mismos, tal como presentes como sales farmacéuticamente aceptables, o como conjugados, pueden prepararse como formulaciones en diluyentes farmacéuticamente aceptables; por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), etanol acuoso, o soluciones de glucosa, manitol, dextrano, propilenglicol, aceites (por ejemplo, aceites vegetales, aceites animales, aceites sintéticos, etc.), celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, hidroxilpropilmetilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato de calcio, gelatina, polisorbato 80 o similares, o como formulaciones sólidas en excipientes apropiados.

40 Las composiciones farmacéuticas a menudo comprenderán además uno o más tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, etc.), bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, solutos que vuelven a la formulación isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un destinatario, agentes de suspensión, agentes espesantes, conservantes, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes, y compuestos colorantes según lo apropiado.

55 Aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido para los especialistas en la técnica en las composiciones, el tipo de vehículo variará típicamente dependiendo del modo de administración. Las composiciones terapéuticas pueden formularse para cualquier modo apropiado de administración, incluyendo por ejemplo, administración oral, nasal, a la mucosa, rectal, vaginal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, e intramuscular.

60 Para administración parenteral, las composiciones pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua libre de pirógenos estéril, aceites, solución salina, glicerol, polietilenglicol o etanol. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares en las composiciones. Otros componentes de
65 composiciones farmacéuticas son aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo,

soluciones no acuosas de aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de algodón, oleato de etilo, y miristato de isopropilo.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, tales como ampollas o viales sellados. Dichos recipientes se sellan típicamente de tal modo que conserven la esterilidad y estabilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones pueden almacenarse como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, como se ha indicado anteriormente. Como alternativa, una composición farmacéutica puede almacenarse en estado secado por congelación que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso. En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende las presentes células progenitoras mieloides expandidas crioconservadas en un medio adecuado de crioconservación, que después puede descongelarse y resuspenderse según lo necesario para su administración a un paciente.

La cantidad administrada al hospedador variará dependiendo de lo que se esté administrando, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del hospedador, el modo de administración, la cantidad de administraciones, el intervalo entre administraciones, y similares. Esto puede determinarse empíricamente por los especialistas en la técnica y puede ajustarse para el grado de la respuesta terapéutica. Factores a considerar en la determinación de una dosis apropiada incluyen, aunque sin limitación, tamaño y peso del sujeto, la edad y sexo del sujeto, la gravedad de los síntomas, la fase de la enfermedad, el método de suministro del agente, la semi-vida de los agentes, y la eficacia de los agentes. La fase de la enfermedad a considerar incluye si la enfermedad es aguda o crónica, la fase de recidiva o remisión, y la capacidad de progresión de la enfermedad.

La determinación de las dosificaciones y tiempos de administración para una cantidad terapéuticamente eficaz pertenece a las habilidades de los especialistas en la técnica. Por ejemplo, puede estimarse una dosis eficaz inicial a partir de cultivo celular u otros ensayos *in vitro*. Después puede formularse una dosis en modelos animales para generar una concentración en circulación o concentración tisular, incluyendo la de CI_{50} determinada por los ensayos de cultivo celular.

Además, la toxicidad y eficacia terapéutica generalmente se determinan por ensayos de cultivo celular y/o usando animales experimentales, típicamente determinando una DL_{50} (dosis letal para el 50% de la población de ensayo) y DE_{50} (eficacia terapéutica en el 50% de la población de ensayo). Se encuentran directrices en trabajos comunes de referencia, por ejemplo, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª Ed. (Hardman, J.G. et al., eds.) McGraw-Hill, Nueva York, NY (2001).

Para los propósitos de esta invención, los métodos de administración se eligen dependiendo de la afección que se esté tratando, la forma de los presentes anticuerpos, y la composición farmacéutica. La administración de los compuestos terapéuticos puede hacerse en una diversidad de modos incluyendo, aunque sin limitación, vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, y posiblemente inyección directa a órganos específicos tales como, por ejemplo, bazo o médula ósea, aunque se prefiere administración sistémica. La administración de las composiciones farmacéuticas puede ser a través de una única vía o de forma concurrente por varias vías.

Las composiciones pueden administrarse una vez al día, unas pocas o varias veces al día, o incluso múltiples veces al día, dependiendo, entre otras cosas, de la indicación que se esté tratando y el criterio del médico de prescripción.

6.8 Kits

Otras realizaciones de las composiciones descritas en este documento son kits que comprenden las células progenitoras mieloides expandidas y/o aisladas, citoquinas y factores de crecimiento (por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, TPO) y/o compuestos terapéuticos complementarios. Una etiqueta típicamente acompaña al kit, e incluye cualquier material escrito o grabado, que puede ser electrónico o forma legible por ordenador (por ejemplo, disco, disco óptico, chip de memoria, o cinta) que proporciona instrucciones u otra información para el uso de los contenidos del kit.

7. Ejemplos

7.1 Ejemplo 1: Métodos experimentales

Preparación de células HSC de ratones. Para obtener células de médula ósea de ratón, se sacrificaron los animales y se retiró el fémur/tibia y se limpió de músculo. Los huesos se trituraron en una pulpa usando una mano de mortero y mortero, la médula se filtró a través de un tamiz de nylon, y después se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución ACK (NH_4Cl 0,3 M, $KHCO_3$ 0,2 M, agua filtrada MiliQ) durante 3-4 minutos en hielo, y después se lavaron llenando el tubo con medio de tinción (solución salina tamponada de HANK que contenía FCS al 2% y EDTA 2 mM, sin calcio, sin magnesio, sin rojo fenol). Las células se centrifugan, se filtran, y se resuspenden en medio de tinción, y se añade IgG de ratón (dilución 1:50 de una reserva de 1 mg/ml, Sigma, St Louis MO). Las células se incuban en hielo durante 10-15 minutos y después se mezclan con microperlas CD117 (Miltenyi Biotech, Auburn CA) a un volumen de 10 μ l/ratón en un volumen final de 100 μ l/ratón de medio de tinción. Las células se incuban en hielo durante 25 minutos. Las células se lavan, se resuspenden en medio de tinción a un

volumen final ~1 ml/ratón, y se filtra a través de un tamiz de nylon. Las células se enriquecen usando un AutoMACs (Miltenyi, Auburn, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando la configuración posselds.

Después del enriquecimiento, las células se resuspenden a aproximadamente 1×10^8 células/ml en medio de tinción y se añaden los siguientes anticuerpos conjugados dirigidos (eBioscience, San Diego, CA) a la concentración apropiada: Sca-1 alofococianina (APC), c-kit R-ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7), Thy-1.1 isotiocianato de fluoresceína (FITC), linaje (CD3, CD4, CD5, CD8, B220, mac-1, Gr-1, y Ter119) R-ficoeritrina (PE).

Las células se incuban en hielo durante 25 minutos, se lavan, se centrifugan, y se resuspenden en medio de tinción. Se añade yoduro de propidio (PI) para excluir las células muertas. Se aíslan KTLS-HSC de ratón, c-kit^{high}Thy^{low}Sca-1^{pos}linaje^{neg} por FACS.

Cultivo celular y expansión. Se clasifican Lin^{neg/low} KTLS-HSC de ratones BA (H2kb) y se siembran en 500 ul/pocillo de medio sin suero que contiene la combinación de citoquinas y factores de crecimiento c-KitL, FL, TPO e IL-6 (medio basal X-Vivo15 (Cambrex Bioscience, MD); penestrep (100x), glutamax (100x), 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M), c-KitL (50 ng/ml), FL (30 ng/ml), TPO (5 ng/ml), e IL-6 (10 ng/ml) (Biosource, Camarillo, CA y R&D Systems, Minneapolis, MN). Las células se siembran a aproximadamente 10.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Las células se cultivan durante 7 días para obtener MP_c (MP derivadas de cultivo). Las células se suministran con 500 ul/pocillo en el día 2, y en el día 4 la mitad del medio se reemplaza con medio fresco. En el día 5, las células se transfieren a placas de 6 pocillos con una adición de 1 ml de medio fresco. En el día 7, las células cultivadas se recogen y se retiran dios pequeñas alícuotas para su análisis. Las alícuotas se mezclan con 30.000 perlas y se tiñen para analizar el contenido de MP (CMP/GMP/MEP) y HSC. Además, las células se tiñen con azul de tripán y se cuentan en un hemocitómetro. Los datos de análisis proporcionan información para calcular el factor de expansión y las cantidades de células totales de HSC y MP (CMP/GMP/MEP).

Análisis de cultivos *in vitro* para tipos celulares mieloides. Se prepara una suspensión de perlas 6,7 μ M (Spherotech, Libertyville, IL) añadiendo 4-5 gotas de perlas a 1 ml de medio de tinción (SM). Las perlas se cuentan usando un hemocitómetro y azul de tripán (dilución 1:10). Las perlas están a una concentración de reserva $> 2 \times 10^6$ perlas/ml y se cuentan diariamente antes de su uso cuando se usa la suspensión sobre múltiples días. Usando una pipeta, se añaden 20K perlas a cada pocillo de células a analizar. La suspensión de perlas se agita con vórtice entre cada muestra antes de añadir las perlas a los pocillos. Si los pocillos son para dividirse en múltiples muestras, es decir, 3 muestras, se añaden de nuevo la cantidad apropiada de perlas (es decir, 3 x 20K perlas para muestra normal = 60K/pocillo), de modo que cada muestra tenga un punto final de aproximadamente 20K perlas para el análisis.

Tinción para HSC de ratón en poblaciones celulares expandidas con tinción de IL7R: Se retiran las células de cada pocillo, se lavan y después se transfieren a un tubo FACS cónico correspondiente. Las células se centrifugan durante 5 min a 1100 rpm, y se retira el sobrenadante. Se añaden 50 ul de anticuerpo de bloqueo (IgG de rata e IgG de ratón 1:50), se incuban durante 10 min, seguido de la adición de 50 - 100 ul de CD117-biotina (concentración 2X) a cada tubo. Después de la incubación en hielo durante 20 minutos en la oscuridad, las células se lavan con 2-3 ml de SM, se centrifugan, y resuspenden en 50-100 μ l de la siguiente solución de anticuerpo usando concentraciones apropiadas de anticuerpos (eBioscience, San Diego, CA): Estreptavidina Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR), Sca-1 alofococianina (APC), Thy-1.1 isotiocianato de fluoresceína (FITC), IL-7R R-ficoeritrina (PE) y B220, Mac-1, GR-1 R-ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7). Después de incubación en hielo durante 25 minutos, las células se lavan, se centrifugan, y resuspenden en medio de tinción que contiene PI. Las células se analizan para HSC por FACS.

Tinción para mHSC en poblaciones celulares expandidas sin tinción de IL7R. Se retiran las células de cada pocillo, se lavan y después se transfieren a un tubo FACS cónico correspondiente. Las células se centrifugan durante 5 min a 1100 rpm, y se retira el sobrenadante. Se añaden 50 ul de anticuerpo de bloqueo (IgG de rata e IgG de ratón 1:50) seguido de 50-100 μ l de solución de anticuerpo usando concentraciones apropiadas de los siguientes anticuerpos (eBioscience, San Diego, CA): Sca-1 alofococianina (APC), Thy-1.1 isotiocianato de fluoresceína (FITC), c-kit ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7), B220, Mac-1, GR-1 R-ficoeritrina. Después de incubación en hielo durante 25 minutos, las células se lavan, se centrifugan, y resuspenden en medio de tinción que contiene PI. Las células se analizan para HSC por FACS.

Tinción para progenitores mieloides en poblaciones celulares expandidas en cultivo: Se preparan células del mismo modo que se ha hecho para la tinción de células HSC descrita anteriormente. Después de incubación con 50 ul de anticuerpo de bloqueo (IgG de rata e IgG de ratón 1:50), se añaden 50-100 ul de CD117-biotina (concentración 2X) a cada tubo, seguido de 20 minutos en hielo en la oscuridad. Las células se lavan con 2-3 ml de SM, se centrifugan, y después se resuspenden en 50-100 μ l de solución de anticuerpo a concentraciones apropiadas: estreptavidina Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR), Sca-1 alofococianina (APC), CD34 isotiocianato de fluoresceína (FITC), 2.4G2 (Fc R) R-ficoeritrina, y B220, Mac-1, GR-1 ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7). (eBioscience, San Diego, CA). Las células se preparan para análisis FACS como se hace para el análisis de HSC.

Tinción de células expandidas en cultivo para subconjuntos de células progenitoras maduras: Las células se procesan como se ha descrito anteriormente. Después de incubación con anticuerpo de bloqueo, se añaden 50-100 μ l de CD3-biotina, CD4-biotina, y CD8-biotina (concentración 2X) a cada tubo y se incuban durante 20 minutos en hielo en la oscuridad. Las células se lavan con 2-3 ml de medio de tinción, se centrifugan, y se resuspenden en 50-100 μ l de solución de anticuerpo: estreptavidina Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR), B220 (FITC), Ter119 R-ficoeritrina (PE) y Mac-1, GR-1 R-ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7) (eBioscience, San Diego, CA)). Después de incubación en hielo durante 25 min, las células se procesan por análisis FACS como se ha descrito previamente.

10 Aislamiento de células progenitoras mieloides de ratón - agotamiento de linaje. Se procesan el fémur y la tibia como se ha descrito anteriormente, y las células se resuspenden en 1 ml de medio de tinción. Se añade IgG de rata y ratón (1:50) de bloqueo, y la mezcla se incuba en hielo durante 10-15 minutos. Se cuentan las células y se llevan hasta 10^8 células/ml en medio de tinción con los siguientes anticuerpos biotinilados a diluciones predeterminadas: D3, CD4, CD5, CD8, CD 127, Ter119, Thy-1.1, y GR-1. Las células se incuban en hielo durante 25 minutos, se lavan, se centrifugan, y después se resuspenden en 40 μ l/ratón de perlas de estreptavidina (Miltenyi, Auburn, CA). Se añade medio de tinción a un volumen final de 100 μ l/ratón, se incuban en hielo durante 20 minutos, las células se lavan dos veces y se resuspenden a 10^8 células/ml en medio de tinción. Esto va seguido de filtración a través de una malla de nylon. Las células linaje positivas se agitan usando un AutoMacs (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) según las instrucciones del fabricante usando modo de agotamiento sensible. Después del recuento, las células se resuspenden a 1×10^8 células/ml en medio de tinción que contiene los siguientes anticuerpos a las concentraciones apropiadas: estreptavidina ficoeritrina-cianina 5 tándem (PE-Cy5), Sca-1 alofococianina (APC), CD34 isotiocianato de fluoresceína (FITC), 2.4G2 R-ficoeritrina (PE) y c-kit R-ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7) (Pharmingen y eBioscience, San Diego, CA). Las células se incuban con anticuerpo durante 25 minutos en hielo, se lavan, se centrifugan, y se resuspenden en medio de tinción que contiene PI. Después se usa estrategia de clasificación FACS: las CMP se clasifican en base a linaje $^{neg/lo}c\text{-kit}^{pos}Sca\text{-1}^{neg}CD34^{pos}2.4G2^{low}$; las GMP se clasifican en base a linaje $^{neg/lo}c\text{-kit}^{pos}Sca\text{-1}^{neg}CD34^{pos}2.4G2^{pos}$; y las MER se clasifican en base a linaje $^{neg/lo}c\text{-kit}^{pos}Sca\text{-1}^{neg}CD34^{low}2.4G2^{low}$.

30 Cultivo e inoculación de conidios de Aspergillus fumigatus y análisis de carga fúngica: Se coloca una carga de esporas de una reserva congelada de esporas sobre el centro de una placa de cultivo de dextrosa agar Sabourauds (SDA), y la placa se sella e incuba a 37°C durante 2-3 días con comprobación periódica para cualquier signo de contaminación. Después de 2-3 días se forma un césped de esporas negras sobre la placa. La placa se aclara suavemente con 5 ml de PBS que contiene Tween 80 al 0,05%, y la placa se raspa suavemente hasta que las esporas se dispersan en la solución. La reserva de esporas se prepara filtrando la suspensión de conidios a través de tejido estéril para retirar las hifas. La solución es oscura por las esporas y puede contener hasta 10^8 conidios por ml. Las reservas de esporas se almacenan a 4°C. Para titular las esporas, se hacen diluciones en serie en PBS/Tween 80 y se siembran en placas SDA. Después de incubación durante una noche, las placas se examinan para la cantidad de colonias. Para almacenamiento a largo plazo de esporas, se mezcla un volumen de las esporas en reserva recogidas con un volumen de glicerol al 50% y se almacenan a -80°C.

40 La inyección de las esporas en los ratones se realiza usando una solución de conidios que contiene 1.000 conidios por ml (titulada en placas de dextrosa agar Sabourauds). La solución de esporas de trabajo (100 μ l) se inyecta por vía intravenosa usando inyecciones en la vena de la cola en los ratones de interés, típicamente 8 días en los estudios profilácticos, después irradiación letal y reconstitución con HSC y/o MP. Después de la administración, se siembra una alícuota de 100 μ l de la solución de esporas restante en una placa de dextrosa agar Sabouraud y se incuban a 37°C. Se cuentan las colonias el siguiente día para confirmar la presencia de la cantidad necesaria de conidios activos en la inyección.

50 Análisis de carga fúngica. Después de anestesia con isoflurano inhalado, se inyecta Aspergillus por vía intravenosa usando la vena de la cola. Se sacrifica a los ratones y se recogen los pulmones para su examen. Los pulmones se cultivan en placas de dextrosa agar Sabouraud para detectar el crecimiento fúngico.

55 Selección de ratones reconstituidos para la presencia de células donantes. La selección de ratones trasplantados con mHSC y/o mMMP para la población de células donantes se hace recogiendo aproximadamente 10-15 gotas de sangre en 0,5 ml de EDTA 5 mM en PBS a temperatura ambiente. Se añade un ml de dextrano-500 al 2% en PBS, se mezcla, y se incuban a 37°C durante 30-45 min. La mayoría de los glóbulos rojos sedimentará. El sobrenadante resultante se transfiere a un nuevo tubo, las células se recogen por centrifugación (5 min, 1000 rpm) y los glóbulos rojos se lisan con 1,0 ml de ACK 1X durante 5-6 minutos en hielo. Esto va seguido de un lavado y centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm. Si el sedimento aún está rojo, se repiten las etapas de lavado. Las células se bloquean con IgG de rata e IgG de ratón (1:50 cada una) en 50 μ l/tubo durante 10 a 15 minutos en hielo. Se añade Mac-1 y GR-1 biotinilados (eBioscience, San Diego, CA) a la concentración apropiada, y se incuban en hielo en la oscuridad durante 20 minutos. Las células se lavan y centrifugan durante 5 minutos a 1200 rpm. Se añaden los siguientes anticuerpos a las concentraciones apropiadas: estreptavidina Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR), CD45.1 alofococianina (APC), CD45.2 isotiocianato de fluoresceína (FITC), B220 R-ficoeritrina cianina tándem (PE-Cy7) y CD3, CD4, CD8 R-ficoeritrina (PE) (eBioscience, San Diego, CA). Después de una incubación de 25

minutos en hielo, las células se lavan, se centrifugan, y resuspenden en SM que contiene PI. Las células se analizan por FACS.

Selección de ratones reconstituidos para células donantes usando marcadores H2. Se recogen aproximadamente 10-15 gotas de sangre en 0,5 ml de EDTA 5 mM en PBS a temperatura ambiente. Se añade un ml de dextrano-500 al 2% en PBS (TA) y la mezcla se incuba a 37°C durante 30-45 min. La mayoría de los glóbulos rojos sedimentará. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo, y las células se recogen por centrifugación (5 min, 1000 rpm). Los glóbulos rojos se lisan con 1,0 ml de ACK 1X (NH₄Cl 0,3 M, KHCO₃ 0,2 M) en hielo durante 5-6 minutos, seguido de un lavado y después una centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm. Si el sedimento aún está muy rojo, se repiten las etapas 4-5. Las células se bloquean con IgG de rata e IgG de ratón (1:50 cada una) en 50 ul/tubo durante 10 a 15 minutos en hielo. Las células se tiñen durante 20 minutos con los siguientes anticuerpos: Mac-1 y GR-1 ficoeritrina-cianina 7 tándem (PE-Cy7), B220 alofocianina (APC), CD3, CD4 y CD8 biotina (eBioscience, San Diego, CA).

Se usan anticuerpos adicionales para marcar marcadores de MHC dependiendo del emparejamiento de ratones usado para el trasplante: H2Kd-PE (Balb/c) y H2Kb-FITC (C57/B6) o H2Db-PE (C57/B6) y H2Dk-Fitc (AKR). Las células se preparan centrifugando durante 5 minutos a 1200 rpm y después se tiñen con estreptavidina Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de una incubación de 20 minutos en hielo, las células se lavan, se centrifugan durante 5 minutos a 1200 rpm, y después se tiñen con PI. Las células se analizan por FACS.

7.2 Ejemplo 2. Progenitores mieloides alogénicos crioconservados expandidos *ex vivo* protegen contra hongos letales en ratones neutropénicos

Este estudio examinó si las HSC pueden expandirse en grandes cantidades de progenitores mieloides funcionales *ex vivo*; si progenitores mieloides expandidos *ex vivo* protegen a ratones neutropénicos alogénicos de hongos letales comparable con la protección proporcionada por progenitores mieloides clasificados a partir de BM; y muestra que progenitores mieloides pueden crioconservarse sin pérdida de actividad.

La FIG. 1 es un diseño experimental ejemplar. La FIG. 1A muestra poblaciones celulares clasificadas y analizadas, diferentes combinaciones de marcadores pueden distinguir HSC y progenitores. Puede usarse CD117⁺, CD90.1^{lo}, Lin^{neg/lo} y Sca-1⁺ para identificar HSC. Puede usarse CD117⁺, Lin^{neg/lo} y Sca-1^{neg} para identificar una población mixta de progenitores mieloides. Las subpoblaciones individuales (CMP, GMP y MEP) pueden distinguirse por su perfil CD16/CD34. La FIG. 1B muestra la derivación de progenitores mieloides a partir de HSC en cultivo. Las MP derivadas de cultivo pueden usarse frescas o crioconservadas. La FIG. 1C muestra el uso de progenitores mieloides para proteger a ratones neutropénicos de una exposición fúngica. Varios parámetros, tales como las cepas usadas, el tiempo de infección y la cantidad de células usadas varían entre experimentos. Experimentos típicos use hospedadores BALB/c y donantes C57BL/Ka de MP.

Ratones. Se criaron ratones C57BL/6 Ka, Thy-1.1, CD45.2 y se mantuvieron en la instalación de investigación en animales de Stem Cells Inc, Palo Alto, CA. Los ratones BALB/c se adquirieron de Charles River Laboratories. Los ratones donantes se usaron a 6-8 semanas de edad, los ratones destinatarios a 8-16 semanas de edad.

Los ratones destinatarios se irradiaron con un irradiador Cs. Los destinatarios BALB/c recibieron un total de 9.2Gy dado en dos dosis separadas al menos 3 horas. Todos los ratones se mantuvieron con agua acidificada y se cambiaron a agua que contenía antibióticos (106 U/l de sulfato de polimixina B y 1,1 g/l de sulfato de neomicina) durante 4 semanas después de la irradiación para reducir las infecciones oportunistas.

Infecciones fúngicas. Se usó un aislado clínico de *Aspergillus fumigatus*, que se ha descrito previamente (BitMansour A, et al., Blood 100, 4660-4667) para infectar los ratones. En resumen, el hongo se sembró dextrosa agar Sabouraud (BD Biosciences, Cockeysville, MD) y se incubó durante al menos 48 horas a 37°C. Los conidios se recogieron vertiendo 10 ml de PBS + Tween80 al 0,05% sobre el césped fúngico. Después de raspado suave la solución resultante se filtró para retirar las hifas y la solución resultante de conidios se mantuvo a 4°C. Se usó siembra de diluciones en serie en placas de agar Sabouraud para determinar la concentración de conidios. Los ratones expuestos con *A. fumigatus* recibieron entre 100-200 conidios inyectados i.v. en la vena de la cola en un total de 150 µl de solución salina.

Citometría de flujo. Se prepararon KTLS HSC purgando la médula ósea de fémures y tibias de ratones, seguido de lisis con cloruro de amonio de los glóbulos rojos. La suspensión celular resultante se enriqueció para células CD117⁺ usando un dispositivo AutoMacs y microperlas CD117 (Miltenyi Biotec). Las células enriquecidas se tiñen para CD117PE-Cy7 (2B8), CD90.1^{FITC} (HIS51), LinPE (CD3 (145-2C11), CD4 (L3T4), CD5 (53-7.3), CD8 (53-6.7), CD19 (ID3), B220 (RA3-6B2), CD11b (M1/70), Gr-1 (8C5) TER119 (TER119) y Sca-1APC (D7) (eBioscience, San Diego, CA). Las células CD117⁺, CD90.1^{lo}, Lin^{neg/lo} y Sca-1⁺ se clasificaron doblemente (clasificación por producción seguida de clasificación por pureza) usando un Becton y Dickinson FACSAria. Las HSC de cepas CD90.2 (por ejemplo, BALB/c) se clasifican sin tinción CD90 como células KLS.

Las células progenitoras mieloides derivadas de médula ósea, una mezcla de CMP, GMP y MEP se clasificaron a partir de médula ósea de ratón enriqueciendo la médula ósea para células CD117⁺ como se ha descrito anteriormente. Las células se tiñen y se clasifican las células CD117+, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg}.

5 Cultivo tisular. Se clasifican diez mil KTLS HSC Lin^{neg/lo} de médula ósea de ratón y se siembran en placas de 24 pocillos que contienen 0,5 ml de X-vivo15 (Cambrex) suplementado con penicilina/estreptomicina al 1% (Biosource),
 10 Glutamax al 1% (Invitrogen) y 50 ng/ml de c-KitL, 5 ng/ml de Tpo, 10 ng/ml de IL-6 (Biosource) y 30 ng/ml de Flt3L (R&D Systems). Todos los factores de crecimiento son recombinantes de ratón. Los medios se añaden en días alternos. Se reemplaza el 50% del medio en el día 4, punto en el cual las células se vuelven a sembrar en una placa
 15 de 6 pocillos. En el momento de la recogida del día 7, el volumen total de cultivo es 2 ml que contiene 2-7x10⁶ células. Las células se analizan para la presencia de células progenitoras maduras como se ha descrito anteriormente, y se usan frescas o criopreservadas. Las células cultivadas se criopreservan en DMSO al 7,5%, suero bovino fetal al 42,5% y medio Xvivo15 al 50%. Tras descongelar las células, se cuantificaron usando un recuento de células viables (azul de tripán) seguido de análisis citométrico de flujo para confirmar que el proceso de congelación y descongelación no había afectado a los perfiles progenitores, antes de su inyección en ratones irradiados.

20 HSC expandidas ex vivo en progenitores mieloides funcionales. Para desarrollar una terapia útil clínica, es deseable generar progenitores mieloides en grandes cantidades. Se clasificaron KTLS HSC altamente purificadas y se depositaron en medio sin suero (X-vivo15) suplementado con factores de crecimiento que actúan sobre HSC. Se ensayaron varias combinaciones diferentes de citoquinas (datos no mostrados). La combinación de KitL, Flt3L, Tpo e IL-6 indujo rápida proliferación pero solamente diferenciación lenta de las HSC sembradas en placa, de modo que sobre un periodo de una semana, la expansión celular total para HSC derivadas de C57BL/Ka promedió 500 veces. El análisis citométrico de flujo de las células al final de los siete días en cultivo indica que una proporción significativa de las células tiene el fenotipo superficial de diversos progenitores mieloides (CMP, GMP y MEP) así como HSC (como se indica en la Figura 2B). La FIG. 2B muestra las cantidades de expansión promedio observadas para células C57BL/Ka y se observaron expansiones totales similar con HSC de varias cepas diferentes incluyendo AKR, FVB y SJL. Los experimentos de trasplante muestran que aunque estaban presentes cantidades significativas de HSC después de 5 días de cultivo, permanecían pocas HSC funcionales después de cultivar C57BL/Ka HSC durante 30 7 días.

En promedio, la expansión de las diversas poblaciones progenitoras, combinada en la selección CD117⁺Lin^{neg/lo}, promedió aproximadamente 100 veces sobre la cantidad de KTLS-HSC sembradas en las condiciones usadas. Por tanto, estas condiciones de cultivo provocaron significativamente más MP que lo que puede purificarse directamente de médula ósea de ratón. Además, usando siembra en metilcelulosa de células individuales, las poblaciones progenitoras identificadas por fenotipo de marcadores superficiales tienen el potencial de diferenciación de linaje esperado (datos no mostrados). 35

Además de los diversos progenitores mieloides bien definidos, estos cultivos también contienen células más diferenciadas, incluyendo una pequeña cantidad de megacariocitos relativamente maduros. Sin embargo, como puede observarse en la FIG. 2A, la mayoría de las células, aunque muestran signos de compromiso mieloides, no están diferenciadas de forma terminal y muchas retienen las características de blastocitos de las células madre y progenitoras. La FIG. 2A muestra cytopins teñidos con May-Grünwald/Giemsa de un cultivo de 7 días, la mayoría de las células son inmaduras, muchas claramente comprometidas con el linaje mieloides. Están presentes bajas cantidades de megacariocitos relativamente maduros. La FIG. 2B muestra la producción de diferentes tipos de progenitores, como se define por el perfil de marcadores de superficie, de HSC después de 7 días en cultivo sin suero. 45

50 Progenitores mieloides expandidos ex vivo protegen a ratones neutropénicos alogénicos de *Aspergillus* invasivo. Se han usado progenitores mieloides derivados de médula ósea para proteger a ratones neutropénicos de infección fúngica. Este ejemplo muestra que progenitores mieloides derivados de cultivo protegen a ratones neutropénicos alogénicos de infecciones fúngicas invasivas de forma similar que progenitores mieloides derivados de médula ósea.

Se realizó reconstitución en ratones irradiados de forma letal (BALB/c, CD90.2, CD45.2, H-2^d) con 200 HSC BALB/c singénicas (CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg}, KLS) y 8x10⁴ MP de médula ósea clasificadas como células CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg} de médula ósea C57BL/Ka, H-2^b o 5x10⁵ células MP derivadas de cultivo de 7 días. Los ratones se infectaron, por inyección en la vena de la cola, con 150 conidios de un aislado clínico de *Aspergillus fumigatus* 7 días después de la irradiación inicial y trasfusión de HSC/MP. El experimento se repitió tres veces con 15 ratones por grupo (datos no mostrados). Como se muestra en los datos combinados en la FIG. 3, solamente 2/15 controles de irradiación sobrevivieron durante más de 30 días, lo que confirma que la dosis de irradiación letal usada es relativamente baja. La inyección de 200 KLS HSC en el día 0 (grupo de rescate con HSC) rescata completamente a los ratones irradiados; sin embargo, solamente 17/44 de estos ratones sobreviven a la inyección de 150 conidios de *A. fumigatus*. En contraste, 34/45 ratones (76%) que recibieron BM MP y 32/45 ratones (71%) que recibieron células derivadas de cultivo sobrevivieron a la exposición fúngica y las células derivadas de cultivo evitan la muerte. El análisis estadístico (rango log) muestra protección significativa tanto por células BM MP (p<0,0001) como por células derivadas de cultivo (p=0,0014) en comparación con el grupo de solamente células madre. No hay diferencia 65

discernible en la supervivencia en 30 días entre los grupos que recibieron células BM MP y el grupo que recibió células derivadas de cultivo ($p=0,5164$). Por tanto, los progenitores mieloides expandidos *ex vivo* protegen a ratones neutropénicos de aspergilosis invasiva tan bien como los progenitores mieloides derivados de médula ósea.

5 Progenitores mieloides alogénicos expandidos *ex vivo* crioconservados protegen contra Aspergilosis en ratones neutropénicos. Una ventaja del uso de progenitores mieloides en contraste con infusiones de granulocitos maduros, es la capacidad de crioconservar las células progenitoras antes de su uso. Las células MP congeladas podrían almacenarse y descongelarse cuando fuera necesario.

10 Este estudio está adaptado de los experimentos convencionales con hongos con MPc murinas. El diseño convencional es cultivar C57BL/Ka HSC durante 7 días en Xvivo15 suplementado con KitL, Flt3L, Tpo e IL-6. En el día 0 los ratones hospedadores (BALB/c) se irradian de forma letal ($2 \times 4.4\text{Gy}$, separados 4 horas) y se les inyecta el mismo día 5×10^5 células de los cultivos MPc y 200 BALB/c HSC (KLS). En el día 7 se inyecta i.v. a los ratones 150 conidios de *Aspergillus fumigatus*. Los ratones se inspeccionan diariamente y se determina la supervivencia en 30 días.

Los experimentos descritos aquí diferirán en que (i) las MPc se cultivan en varias ocasiones diferentes (ii) los cultivos previos se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido (iii) se comparan MPc frescas y congeladas (iv) se analizó la composición de MPc por citometría de flujo antes de congelar y después de descongelar.

20 Las células de ratón pueden congelarse en un medio de crioconservación que es una mezcla libre de suero o que contiene suero. Para todos los experimentos de investigación se usó un suero que contenía medio de crioconservación. Mezcla que contiene suero: (150 ml total) con 37,5 ml de suero y 22,5 ml de DMSO.

- 25
1. Se sedimentan las células
 2. Se resuspenden las células en medio sin suero (IMDM o Xvivo)
 3. Se prepara un recipiente de metal con hielo y agua
 4. Se coloca el tubo de células resuspendidas en el agua helada y se deja caer lentamente un volumen igual de la mezcla de crioconservación desde arriba hasta las células resuspendidas agitando suavemente al mismo tiempo el tubo.
 5. Se pipetea la mezcla en el vial y se pone el aparato de congelación a -80 durante una noche
 6. Se transfiere el vial a -180 para almacenamiento largo.
- 30

Para descongelar células de ratón cultivadas:

- 35
1. Se descongela el vial en baño de 37C hasta que el contenido está descongelado en su mayor parte. Se resuspenden las células en medio sin suero (IMDM o Xvivo)
 2. Se pipetean las células lentamente en el vial que contiene DNAsa, se recoge una pequeña alícuota para hacer el recuento celular inicial del vial.
 3. Se añaden gota a gota 10 ml de medio (IMDM/DMEM etc. con NCS al 10%) a las células mientras se balancea suavemente el tubo para permitir una lenta mezcla del medio y las células.
 4. Se centrifugan las células y se resuspenden en medio de tinción (HBSS/NCS al 2%)
 5. Se cuentan
- 40

1/12/2004	Día -14. Clasificar BS.BA HSC para iniciar cultivos MPc (MPc congeladas).
8/12/2004	Día -7. Recoger MPc, analizar por flujo y congelar las células (sembrar células CD117+ en placa MCM/Terasaki).
9/12/2004	Clasificar BS.BA HSC para iniciar cultivos MPc (frescos).
16/12/2004	Día 0. Clasificar BALB/c HSC, recoger cultivos MPc, irradiar 65 ratones BALB/c e inyectar a 60 ratones BALB/c las MPc (frescas o congeladas) y/o HSC.
23/12/2004	Día 7. Inyectar a 50 ratones reconstituidos 150 conidios de <i>Aspergillus fumigatus</i>
	Día 5 a 30. Registros diarios de ratones supervivientes y moribundos
2005	Ensayar ratones para el nivel de reconstitución empezando a las 4 semanas

Grupo	n	HSC	MPc	Factor de crecimiento	Hongo (conidios)	Día
G1: MPc frescas	15	200	Frescas, 500,000	No	150	7
G2: 11/29 MPc congeladas	15	200	Congeladas, 500,000	No	150	7
G3: 12/8 MPc congeladas	15	200	Congeladas, 500.000	No	150	7
G4: sin MP	10	200	0	No	150	7
G5: Ctrl de radiación	5		0	No		7
Totales	60	11.000	3*7.500.000	Ninguno	8.250	

5 Cultivos MP. Se clasificaron HSC CD117⁺CD90.1^{low}Lin^{neg/low}Sca-1⁺ a partir de médula ósea BS.BA CD117-enriquecida como se describe a continuación. Aislamiento de HSC de ratón - directamente conjugadas con microperlas c-kit. Se recogen los fémures y tibias, se limpian de músculo. Se trituran usando mano de mortero y mortero. Se filtran a través de tamiz de nylon, 5 ratones/tubo (10 huesos de pierna y 10 brazos). Se centrifugan a 1200 RPM durante 5 minutos. Se resuspenden en 1 ml de ACK ~ 3-4 minutos en hielo. Se lavan llenando el tubo con medio de tinción. Se centrifugan. Se cuentan las células. Se resuspenden en medio de tinción ~50-60 µl de ratón, se filtran, se lava la punta y se filtran con otros 40-50 ul, se añade IgG de rata (1:50) + IgG de ratón (1:50) durante 10-15 minutos. Se retiran 10 ul de BM completa para tinción. Se añaden 10 µl/ratón de microperlas anti c-kit (CD117) por ratón (nº lote 5040428046). Nota: si se añaden húmeros, se usan 12 µl de perlas/ratón. Se incuban en hielo 25 minutos. Se lavan 2x. Se resuspenden las células y se filtran a través de tamiz de nylon, volumen final ~0,5-1,0 ml/ratón, se lava la punta y se filtra en malla con otros 0,5 ml. Se enriquecen las células en AutoMACs, se usa el programa posselds. Como alternativa, se prepara columna Midi lavando con 3-4 ml de medio de tinción. Se filtran las células a través de malla de nylon para aplicar a la columna. Se pasan las células sobre la columna 3x (no más de 10 ratones/columna). Se lava la columna con 5-10 ml de medio de tinción. Se retira la columna del imán y se lavan abundantemente las células de la columna 2x. (nota: 10 ratones = midi y 5 ratones = mini) Se cuentan, se centrifugan. Se resuspenden las células a 1x10⁸ células/ml en medio de tinción más anticuerpos.

Anticuerpo	Nº lote	Título	
c-kit (2B8) biotina	E000225	1:400	Orc-kit
(2B8) PE-Cy7	E009158	1:400	
Sca-1 APC	E007871	1:200	
Thy-1.1 FITC	E008124	1:400	
Linaje PE:			
Ter119	E005015	1:400	
CD3	E009288	1:100	
CD5	E004526	1:1600	
CD8	E009271	1:200	
B220	E007026	1:800	
CD4	E008789	1:3200	
Mac-1	E005858	1:6400	
GR-1	E008723	1:3200	

20 Se incuban en hielo durante 25 minutos, se lavan y centrifugan. Si se usa c-kit bio, se resuspenden en SM (1x10⁸ células/ml). Se tiñen con estreptavidina Cy7-PE (nº lote E006330) 1:800 25 minutos en hielo. Se lavan, se centrifugan, se resuspenden en medio de tinción + PI (1:1000), se filtran antes de FACS. Se establecen los tubos comp en base a los colores usados:

Anticuerpo	Nº lote	Título
B220 -PE Cy7	E009142	1:400
B220-Bio	E004692	1:800
Cascade-Blue	65A1-1	1:400
B220-PE	E007026	1:400
B220-FITC	E005965	1:200
B220-APC	E011511	1:200
B220-Cy5PE	E004592	1:800
PI		1:1000
Sin tinción		

25 Se tiñe la BM completa: se centrifugan las células. Se resuspenden en 100 ul de SM + anticuerpos (véase anteriormente). Se incuban en hielo 25 minutos. Se lavan, se centrifugan. (Si se usa 2B8-biotina, se resuspenden en 100 ul (10⁷ células/100 µl) y se tiñen con estreptavidina Cy7-PE 1:800 25 minutos en hielo). Se lavan, se centrifugan, se resuspenden en SM + PI (1:1000), se filtran antes de FACS.

30 Se usaron aproximadamente 3 x 10⁴ HSC para iniciar cultivos de MPc. Las células se cultivaron en Xvivo15 + 2ME + Pen/Estrep + 50 ng/ml de KitL + 30 ng/ml de Flt3L + 5 ng/ml de Tpo + 10 ng/ml de IL-6 durante 7 días como se describe a continuación.

35 HSC de ratón a gran escala para cultivo de progenitores mieloides: Se clasifican KTLS-HSC Lin^{neg/low} a partir de médula ósea de ratón y se siembran en 500 µl/pocillo de Xvivo15 suplementado con Pen/Estrep, Glutamax y β-mercaptoetanol así como KitL, Flt-3L, Tpo e IL-6. Las células se cultivan durante 7 días para obtener MP_C (MP derivadas de cultivo). La expansión esperada durante este periodo para células C57BL/Ka es 200-700 veces la expansión total, cayendo el 10-35% de las células en la selección CD117⁺Lin⁻. Las células se clasifican dos veces, primero por producción luego seguido por clasificación final por pureza. Para una clasificación de volumen 100.000, la primera clasificación debe producir aproximadamente 300.000 células. En una placa de 24 pocillos, se clasifican

10.000 KTLS-HSC directamente por pocillo en 500 μ l de medio. Se añade agua estéril a los pocillos externos de la placa para evitar la evaporación. Las células se incuban a 37°C, CO₂ al 5% en una incubadora completamente humidificada. En el día 2, se añaden 500 μ l de medio fresco a cada pocillo. En el día 4, se descarta la mitad del medio (500 μ l) (se pipetea cuidadosamente desde la parte superior para evitar la retirada de células). Las células se resuspenden (se pipetean arriba y abajo usando una P1000) y se transfieren a un pocillo en una placa de 6 pocillos que contiene 500 μ l de medio fresco. El pocillo vacío de la placa de 24 pocillos se aclara con 500 μ l de medio fresco, se transfiere esto al mismo pocillo en la placa de 6 pocillos. El volumen total debe ser 1,5 ml por pocillo. Algunas células permanecerán adheridas al fondo de la placa de 24 pocillos, éstas se descartan. En el día 6, se añaden 500 μ l de medio fresco. En el día 7, las células cultivadas se recogen y analizan. Además, las células se tiñen con azul de tripán y se cuentan usando un hemocitómetro. Los datos de análisis proporcionan información para calcular el factor de expansión y las cantidades totales de células de HSC y MP (CMP/GMP/MEP).

Reactivos para cultivo a gran escala de HSC de ratón en progenitores mieloides: X-vivo15 (Cambrex Bio science 04-744Q) suplementado con penicilina/estreptomicina (100x) Biosource International Inc., Glutamax (100x) Invitrogen, β -Mercaptoetanol (1000x) Sigma Aldrich Fluka Inc. Los factores de crecimiento incluyen:

	Fabricante	Nº Catálogo	Solución madre	Usar a:
rmKitL	Biosource	PMC2115	25 ng/ μ l	50 ng/ml
rmFlt3L	R&D	427-FL	25 ng/ μ l	30 ng/ml
rmTpo	Biosource	PMC1144	10 ng/ μ l	5 ng/ml
rmIL-6	Biosource	PMC0066	10 ng/ μ l	10 ng/ml

El medio de cultivo para 100.000 células (500 μ l/pocillo) es 5 ml de Xvivo completo, 5 μ l de IL6, 2,5 μ l de TPO, 10 μ l de KitL, 6 μ l de Flt3L. Para 100 ml de Xvivo completo se usan 100 μ l de β -mercaptoetanol, 1 ml de Pen/estrep, 1 ml de Glutamax.

Después de 7 días en cultivo, las células se recogieron y contaron. Se analizaron alícuotas como se describe a continuación. Se analiza HSC/MP añadiendo 4-5 de perlas spherotck (6,7 μ M) a 1 ml de medio de tinción (SM). Se diluyen las perlas 1:10 en azul de tripán, se cuentan usando un hemocitómetro. Las perlas deben estar a una concentración de reserva > 2 x 10⁶ perlas/ml. Se cuentan las perlas antes de cada análisis. Se añaden 30.000 perlas por muestra. Se transfiere una pequeña alícuota de células a los tubos de análisis. Se bloquea con rIgG (1:50) y mIgG (1:50) en hielo durante 10 min. A los tubos MP se añade CD117-BIOTINA a 1:200. Se incuban durante 20 min en hielo en la oscuridad. Se prepara mezcla de anticuerpo para HSC (Ckit cy7-pE a 1:400, Sca-1 APC a 1:200, Thy-1.1 FITC a 1:200, B220 PE a 1:800, Mac-1 PE a 1:800, y GR-1 PE a 1:800) y MP (SA-cascade blue a 1:400, Sca-1 APC a 1:200, CD34 FITC a 1:25, 2.4G2 a 1:50, B220 Cy7-PE a 1:800, GR-1 Cy7-PE a 1:800). Se lavan todos los tubos con 2 ml de sm, se centrifugan a 1100 rpm durante 5 min. Se incuban con mezcla de anticuerpo durante 20 min en hielo en la oscuridad. Se lavan las células con sm y se centrifugan. Se resuspenden las células en medio PI. [medio PI (1:1000) 10 ml de reserva: 10 μ l de PI en 10 ml de sm].

En resumen, se realizó análisis citométrico de flujo para determinar la presencia de HSC, CMP, GMP, MEP y células más maduras (CD11b⁺, Gr-1⁺, Ter119⁺). Se prepararon cytospins (a teñir con tinción May-Grünwald/Giemsa). Se necesitan aproximadamente 3 veces 7,5 x 10⁷ células derivadas de cultivo para las inyecciones, frescas (1x) y congeladas (2 x).

Congelación de MPc. Las MPc se derivado de cultivo de HSC como se ha descrito. Las células se analizaron por citometría de flujo antes de la congelación. Además, se sembraron células individuales CD117⁺Lin⁻, en placas Terasaki con medio MPc (Xvivo + KitL, Flt3L, Tpo e IL-6) anterior. El porcentaje de células que forman colonias se determinará una semana después de la siembra en placa. Las células congelaron de acuerdo con el protocolo descrito a continuación. Las células pueden congelarse en un medio de crioconservación que es una mezcla sin suero o que contiene suero. Para todos los experimentos de investigación, se usó medio de crioconservación que contiene suero. Mezcla que contiene suero: (150 ml total) 37,5 ml de suero, 90 ml hetaalmidón, 22,5 ml de DMSO. Se sedimentan las células y se resuspenden las células en medio sin suero (IMDM o Xvivo). Se prepara un recipiente de metal con hielo y agua. Se coloca el tubo de células resuspendidas en el agua helada y se deja caer lentamente un volumen igual de la mezcla de crioconservación desde arriba a las células resuspendidas mezclando al mismo tiempo suavemente el tubo. Se pipetea la mezcla en el vial y se pone el aparato de congelación a -80 durante una noche, se transfiere el vial a -180 para almacenamiento largo.

Descongelación de MPc congeladas. Las MPc congeladas se descongelaron como se describe a continuación. Se descongela el vial en baño de 37°C hasta que está descongelada la mayor parte del contenido. Se resuspenden las células en medio sin suero (IMDM o Xvivo). Se pipetean las células lentamente en el vial que contiene DNAsa, se recoge una pequeña alícuota para hacer el recuento inicial de células en el vial. Se añaden gota a gota 10 ml de medio (IMDM/DMEM etc. con NCS al 10%) a las células mientras se balancea suavemente el tubo para permitir una mezcla lenta del medio y las células. Se añade medio a aproximadamente 1 ml/minuto. Se centrifugan las células y

se resuspenden en medio de tinción (HBSS/NCS al 2%). Después se "reposan" las células dejándolas a TA durante 1/2 hora. Se cuentan/tiñen o siembran las células en consecuencia.

5 En este experimento, después de descongelar las células se dejaron reposar durante aproximadamente 1 hora y se determinó la viabilidad por (i) azul de tripán/recuento en hemocitómetro (ii) análisis de citometría de flujo por exclusión de PI. Además, se sembraron y cultivaron MPc CD117⁺Lin⁻ individuales.

10 Clasificación de BALB/c HSC. Se clasificaron HSC, CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1^{pos}, a partir de 5 ratones BALB/c usando lo descrito anteriormente. Se necesitaron 10.000 HSC (200 por destinatario). Las BALB/c HSC clasificadas se mezclaron con BS.BA MPc derivadas de cultivo en la proporción deseada y se usaron para inyección en ratones BALB/c irradiados de forma letal.

15 Inyecciones de hongos. En el día 7 se inyectó a los ratones en la vena de cola 150 conidios de *Aspergillus fumigatus* como se describe a continuación incluyendo el ensayo de parte de la solución de inyección en dextrosa agar Sabauroud para cuantificar la cantidad de conidios vivos inyectados. La inyección de *Aspergillus* determina la concentración de conidios para cada experimento antes de las inyecciones. El volumen total de 150 µl (PBS 1x estéril + tween al 0,05% + conidios) se inyecta por ratón. Durante las inyecciones, se mantiene la solución de conidios en hielo y se agita con vórtice antes de cada carga de la jeringa. Se siembran 150 µl de la jeringa en una placa SDA y se incuban a 37°C. El siguiente día se cuentan las colonias para confirmar la presencia de conidios inyectados.

20 Para demostrar que los progenitores mieloides derivados de cultivo retienen su capacidad de prevenir aspergilosis invasiva en ratones neutropénicos, se sembraron HSC y se cultivaron como se ha descrito anteriormente. Después de siete días, los cultivos se recogieron y analizaron por citometría de flujo. Las células después se crioconservaron como se ha descrito anteriormente y se almacenaron en fase de vapor de nitrógeno líquido. Después de al menos siete días, los viales se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C, se lavaron dos veces con medio. Se retiró una alícuota para análisis citométrico de flujo y el resto de las células se usó para inyectar en hospedadores alogénicos irradiados de forma letal. La FIG. 4A compara los datos de supervivencia para MP frescas con los de progenitores mieloides derivados de cultivo que se crioconservaron hasta su uso, la supervivencia de 30 días de ratones expuestos a conidios de *A. fumigatus* 7 días después de irradiación letal y reconstitución con 200 HSC singénicas y 500.000 MP derivadas de cultivo alogénicas, usadas frescas o después de crioconservación. La supervivencia después de exposición fúngica en 4 grupos de 15 ratones que recibieron 500.000 células frescas difiere significativamente de la de ratones que recibieron solamente HSC (p=0,009, ensayo t). Lo mismo es cierto para 3 grupos de 15 ratones que recibieron 500.000 progenitores mieloides derivados de cultivo que se habían crioconservado en comparación con grupos solamente de HSC (p=0,0329). No hay diferencias en la supervivencia entre los grupos que recibieron progenitores mieloides frescos o congelados (p=0,7205) o los grupos de solamente HSC en ambos casos (p=0,5058). La FIG. 4B es una comparación del perfil de tinción CD117 Lin de las células MP cultivadas antes de congelación y después de descongelación, y muestra que un ciclo de congelación/descongelación no afecta a los perfiles de tinción CD117 y Lin. Se obtuvieron resultados similares en el análisis para los marcadores (datos no mostrados).

45 La reconstitución con progenitores mieloides típicamente provoca injerto a corto plazo. La FIG. 5 muestra la reconstitución con MPc singénicas, ilustra los niveles de injerto en sangre periférica a las 4 semanas después de la reconstitución con células C57BL/Ka cultivadas 5 días (2,25 x 10⁵ células/ratón), 7 días (8 x 10⁵ células por ratón), o clasificadas directamente de la médula ósea de ratón como progenitores mieloides (4 x 10⁴ células/ratón). Como se muestra en la FIG. 5, están presentes pocas (cinco por ciento) células derivadas de MP en circulación un mes después de la administración. Las cantidades de células derivadas de MP desaparecen con el tiempo, y son inferiores a las 8 semanas que a las 4 semanas después de la administración (datos no mostrados). Las células que están presentes son principalmente linfocitos B. Las HSC que se han cultivado durante cinco días en condiciones de inducción de MP muestran un patrón drásticamente diferente de reconstitución. A las 4 semanas muchas de las células en circulación son derivadas de MP, y éstas contienen células que representan los tres linajes principales, células mieloides, células B y células T. Esto sugiere que el injerto es por HSC funcionales residuales. Las cantidades de células derivadas de MP son significativamente inferiores 8 semanas después de la reconstitución, lo que indica que las HSC de injerto están principalmente restringidas a ST-HSC. La administración de células que se han cultivado durante ocho días presenta un patrón de injerto muy parecido al de progenitores mieloides purificados. Se observan pocas células derivadas de MP y éstas representan principalmente células B de vida larga. Por tanto, la cantidad y tipo de células derivadas de donante se relacionó con la duración del cultivo y siete días de cultivo provocó pocas células derivadas de MP detectadas en el hospedador 8 semanas después de infusión.

60 La FIG. 6 muestra la respuesta a dosis de protección por progenitores mieloides derivados de cultivo. Datos combinados de diez experimentos independientes. Las dosis se representan como las cantidades de células totales (FIG. 6A) o células CD117+Lin⁻ en las MPc (FIG. 6B). Estos experimentos se realizaron como se ha descrito para la FIG. 5. Los ratones BALB/c se irradiaron de forma letal y se les inyectó BALB/c HSC y C57BL/Ka MPc, seguido de exposición con conidios de *A. fumigatus* en D+7.

65

Progenitores mieloides cultivados proporcionan rápidamente protección eficaz. La FIG. 7 muestra datos combinados de supervivencia de 15 experimentos diferentes en que se inyectó hongo en diferentes momentos después de la reconstitución de los ratones irradiados de forma letal con 200 HSC singénicas y 250.000 o 500.000 MP derivadas de cultivo. La FIG. 7 muestra que los ratones destinatarios fueron capaces de sobrevivir a la exposición fúngica durante los dos primeros días después de la irradiación; en D+3, los ratones eran completamente susceptibles a exposición infecciosa.

Progenitores mieloides cultivados alogénicos mixtos. El propósito del experimento fue determinar si MPc alogénicas mixtas (i) protegen al mismo grado de MPc donantes únicas (ii) no afecta de forma adversa a los ratones. El experimento muestra MPc en lotes combinados y crioconservadas como alícuotas son un agente terapéutico clínicamente relevante.

Este estudio se modificó a partir de los experimentos convencionales de hongos con MPc murinas. El diseño convencional es cultivar C57BL/Ka HSC durante 7 días en Xvivo15 suplementado con KitL, Flt3L, Tpo e IL-6. En el día 0 los ratones hospedadores (BALB/c) se irradian de forma letal (2x4.4Gy, separados 4 horas) y se les inyecta en el mismo día 5 x 10⁵ células de los cultivos de MPc y 200 BALB/c HSC (KLS). En el día 7 se inyecta i.v. a los ratones 150 conidios de *Aspergillus fumigatus*. Los ratones se inspeccionan diariamente y se determina la supervivencia de 30 días.

Los experimentos descritos en este documento difieren en que (i) las HSC se clasificaron y cultivaron a partir de ratones BS.BA, AKR, FVB y SJL (ii) se dieron cantidades reducidas de MPc (iii) el hongo se dio más rápido después de irradiación.

6/1/2005	Día -7. Clasificar BS.BA, AKR, FVB y SJL HSC para iniciar 4 cultivos MPc diferentes.
13/1/2005	Día 0. Clasificar BALB/c HSC, recoger cultivos MPc, irradiar 51 ratones BALB/c e inyectar a 45 ratones BALB/c las MPc y/o HSC.
20/1/2005	Día 7. Inyectar a 45 ratones reconstituidos 200 conidios de <i>Aspergillus fumigatus</i>
21/1/2004 a 13/2/2005	Día 8 a 30. Registros diarios de ratones supervivientes y moribundos
2005	Ensayar los ratones para el nivel de reconstitución empezando a las 4 semanas

Grupo	n	HSC	BS.BA MPc	AKR/SJL/FVB	Hongo	Día
HSC noMP	15	200	0	no	200 conidios	7
BS.BA MPc	15	200	500.000	no	200 conidios	7
MPc mixtas	15	200	125.000	125.000 cada uno	200 conidios	7
Ctrl de radiación	5	0	0	no	0	n/a
Total	50	9.000	9.375.000	1.875.000 cada uno	9.000	

Hospedadores: BALB/c, H-2^d, CD90.2, CD45.2 (Charles Rivers Laboratories). Aproximadamente 56 ratones necesarios, 51 como hospedadores y 5 como donantes de HSC. MPc: C57BL/Ka, H-2^b, CD90.1, CD45.1 (BS.BA, criados de forma local); MPc:AKR, H-2^k, CD90.1, CD45.2 (CRL); MPc:SJL, H-2^s, CD90.2, CD45.1 (CRL); MPc:FVB, H-2^q, CD90.1, CD45.2 (CRL). Son necesarios aproximadamente 5 a 10 ratones de cada cepa, suficiente para generar 8-10 x 10⁴ HSC. Se necesitan más células BS.BA que las otras cepas.

Cultivos MP. Se clasificaron HSC CD117⁺CD90.1^{low}Lin^{neg/low}Sca-1⁺ a partir de médula ósea CD117-enriquecida BS.BA, AKR y FVB como se ha descrito anteriormente. Las SJL HSC se clasificaron como células CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1⁺. Se usarán aproximadamente 3 x 10⁴ HSC para iniciar cultivos de MPc. Las células se cultivaron en Xvivo15 + 2ME + Pen/estrep + 50 ng/ml de KitL + 30 ng/ml de Flt3L + 5 ng/ml de Tpo + 10 ng/ml de IL-6 durante 7 días como se ha descrito anteriormente. Después de 7 días en cultivo las células se recogieron y contaron. Se analizaron alícuotas. En resumen, se realizó análisis citométrico de flujo para determinar la presencia de HSC, CMP, GMP, MEP y células más maduras (CD11b⁺, Gr-1⁺, Ter119⁺). Se prepararon cytopspins (teñidos con tinción May-Grünwald/Giemsa). Se necesitaron aproximadamente 1,5 x 10⁷ células derivadas de cultivo para las inyecciones. El exceso de células se crioconservó para uso futuro.

Clasificación de BALB/c HSC. Se clasificaron HSC, CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1^{pos}, de 5 ratones BALB/c. Se necesitaron 10.000 HSC (200 por destinatario). Las BALB/c HSC clasificadas se mezclaron con BS.BA MPc derivadas de cultivo en la proporción deseada y se usaron para inyección en ratones BALB/c irradiados de forma letal.

Inyecciones de hongo. Se inyectó a los ratones en la vena de la cola 150 conidios de *Aspergillus fumigatus* como se ha descrito anteriormente. Las inyecciones diferirán en que estos ratones recibirán hongo en el día 4 en lugar del día 7 habitual. Otros procedimientos, incluyendo el ensayo de una parte de la solución de inyección en dextrosa agar Sabauroud para cuantificar la cantidad de conidios vivos inyectados, permanecen iguales.

La FIG. 8 muestra la protección de ratones neutropénicos por MP derivadas de cultivo alogénicas mixtas. Los resultados demuestran la eficacia de las células MP alogénicas mixtas. El experimento usó células cultivadas de 4

cepas diferentes, todas desiguales en antígenos principales y minoritarios. Las células MP congeladas/descongeladas alogénicas mixtas de 3 cepas (C57BL/Ka, AKR y FVB) y a la mitad de la dosis celular provocaron protección sin reconstitución a largo plazo (datos no mostrados).

5 Capacidad radioprotectora de progenitores derivados de cultivo alogénicos desiguales. Este experimento usó donante AKR MPc y destinatario C57/B6Ka. Las MP se clasificaron directamente de médula ósea de ratón o se derivaron en cultivo de HSC clasificadas. Las MP cultivadas se derivaron en 7 días de cultivo en medio X-Vivo que contenía KitL, Flt3L, TPO e IL-6. Después de siete días de cultivo, las células se analizaron por FACS para determinar la frecuencia de células progenitoras c-kit positivas. Se trasplantó una dosis de células cultivadas que contenía 200.000 o 500.000 progenitores c-kit positivos linaje negativos. La FIG. 9A muestra los datos de radioprotección de 30 días de ratones irradiados de forma letal trasplantados con MP alogénicas completamente desiguales en MHC. Los ratones supervivientes tienen poco quimerismo de donante detectable (FIG. 9B).

15 Comparación de la capacidad radioprotectora de progenitores derivados de cultivo alogénicos desiguales frescos y congelados. Este experimento usó donante AKR MPc y destinatario C57/B6Ka. Las MP se derivaron en cultivo a partir de HSC clasificadas. Las MP cultivadas se derivaron en 7 días de cultivo en medio X-Vivo que contenía KitL, Flt3L, TPO e IL-6. Después de siete días de cultivo, las células se recogieron y se analizaron por FACS para determinar la frecuencia de células progenitoras c-kit positivas. Las células se inyectaron directamente en ratones irradiados de forma letal o se congelaron y descongelaron antes de la inyección. Se trasplantó una dosis de células cultivadas que contenía 200.000 progenitores c-kit positivos linaje negativos. La Figura 10 muestra datos de radioprotección de 30 días de ratones irradiados de forma letal trasplantados con MP alogénicas completamente desiguales en MHC. Las MP crioconservadas protegen de forma equivalente a MP que se dan en el momento de la recogida.

25 7.3 Ejemplo 3. Progenitores mieloides iniciados a partir de células madre hematopoyéticas humanas en matraces y bolsas

Se obtuvieron hpHSC humanas (células CD34+CD90+ derivadas de sangre periférica movilizada (MPB)) de voluntarios sanos. La MPB se enriquece para células CD34+ usando un dispositivo Baxter Isolex. Las células CD34-enriquecidas se tiñen adicionalmente y se clasifican usando un Dakocytomation MoFlo modificado de un BD FACSAria regular para obtener células CD34+CD90+ ("hpHSC"). Se usan células frescas o después de crioconservación, después de enriquecimiento de CD34 con Isolex o después de clasificación CD34+CD90+ en el MoFlo. Las muestras se congelan manualmente o usando un congelador de velocidad gradual.

35 Congelación de células humanas. Las células pueden congelarse en un medio de crioconservación que es una mezcla libre de suero o que contiene suero. Para todos los experimentos de investigación se usa medio de crioconservación que contiene suero. Mezcla que contiene suero: (150 ml total). 37,5 ml de suero, 90 ml de hetaalmidón, 22,5 ml de DMSO. Se sedimentan las células y se resuspenden las células en medio sin suero (IMDM o Xvivo). Se prepara un recipiente de metal con hielo y agua. Se coloca el tubo de células resuspendidas en el agua helada y se deja caer lentamente un volumen igual de la mezcla de crioconservación desde arriba a las células resuspendidas mezclando suavemente al mismo tiempo el tubo. Se pipetea la mezcla en el vial y se pone el aparato de congelación a -80 durante una noche y se transfiere el vial a -180 para almacenamiento largo.

45 Descongelación de células humanas. Se descongela el vial en baño de 37C hasta que el contenido queda en gran medida descongelado. Se resuspenden las células en medio sin suero (IMDM o Xvivo). Se pipetea las células lentamente en el vial que contiene DNAsa, se recoge una pequeña alícuota para hacer el recuento inicial de células del vial. Se añaden gota a gota 10 ml de medio (IMDM/DMEM etc. con NCS al 10%) a las células mientras se balancea suavemente el tubo para permitir una mezcla lenta del medio y las células. Se añade medio a aproximadamente 1 ml/minuto. Se centrifugan las células y se resuspenden en medio de tinción (HBSS/NCS al 2%). Se "reposan" las células dejándolas a TA durante 1/2 hora. Se cuentan/tiñen o siembras las células en consecuencia.

Se cultivan hpHSC en pocillos, matraces o bolsas en Xvivo15 + penicilina/estreptomicina al 1%, Glutamax al 1% y 100 ng/ml de KITL, 100 ng/ml de FLT3L, 50 ng/ml de TPO y 10 ng/ml de IL-3, salvo que se indique otra cosa. La mezcla base de citoquinas es rhKITL 100 ng/ml (Amgen) reserva: 10 µg/ml; rhTPO 50 ng/ml (Biosource) reserva: 10 µg/ml; rhFLT3L 100 ng/ml (Amgen) reserva: 100 µg/ml; rhIL-3 10 ng/ml (Biosource) reserva: 10µg/ml. En algunos experimentos, se ensayó el efecto aditivo de las siguientes citoquinas rhIL-6 10 ng/ml, rhIL-11 10 ng/ml, rhGM-CSF 10 ng/ml, rhG-CSF 100 ng/ml. Los ensayos incluyen recuento de células (azul de tripán) y, típicamente en los días 5, 8 y 11, citometría de flujo (CD34, CD90, CD45RA, CD 123, CD15, CD33, CD41, CD19).

60 Bolsas: Se usó bolsa Vuelife de 7 ml (American Fluoroseal, nº catálogo 1PF-0007), 32 ml (nº 2P-0032) o 72 ml (nº 2P-0072).

65 Manipulación de las bolsas: Se usan precauciones normales para manipular células humanas. Las bolsas tienen uno (bolsas de 7 ml) o dos accesos que pueden usarse para llenar y extraer muestras. Los accesos tienen cierres luer que permiten conectar las líneas de muestra y las jeringas. Las bolsas de 7 ml, una vez llenadas con más de

aproximadamente 4 ml, están a suficiente presión para filtrar cuando se abren, tienen que cerrarse con pinza antes de abrir el cierre luer. Se usan jeringas para llenar las bolsas o añadir más medio, el flujo por gravedad no es suficiente. Las bolsas más grandes pueden llenarse fácilmente por flujo por gravedad, puede conectarse una jeringa sin émbolo como un "embudo" cuando se añade medio o células con una pipeta regular. Estas bolsas no tienen que pinzarse antes de abrir el cierre, solamente tienen que mantenerse erguidas.

Cultivo: Las bolsas se cultivan típicamente en una incubadora Sanyo; 37°C, CO₂ al 5% y O₂ al 1-20%. Las incubadoras están completamente humidificadas, aunque esto no es necesario para el cultivo en bolsa. Las bolsas son permeables a gas, pero no permeables a agua. La concentración celular es típicamente 10⁵ células/ml (intervalo: 10⁶ células/ml a 10⁴ células por ml). Las bolsas pueden colocarse en placas petri (15 cm de diámetro, pueden mantener bolsas de 7 o 30 ml) o en placas cuadradas (bolsas más grandes), para facilitar la manipulación y añadir esterilidad.

Muestreo: Puede extraerse muestras celulares regulares de las bolsas usando jeringas de 1 ml equipadas con un cierre luer. Se mezclan los contenidos de la bolsa (las células tienden a reunirse en pliegues, véanse los depósitos grises en la imagen anterior). Se pinza si es necesario (bolsa de 7 ml) y se retira el tapón de (uno de) los accesos. Se jifa una jeringa de 1 ml y se invierte la bolsa (jeringa abajo). Se retira la pinza, si está presente. Se llena y vacía la jeringa unas pocas veces para mezclar las células en los tubos de conexión. Se vacía la jeringa (el émbolo todo abajo) y se invierte la bolsa (jeringa arriba). Se permite que el aire se mueva arriba y se sella el tubo de plástico duro del acceso de muestra (incluso parcialmente llenado), después se aspira una muestra en el tubo. La totalidad del tubo de muestra contiene aproximadamente 0,2 ml. Se vuelve a pinzar su fuera necesario y se retira la jeringa y se reemplaza con el tapón.

En una bolsa de 7 ml se añadieron 2 ml de células en medio que contenía GF, en el día 3 ó 4 medio adicional (2-3 ml) para reponer el cultivo. En algunos experimentos, en una bolsa de 72 ml aproximadamente 4 x 10⁶ células en 20 ml de medio (concentración celular 2 x 10⁵ células por ml). Una vez las densidades celulares se aproximan a 10⁶ células por ml (aproximadamente día 4) las células se diluyen para mantener la densidad entre 3 x 10⁵ y 2 x 10⁶ células por ml. Puede añadirse medio en los días 4 y 6 (hasta un volumen total de 72 ml) para la recogida y congelación en el día 8. Las células se expandieron hasta aproximadamente 1,5 x 10⁵ células en 8 días. Un programa podría ser empezar con 3 millones de células en 15 ml, añadir 15 ml de medio en el día 4, seguido de la adición de 40 ml de medio en el día 6.

Análisis: Se retira una muestra celular como se ha descrito anteriormente. El análisis completo de los cultivos se hace típicamente en los días 5, 8 y 12. Esto incluye análisis citométrico de flujo, siembra de 500 células en placas de 35 mm en metilcelulosa, y cytopins teñidos con May-Grünwald/Giemsa. Los recuentos celulares se hacen en una base diaria usando un hemocitómetro y azul de tripan.

Se obtuvieron datos de expansión de 5 donantes diferentes. La FIG. 11 muestra los datos de expansión bolsas y matraces del donante: 1319. La FIG. 11A muestra la expansión total, la FIG. 11B muestra los datos de densidad celular para las células (CD34+CD90+) del donante, cultivadas en medio idéntico/GF (Xvivo15 suplementado con Glutamax, PenEstrep, KITL, FLT3L, TPO e IL-3). Las células se cultivaron a diferentes densidades y en diferentes tipos de bolsas y matraces. Densidades de partida entre 1 x 10⁵ y 1 x 10⁶ células por ml, ambas en bolsas AFC de 7 ml. Las líneas discontinuas indican cultivos que no recibieron ningún medio más, pero se siguieron para observar las densidades máximas que podrían conseguirse. Las tasas de proliferación son similares entre cultivos que crecen en bolsas AFC y cultivos que crecen en matraces de cultivo tisular. Una proporción de las células se adhirió de forma floja al plástico de los matraces, este no fue el caso para las bolsas de Teflón. Vista de contraste de fase de células que crecen en matraces y bolsas. Donante: 1319 de cultivos en el día 8 después de siembra muestra que las células en bolsas tienden a acumular aumentos, lo que explica la mayor densidad aparente (datos no mostrados).

La FIG. 12 son fotografías de células de cultivos de MP humanas y tratadas con factores de crecimiento. Donante: 1319, las células se cultivaron en matraces durante 8 días (Xvivo15 + PenEstrep, Glutamax, 100 ng/ml de KITL, 100 ng/ml de FLT3L, 50 ng/ml de TPO y 10 ng/ml de IL-3, cambiadas a matraces T25 con diferentes factores de crecimiento (100 ng/ml de KITL, 20 ng/ml de IL-3 y 300 ng/ml de G-CSF). La FIG. 12 muestra células en diferentes momentos puntuales después de la transferencia (4 a 19 días). Se observa la presencia de picos de granulocitos en el día 12, en el día 19 solamente macrófagos. Los cultivos de MP humanas pueden diferenciarse en neutrófilos y macrófagos morfológicamente maduros, así como megacariocitos.

Datos de expansión en bolsas de donantes 1198 y 1202. Las células de estos dos donantes se enriquecieron en Isolex, se clasificaron para el fenotipo hpHSC (CD34⁺CD90⁺) usando el Dakocytomation MoFlo y se crioconservaron después de la clasificación. Las células se descongelaron y sembraron en bolsas AFC de 7 ml como se ha indicado. Medio: Xvivo15 suplementado con Glutamax, PenEstrep, KITL, FLT3L, TPO e IL-3. La FIG. 13A muestra la expansión total, y la FIG. 13B muestra los datos de densidad celular. Los símbolos vacíos indican células sembradas al mismo tiempo en bolsas más grandes (véase a continuación). No hay diferencias evidentes entre células sembradas a 2 x 10⁴ células por ml y células sembradas a 2 x 10⁵ células por ml, o entre células sembradas en bolsas AFC de 7 ml frente a 72 ml.

Datos de expansión en bolsas de donantes 1176, 1198, 1202 y 1207 en bolsas AFC de 72 ml. Las células de estos cuatro donantes se enriquecieron en Isolex, se clasificaron para el fenotipo hpHSC (CD34⁺CD90⁺) usando el Dakocytomation MoFlo y se crioconservaron después de la clasificación. Las células se descongelaron y sembraron en bolsas AFC de 72 ml como se ha indicado. Medio: Xvivo15 suplementado con Glutamax, PenEstrep, KITL, FLT3L, TPO e IL-3. La FIG. 14A muestra la expansión total, y la FIG. 14B muestra los datos de densidad celular para las células. Volumen de siembra inicial: aproximadamente 4×10^6 células en 20 ml, volumen de cultivo final 70 ml por bolsa. Se sembró un total de $15,6 \times 10^6$ células en las 4 bolsas, se recogió (y crioconservó) un total de $6,14 \times 10^8$ células después de 8 días. Expansión promedio 40 veces (intervalo 30 veces a 60 veces).

7.4 Ejemplo 4. Formación de colonias de progenitores mieloides humanos y respuesta a G-CSF in vivo

Se inició cultivo de progenitores mieloides humanos con 2×10^6 HSC humanas purificadas (hpHSC descongeladas) y se cultivaron en una bolsa AFC estática con ExVivo-15 sin suero con SCF, Flt3L, TPO, IL-3 como se ha descrito anteriormente. En el día 5, 8, 11, 13 y 15 se recogieron las células MP y se sembraron por triplicado en metilcelulosa para evaluar su potencial de formar colonias *in vitro*. La FIG. 15A muestra la eficacia de siembra (colonias obtenidas/células sembradas) subdividida en los diferentes tipos de colonias (E: eritroide; M: macrófago; G: granulocito; GM: granulocito/macrófago mixto; GEM: mieloides/eritroide mixto), lo que indica cuántos progenitores están presentes en los cultivos.

La FIG. 15B muestra el aumento de cantidades totales de CFU (unidades formadoras de colonias) que es la eficacia de siembra por el recuento de células totales. Aunque las cantidades relativas de CFU descienden debido al aumento relativo más fuerte en la cantidad de células totales, existe un aumento en las CFU con el tiempo.

Se muestra el análisis FACS de MP cultivadas y los cambios en las poblaciones madre/progenitoras en el tiempo en FIG. 16. Los diagramas mostrados presincronizados para células vivas y linaje negativas. La población de partida en el día 0 es CD34⁺CD90⁺ (cuadrante superior derecho) y esta población desciende en el tiempo. Los progenitores mieloides están principalmente en el cuadrante CD34⁺CD90⁻ (superior izquierdo), los datos adicionales indican que las células CD34^{low}/- forman colonias (aunque a un grado inferior) y por lo tanto contribuyen a la combinación global de progenitores (datos no mostrados). Se determinó la cantidad relativa de células CD34⁺CD90⁻ frente a la eficacia relativa de siembra en el tiempo (datos no mostrados) para determinar la correlación entre el % de células CD34⁺ y las CFU. La estrecha correlación (datos no mostrados) sugiere que puede usarse la tinción CD34 FACS como indicador para la cantidad de progenitores en cultivos.

La FIG. 17 muestra el efecto de IL-3 y IL-6, solas y en combinación sobre células MP humanas. La FIG. 17A muestra la densidad celular y el recuento de células por ml y la FIG. 17B muestra los recuentos de células totales. Las células humanas se cultivaron en Xvivo que contenía SCF/Flt3L/TPO y se añadieron IL-3/IL-6 (10-20 ng/ml) solas o en combinación (10-20 ng/ml). Los recuentos de células revelan que IL-3 actúa como factor de proliferación en los cultivos.

La FIG. 18 muestra los resultados de un ensayo de formación de colonias de las células MP cultivadas con IL-3, IL-6 o ambas en combinación. La FIG. 47A (día 5), la FIG. 47A (día 8), y la FIG. 47C (día 11) demuestran que la adición de IL-6 aumenta las cantidades de CFU y ayuda a mantener el potencial progenitor de las células MP.

La FIG. 19 muestra las cantidades absolutas de CFU en cultivos de MP con IL-3, IL-6 o ambas en combinación. Comparación de las cantidades totales de CFU a partir de MPc en respuesta a IL-3 y/o IL-6. Los efectos de proliferación de IL-3 y los efectos de mantenimiento progenitor de IL-6, estas dos citoquinas en combinación aumentan las cantidades totales de células iniciadoras de colonias en los cultivos.

Se cultivaron MPc en condiciones convencionales durante 5 (FIG. 20A) u 8 días (FIG. 21B). Se añadió G-CSF, se añadieron 300 ng/ml en el día 5 u 8 de MPc (día cero en los gráficos) al medio y se controló el crecimiento celular en el tiempo y se comparó con cultivos de control, que no recibieron G-CSF (sin). Los datos muestran que G-CSF puede usarse para aumentar las cantidades de células sobre periodos largos de tiempo cuando se añade en fases posteriores a los cultivos. También muestra que las MP son sensibles a G-CSF y probablemente son progenitores directos de granulocitos/neutrófilos y sugiere G-CSF en combinación con trasplante de MPc para aumentar las cantidades de neutrófilos en los pacientes.

La FIG. 21 es un esquema para mostrar la sensibilidad de células MP humanas a G-CSF *in vivo*. El esquema muestra un experimento de trasplante de MPc de día 8 en ratones NOD/SCID para evaluar su potencial de injerto, potencial de desarrollo y respuesta a G-CSF *in vivo*.

La FIG. 22 es análisis FACS de médula ósea y bazo para buscar el injerto de MPc humanas una semana después del trasplante y su respuesta a G-CSF. Las muestras se tiñeron con anticuerpo anti-CD45 humana para detectar células donantes y se muestran dos muestras independientes para cada tejido con/sin G-CSF. La médula ósea muestra el mayor grado de reconstitución, que puede aumentarse por inyección de G-CSF.

65

5 La FIG. 23 es el fenotipo FACS de las células derivadas de MPc humanas en ratones NOD/SCID. Los diagramas mostrados están presincronizados para células vivas y huCD45+. CD33 es un marcador para células mieloides tempranas y la mayoría de las células humanas son CD33+ lo que indica que la mayoría de las células están comprometidas a ese linaje. CD14 y CD15 tiñen células mieloides más maduras y tinción heterogénea muestra compromiso y maduración en el linaje mieloides. Al mismo tiempo no fueron detectables células B (CD19) o células T (CD3, no mostrado) humanas en ese momento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar una composición terapéutica para reconstituir de forma transitoria la hematopoyesis en un ser humano, que comprende:
- 10 a) cultivar una población celular de partida que comprende células madre hematopoyéticas humanas CD34⁺CD90⁺ (HSC) de una pluralidad de donantes alogénicos no relacionados y al menos parcialmente desiguales, en el que existe al menos una disparidad parcial en el MHC entre los donantes y el destinatario, *ex vivo* en un medio de cultivo que comprende una mezcla de citoquinas y factores de crecimiento para producir una población celular expandida que comprende más del 50% de células progenitoras mieloides CD34⁺CD90^{neg} en el que las células progenitoras mieloides son una mezcla de células progenitoras mieloides alogénicas que comprende al menos una disparidad parcial en el MHC entre sí, y con el destinatario; y
- 15 b) resuspender dichas células progenitoras mieloides en un medio farmacéuticamente aceptable adecuado para administración a un ser humano.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha población celular expandida comprende menos del 5% de HSC.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente crioconservar dichas células progenitoras mieloides antes de dicha etapa de resuspensión.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha población celular de partida se ha crioconservado previamente.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los donantes alogénicos son completamente desiguales en el MHC unos con respecto a otros.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho medio de cultivo está químicamente definido.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en que la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento comprende SCF o un análogo de unión a c-kit del mismo, FL o un análogo de unión a flt-3 del mismo, y TPO o un análogo de unión a c-mpl del mismo.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 en que la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene un factor adicional seleccionado entre IL-3, IL-6 o IL-11, o combinaciones de las mismas.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 en que la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición SCF o un análogo de unión a c-kit del mismo, FL o un análogo de unión a flt-3 del mismo, TPO o un análogo de unión a c-mpl del mismo e IL-3.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en que la mezcla de citoquinas y factores de crecimiento tiene la composición de 50-100 ng/ml de SCF o un análogo de unión a c-kit del mismo, 30-100 ng/ml de FL o un análogo de unión a flt-3 del mismo, 5-50 ng/ml de TPO o un análogo de unión a c-mpl del mismo, y 10-50 ng/ml de IL-3.
- 45 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas células progenitoras mieloides se aíslan de la población celular expandida antes de dicha etapa de resuspensión.
- 50 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en que las células progenitoras mieloides aisladas son células progenitoras mieloides comunes, células progenitoras de granulocitos/macrófagos o células progenitoras de megacariocitos/eritroides.
- 55 13. Una población celular que comprende células progenitoras mieloides expandidas *ex vivo* adecuadas para su uso en el tratamiento de hematopoyesis alterada en un destinatario humano, siendo dichas células progenitoras mieloides una mezcla de células progenitoras mieloides alogénicas derivadas de una pluralidad de donantes alogénicos no relacionados y al menos parcialmente desiguales, en la que dicha población de células comprende más del 50% de células progenitoras mieloides CD34⁺CD90^{neg}; y en la que existe al menos una disparidad parcial en el MHC entre los donantes y el destinatario.
- 60 14. La población celular de la reivindicación 13 que comprende menos del 5% de HSC:
15. La población celular de la reivindicación 13 o reivindicación 14 en la que dichas células progenitoras mieloides comprenden al menos el 75%, 85% o 95% de las células totales en la población expandida de células.
- 65 16. La población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que dichas células progenitoras mieloides expandidas se crioconservan en un medio de crioconservación.

17. La población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que dichas células progenitoras mieloides expandidas se resuspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 18. La población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en que las células progenitoras mieloides alogénicas son completamente desiguales en el MHC unas con respecto a otras y/o con respecto al destinatario.
- 10 19. La población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en que las células progenitoras mieloides alogénicas son células progenitoras mieloides comunes aisladas, células progenitoras de granulocitos/macrófagos aisladas o células progenitoras de megacariocitos/eritroides aisladas.
20. Una composición terapéutica que comprende la población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 para su uso en el tratamiento de un paciente humano que padece hematopoyesis alterada.
- 15 21. Uso de la población celular de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 para la preparación de una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de un paciente humano que padece hematopoyesis alterada.
- 20 22. La composición terapéutica o uso de acuerdo con la reivindicación 20 o reivindicación 21, en la que dicha composición es para co-administración concurrente o posterior con células HSC aisladas.
- 25 23. La composición terapéutica o uso de acuerdo con la reivindicación 20 o reivindicación 21, en la que dicha composición es para su uso con al menos uno de un compuesto antiviral, un compuesto antifúngico, un compuesto antibacteriano, una citoquina o un factor de crecimiento.
- 30 24. La composición terapéutica o uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que dicho paciente humano está experimentando trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC).
- 35 25. La composición terapéutica o uso de acuerdo con la reivindicación 24, en la que las células progenitoras mieloides expandidas se administran después del trasplante de HSC.
- 40 26. La composición terapéutica o uso de acuerdo con la reivindicación 24, en la que las células progenitoras mieloides expandidas se administran de forma concurrente con el trasplante de HSC.
- 45 27. La composición terapéutica o uso de acuerdo con la reivindicación 20, reivindicación 21 o reivindicación 23, en la que dicho paciente humano está padeciendo neutropenia o trombocitopenia.
28. Un kit que comprende la población celular o composición terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.
29. El kit de la reivindicación 28, que comprende adicionalmente una composición terapéutica para tratar complicaciones asociadas con neutropenia que comprende al menos uno de un compuesto antiviral, un compuesto antifúngico y un compuesto antibacteriano, o G-CSF o GM-CSF.
30. El kit de la reivindicación 28, que comprende adicionalmente una composición terapéutica para tratar complicaciones asociadas con trombocitopenia que comprende al menos uno de un compuesto antiviral, un compuesto antifúngico y un compuesto antibacteriano o una preparación de plaquetas o EPO.

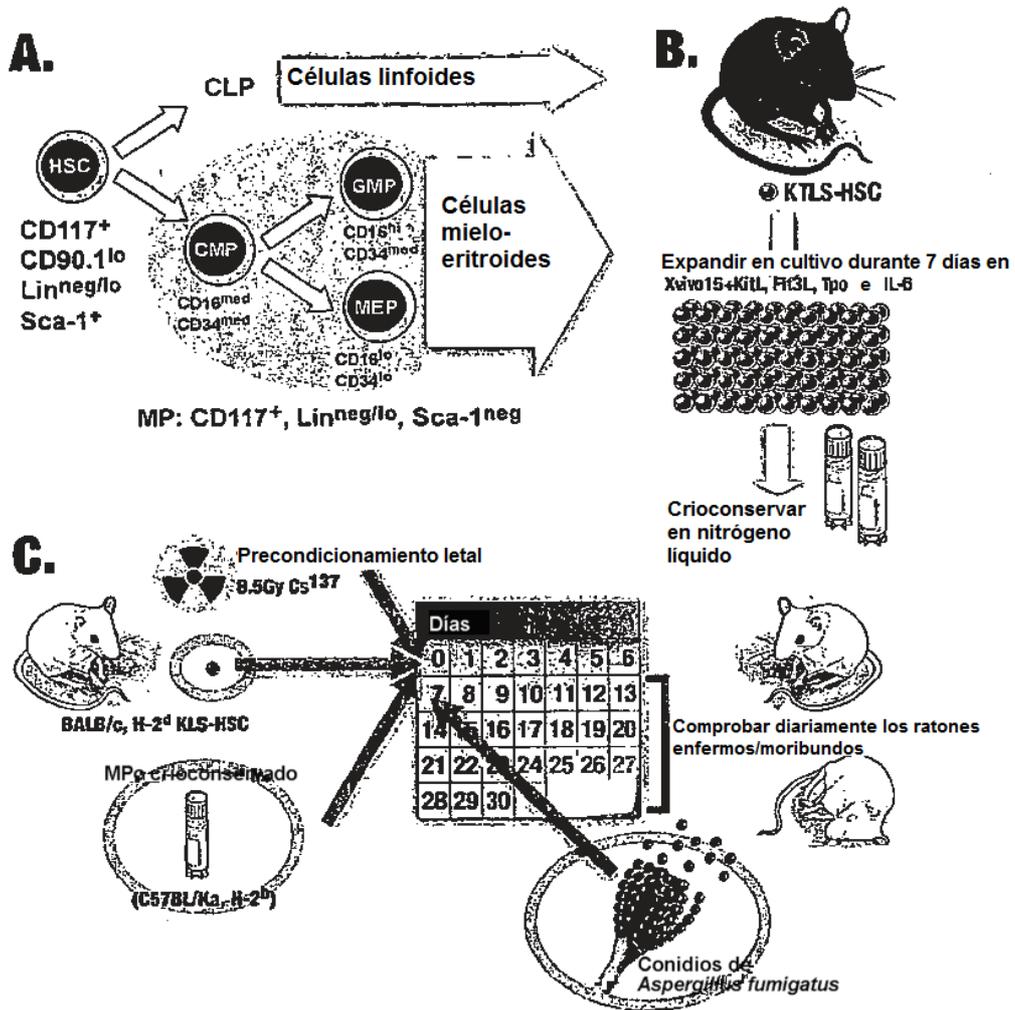


FIG. 1

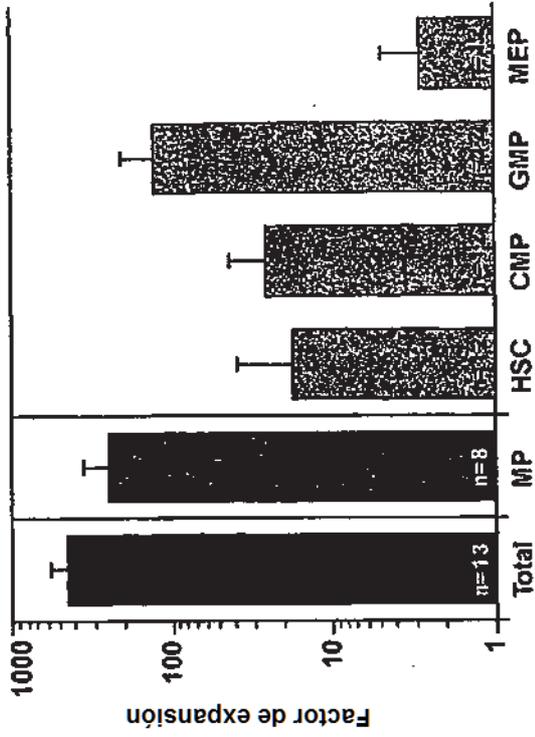


FIG._2B

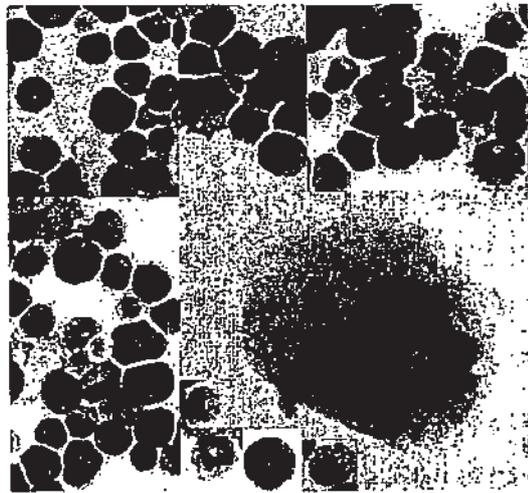


FIG._2A

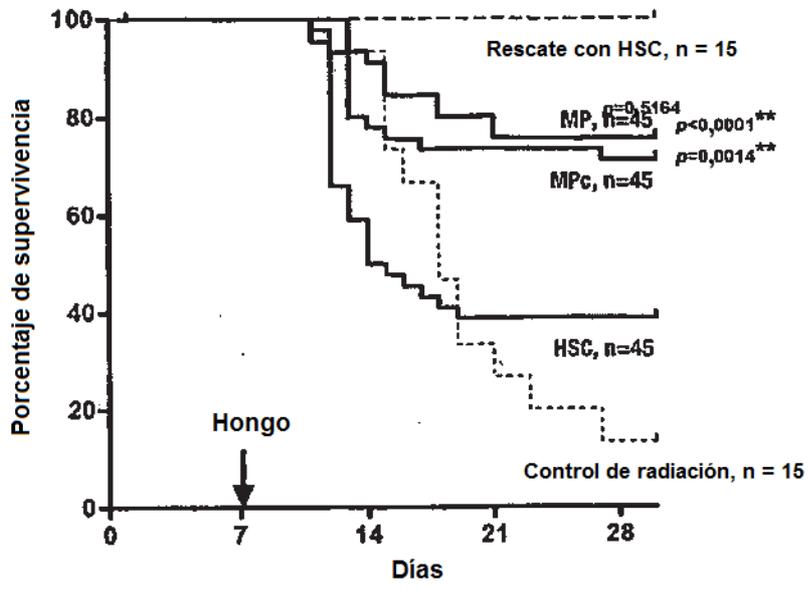


FIG. 3

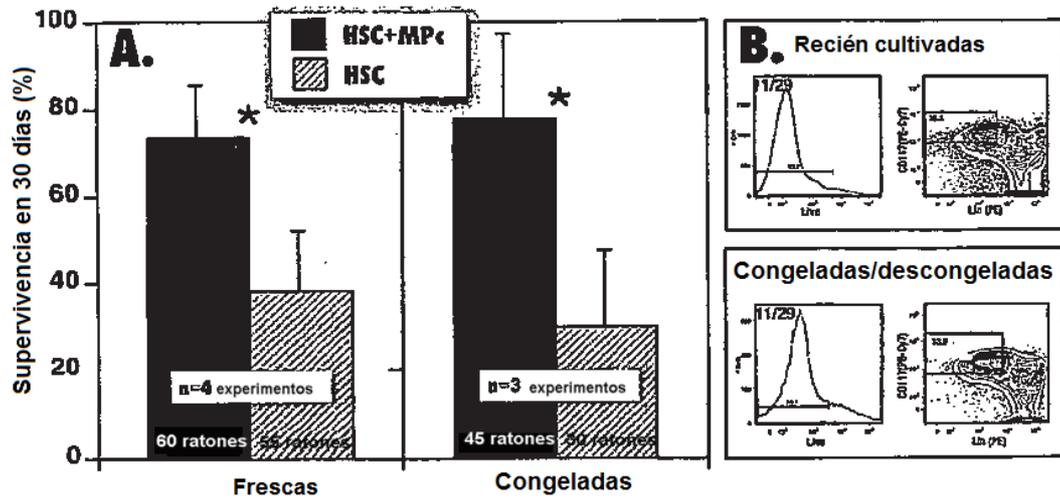


FIG._4

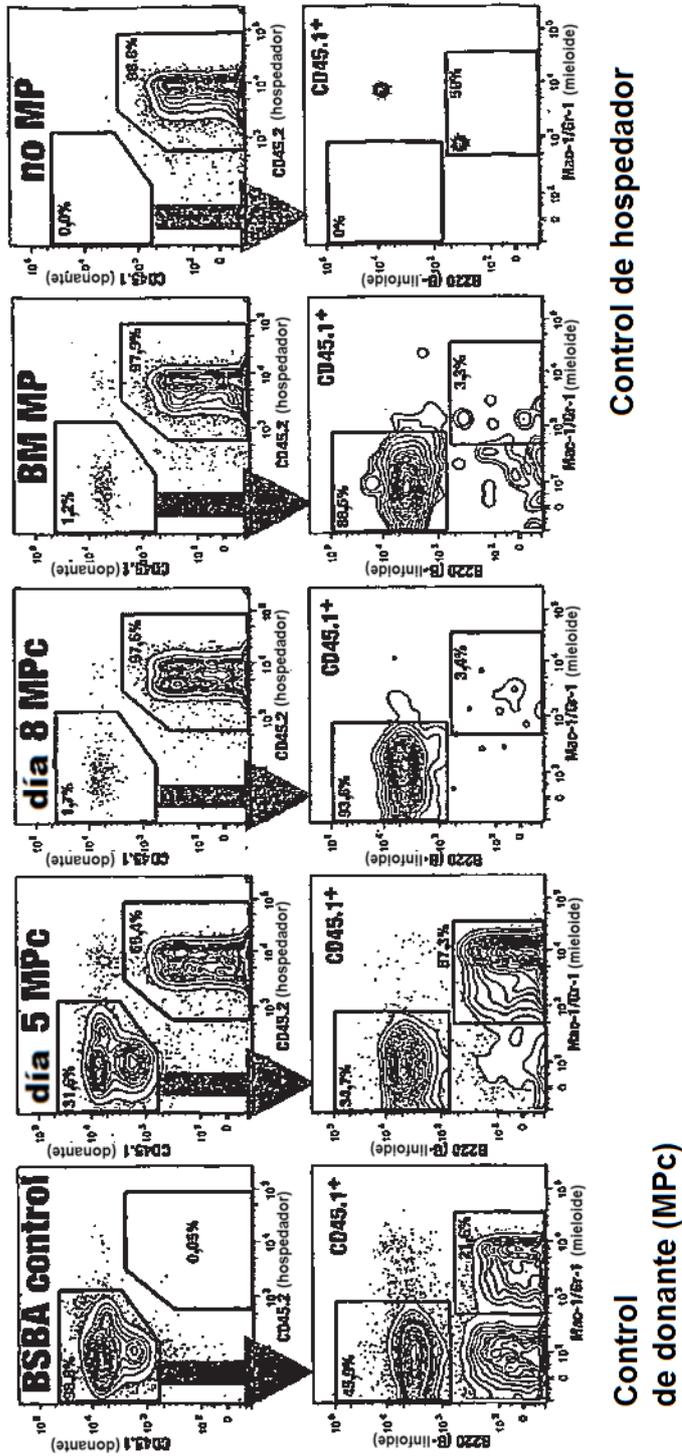


FIG._5

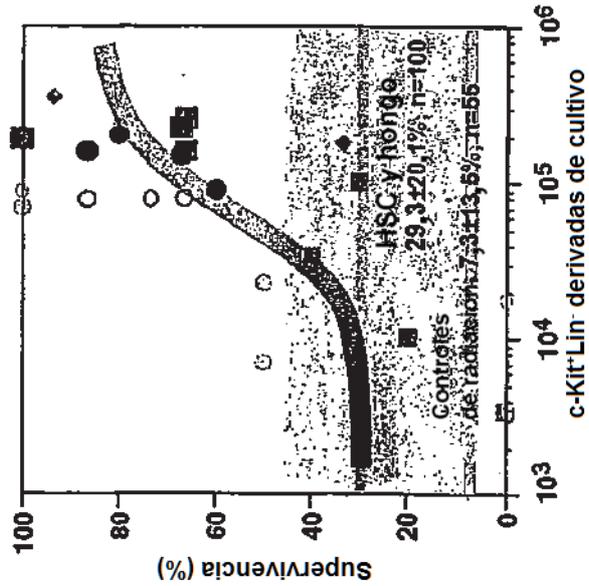
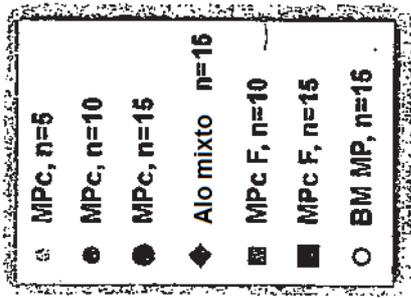
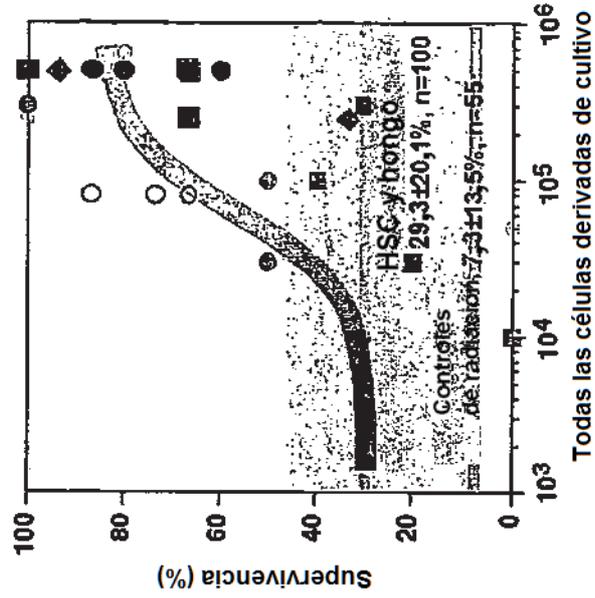


FIG. 6B

FIG. 6A

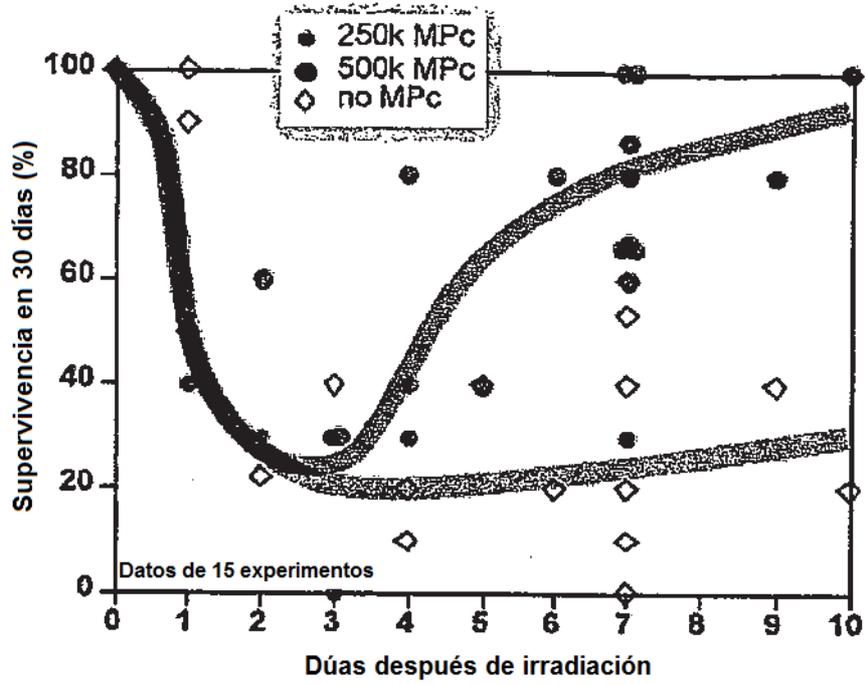


FIG._7

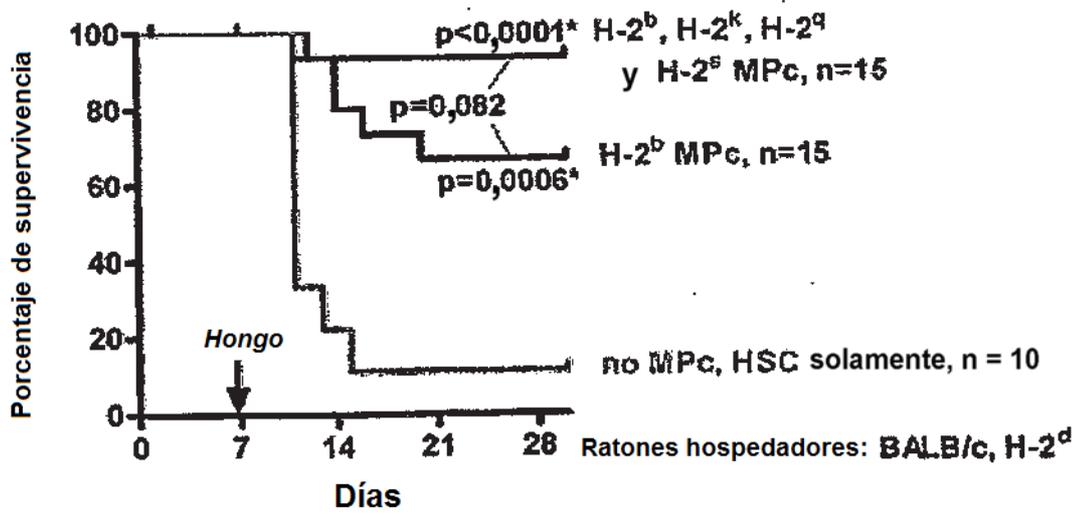


FIG. 8

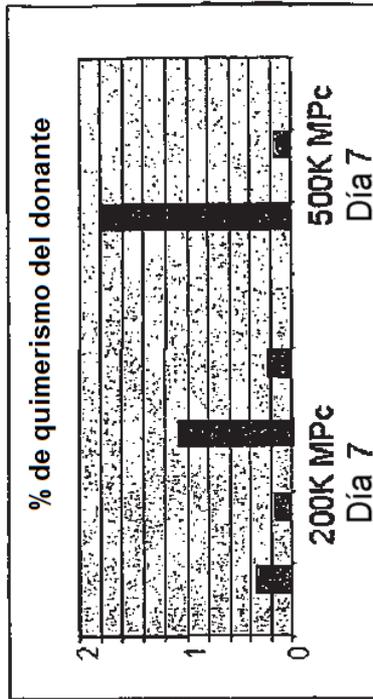
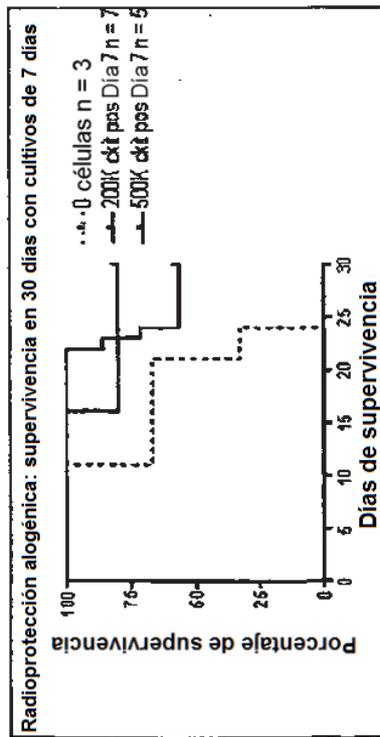


FIG. 9B



% de donante promedio (Intervalo)	
200K	0,46 (0,23-1,11%)
500K	0,97 (0,16-1,78%)

FIG. 9A

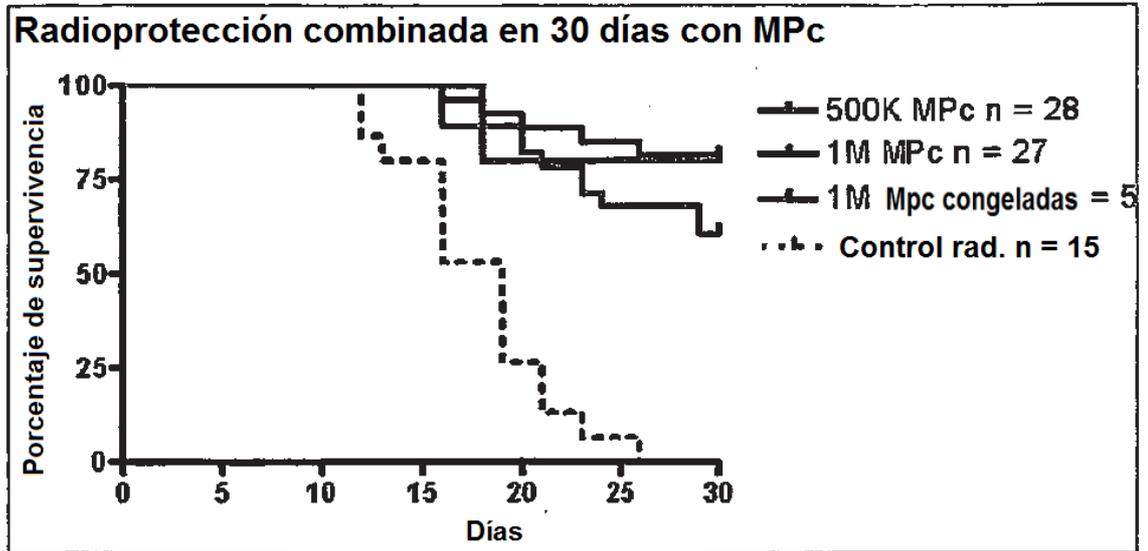


FIG._10

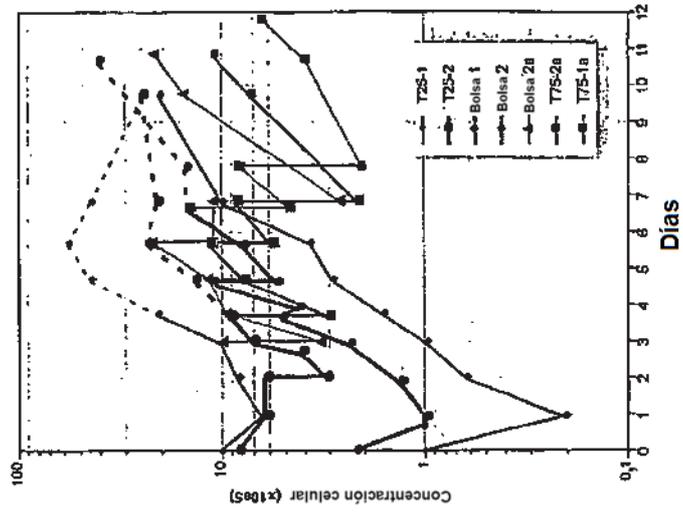


FIG._11B

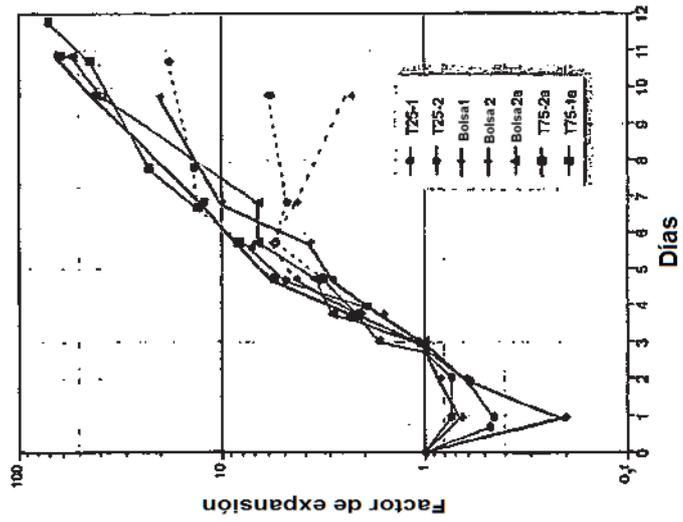


FIG._11A

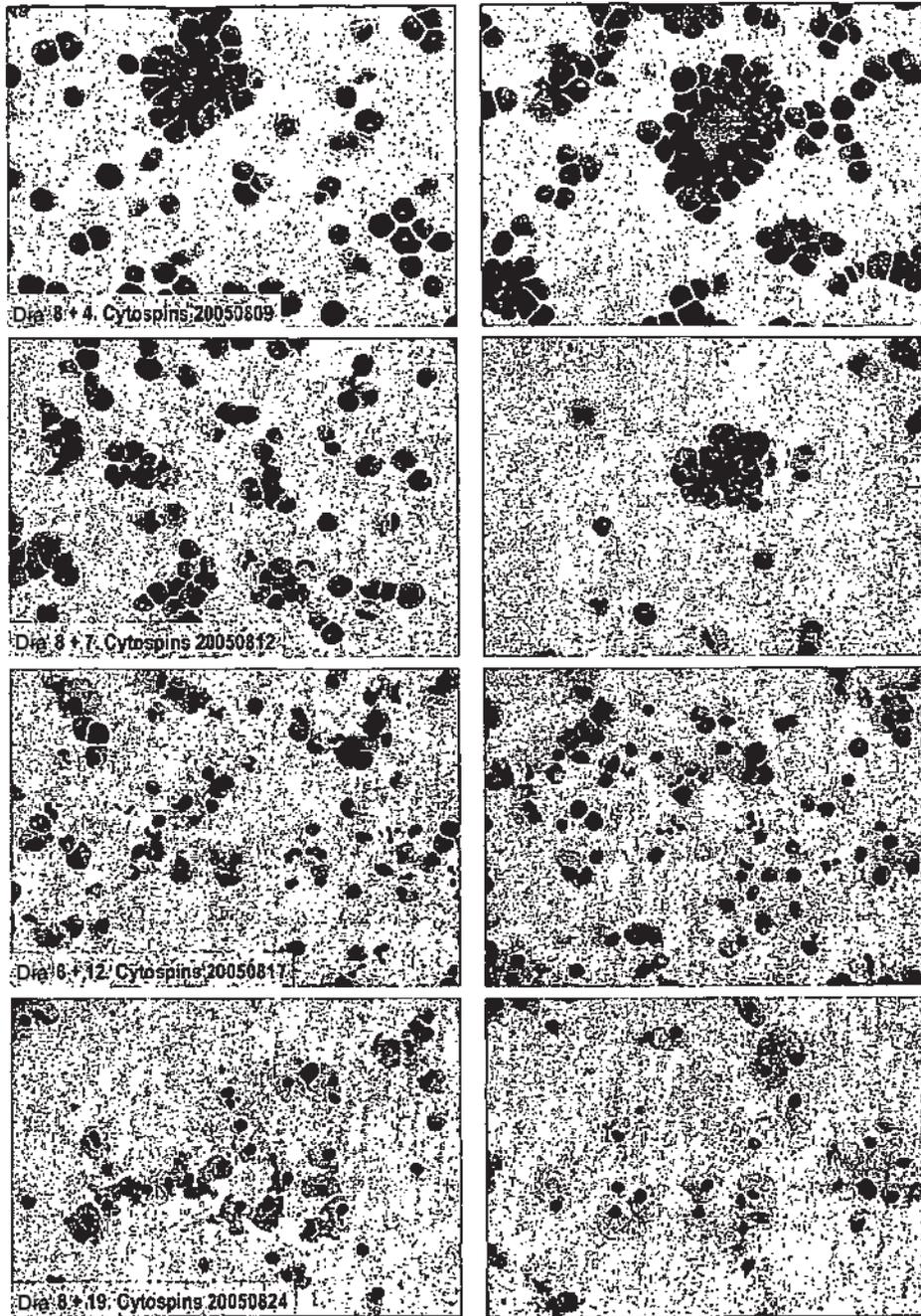


FIG. 12

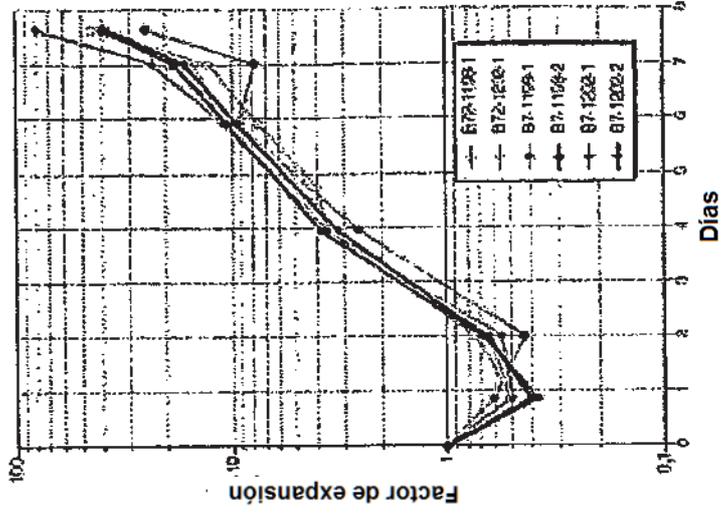


FIG._13B

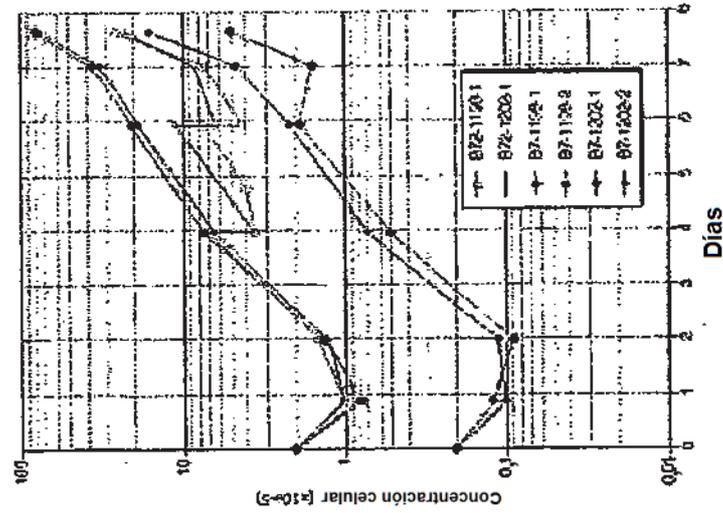


FIG._13A

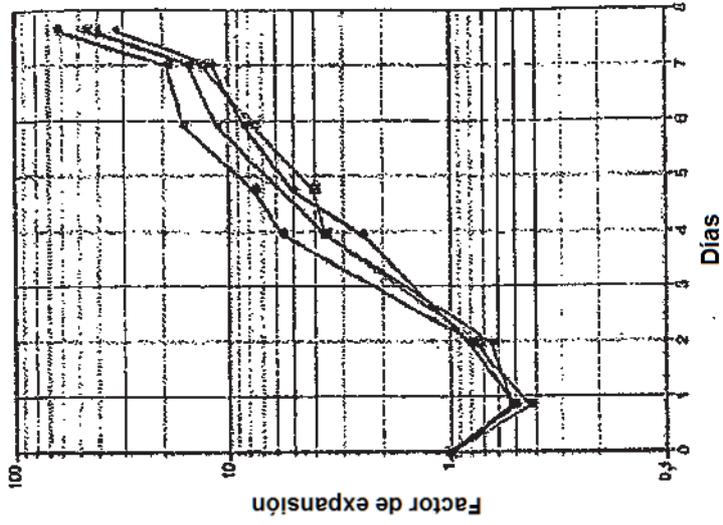


FIG._14B

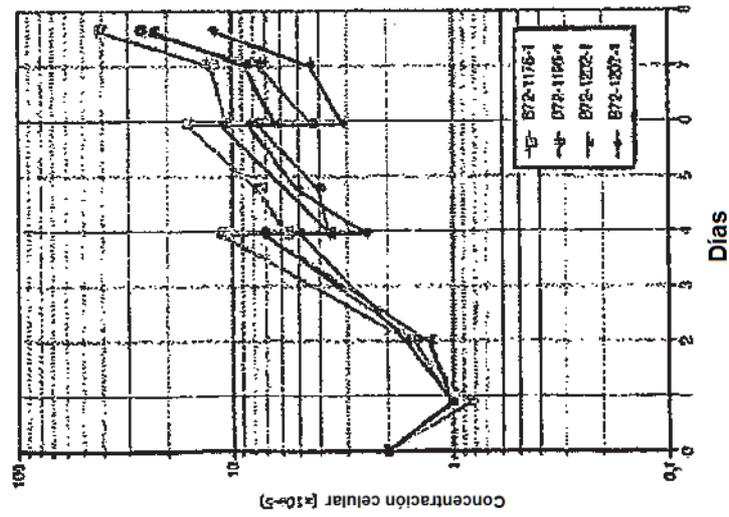


FIG._14A

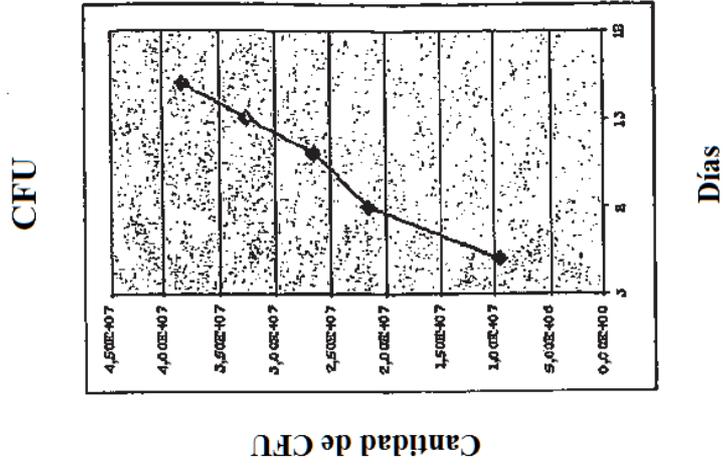


FIG. 15B

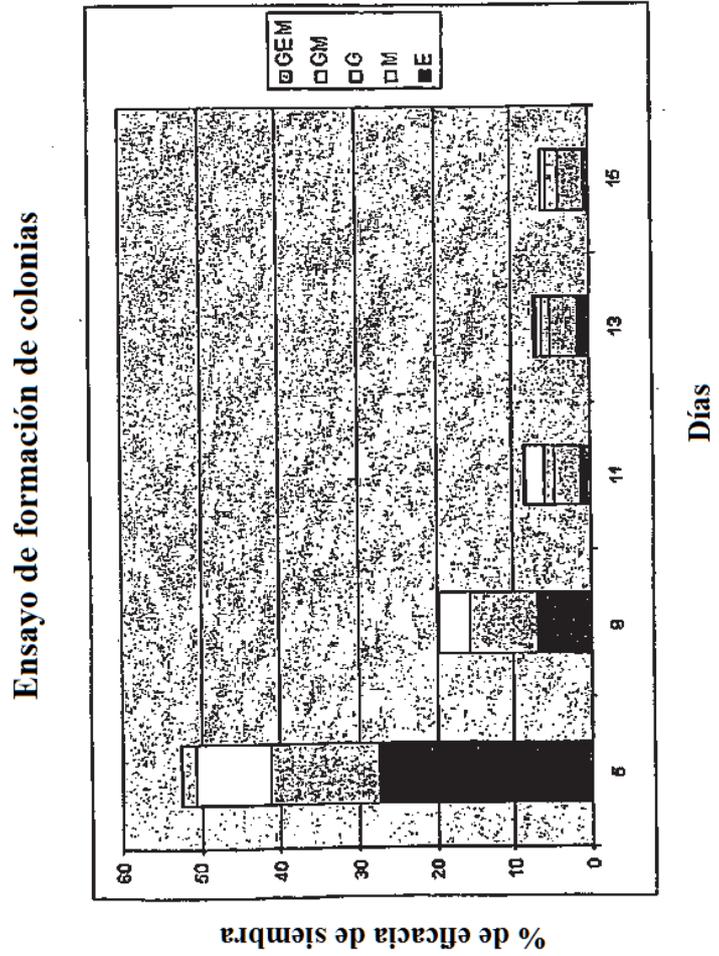


FIG. 15A

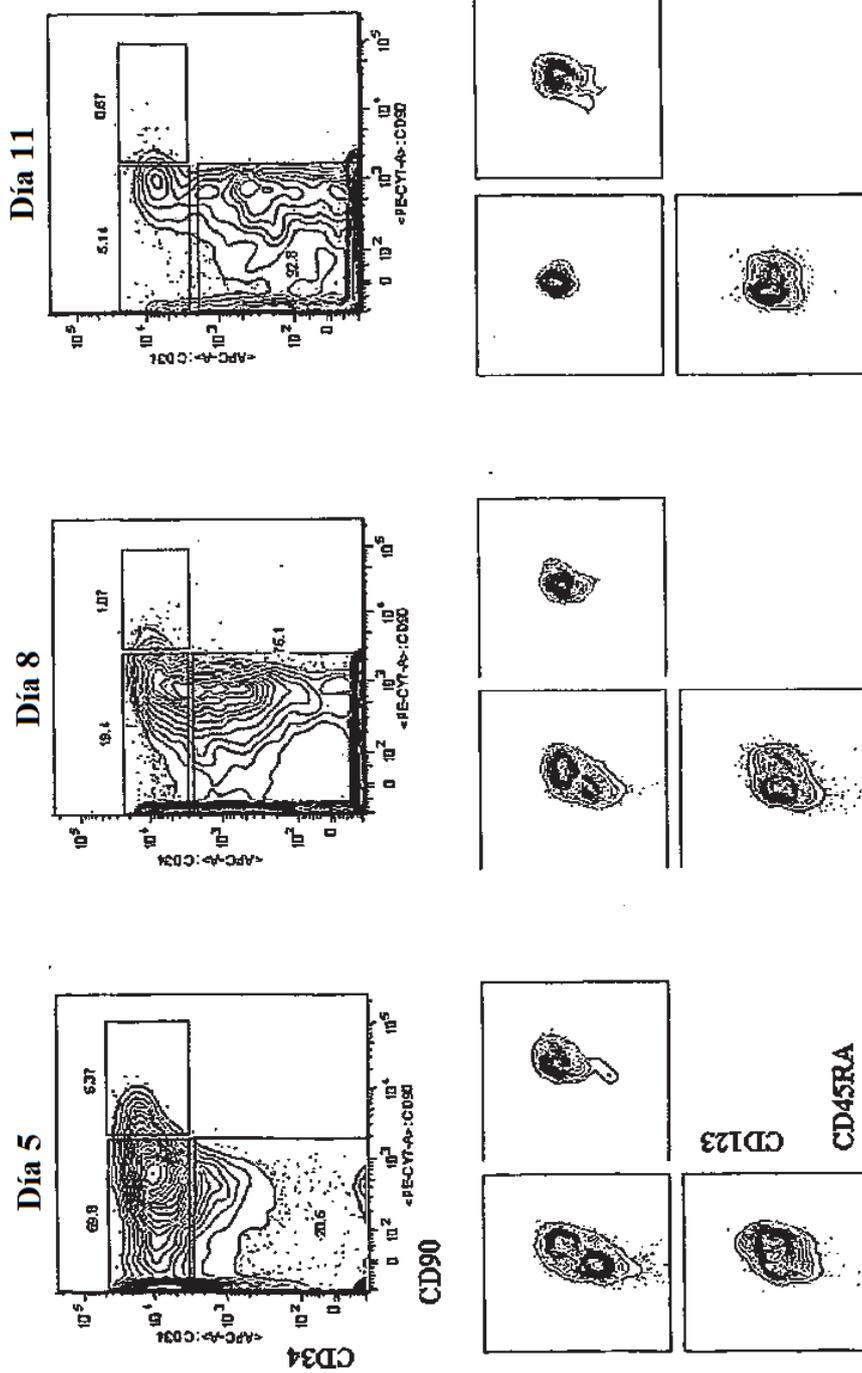


FIG._16

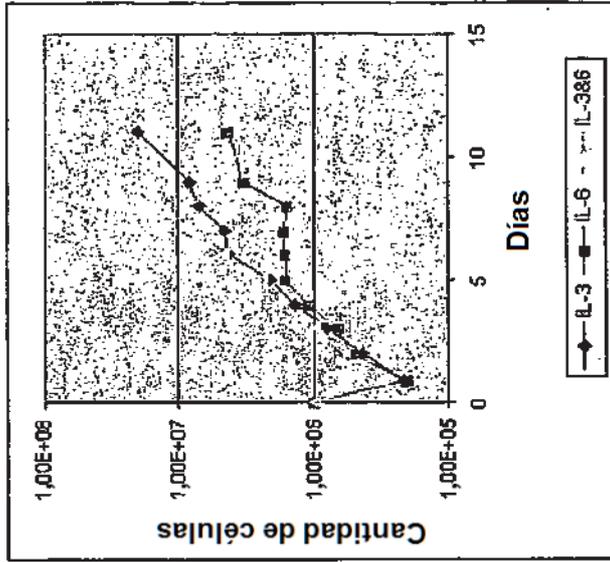


FIG. 17 B

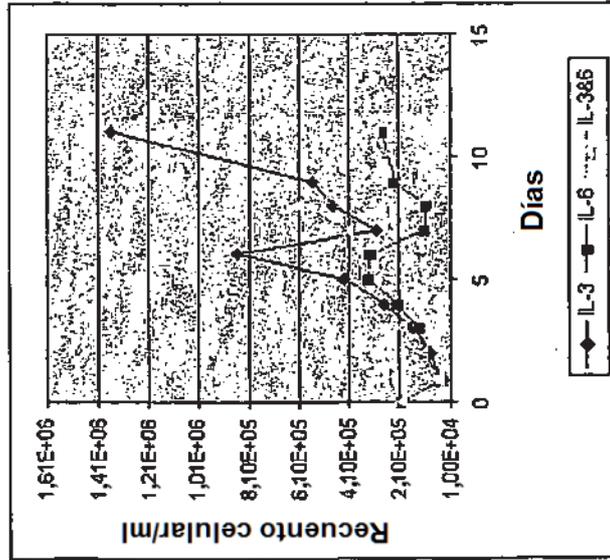


FIG. 17 A

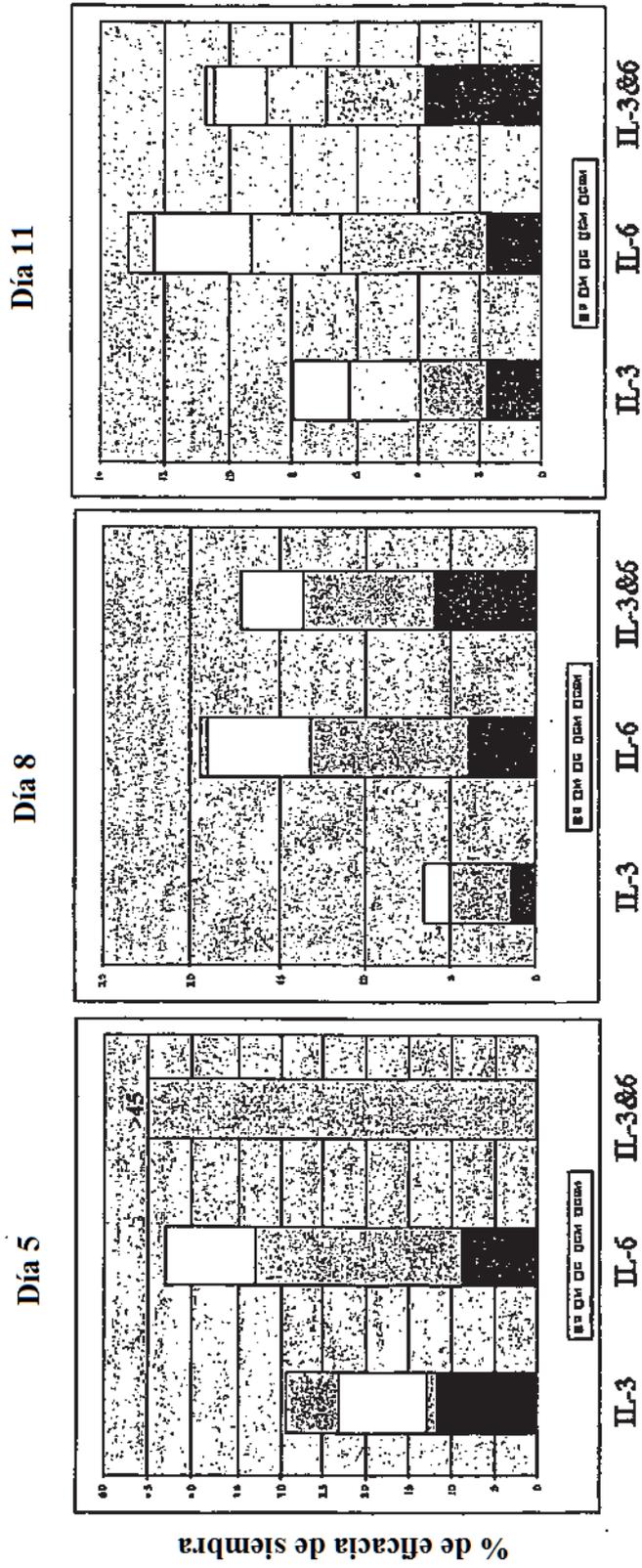


FIG._18C

FIG._18B

FIG._18A

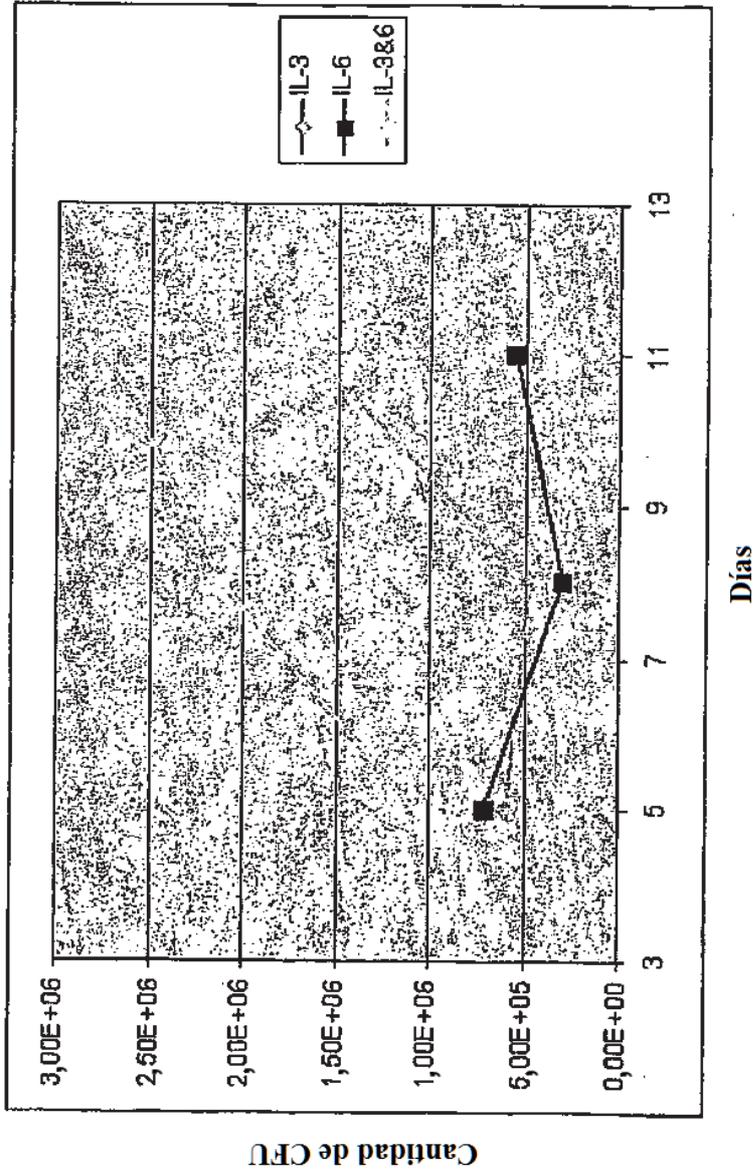


FIG._19

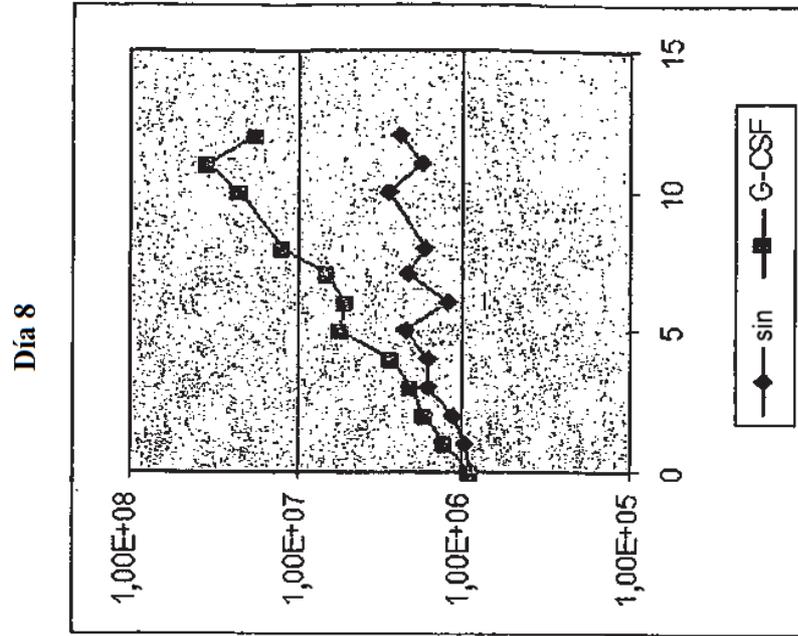


FIG. 20B

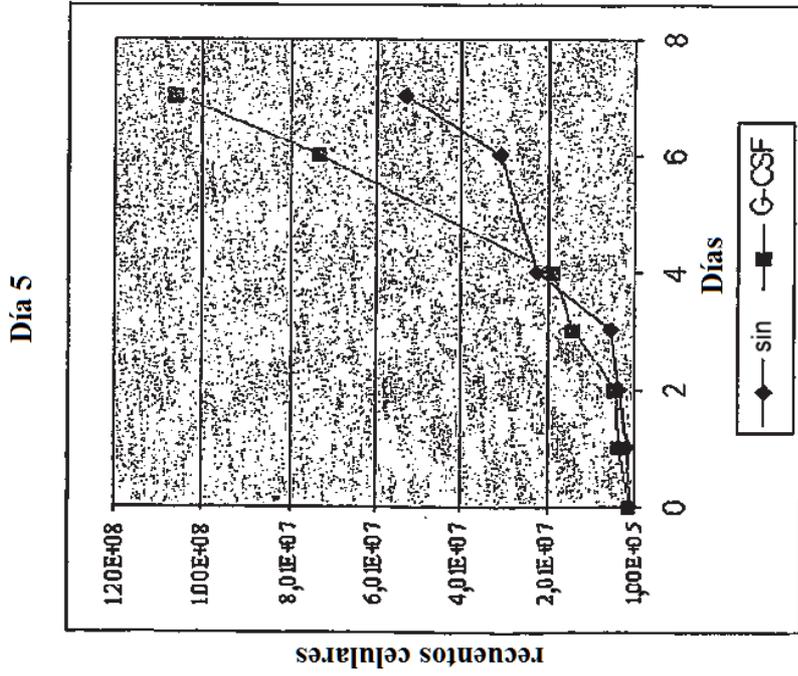


FIG. 20A

Cronología

Experimento *in vivo*: D8 MPc
 1,5E+07 células/ratón i.v.
 125 µg G-CSF/ratón s.c.
 50 µl anti-Asialo i.p.

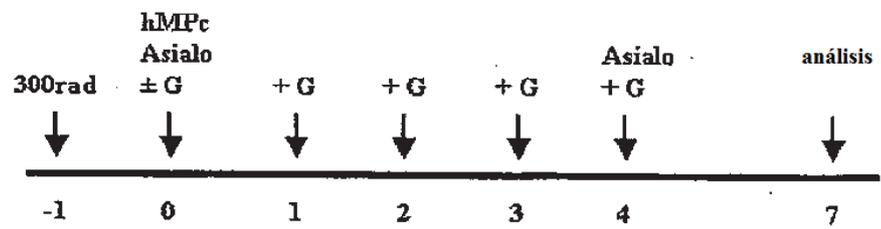


FIG._21

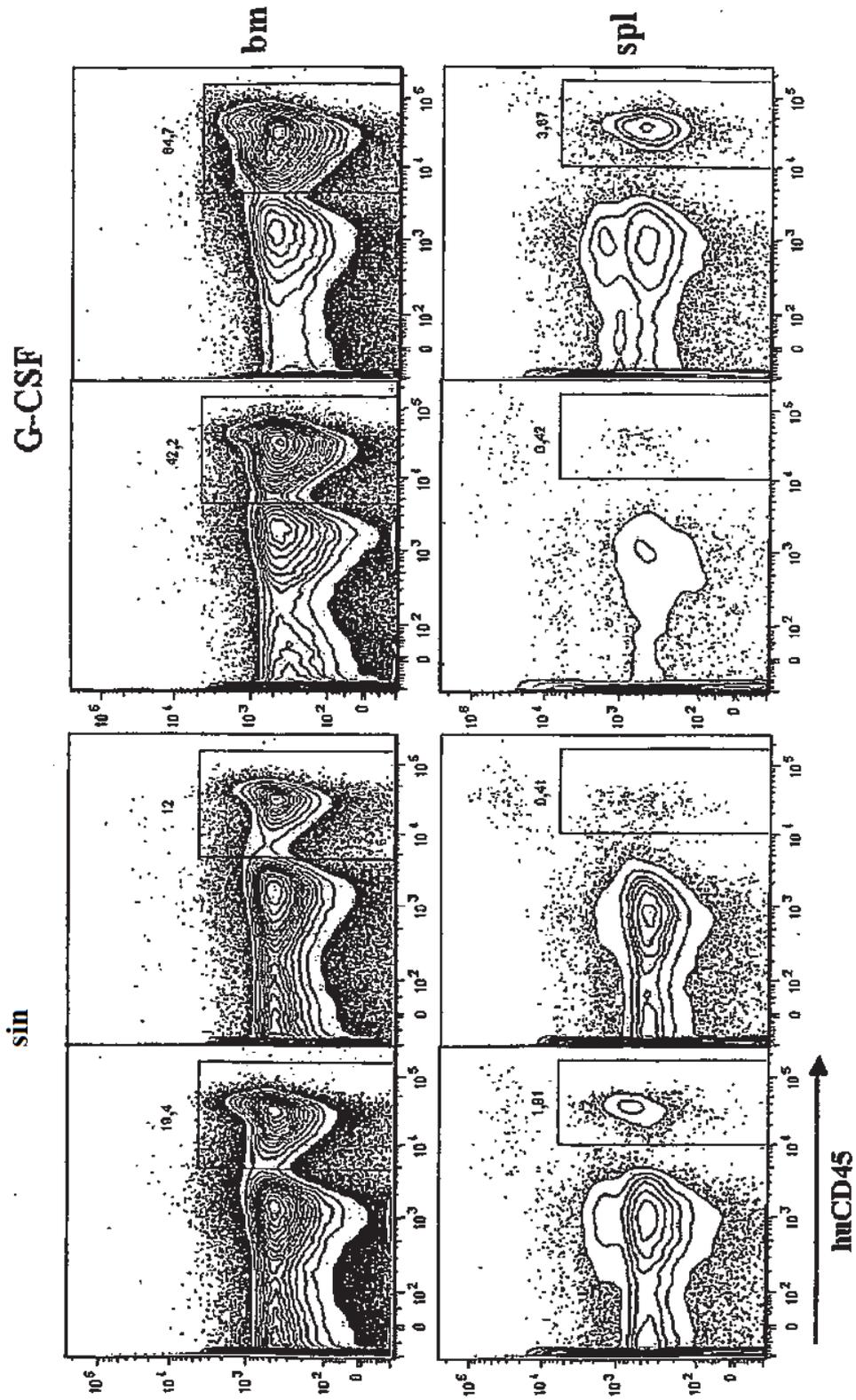


FIG._22

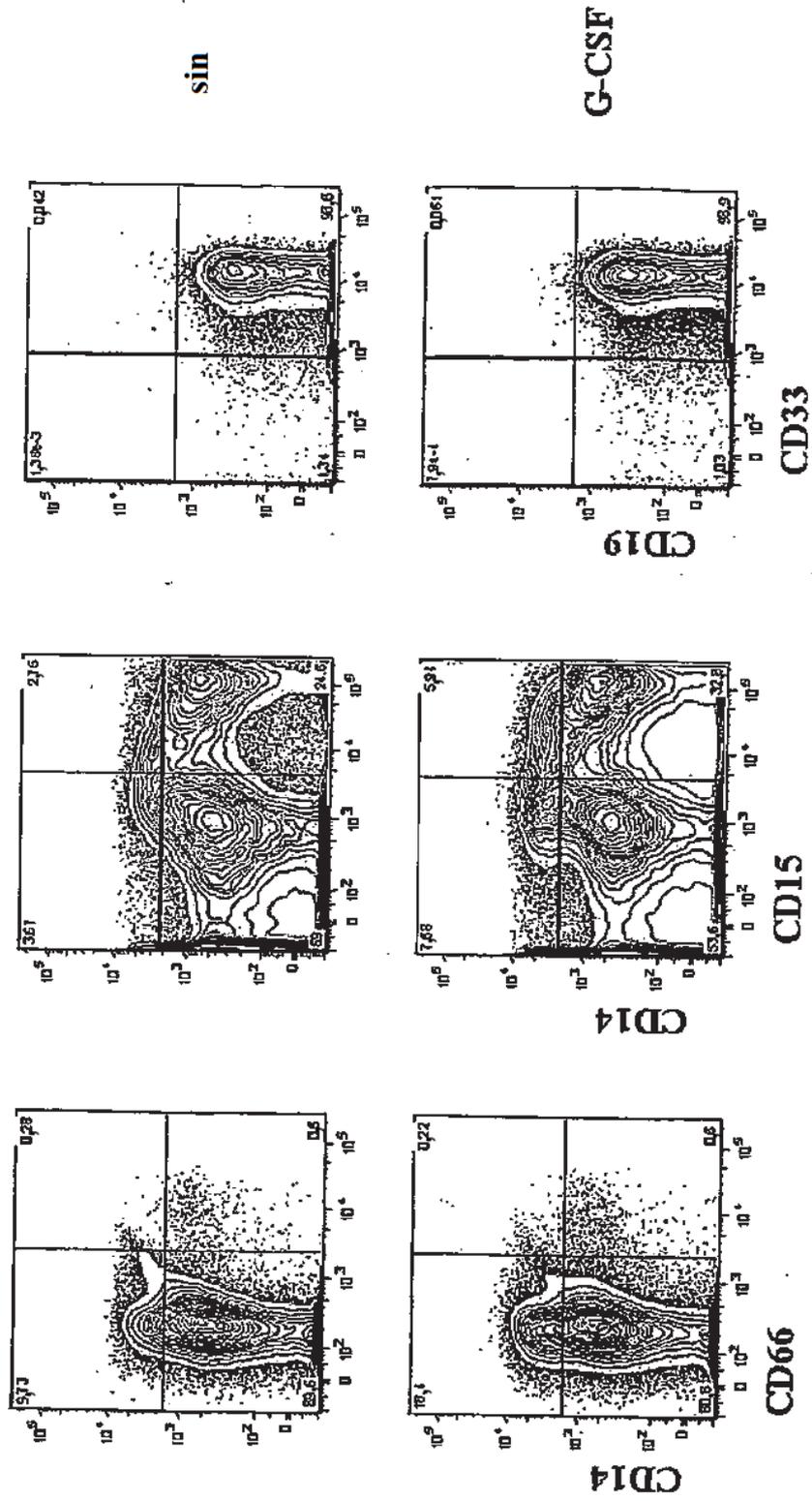


FIG. 23