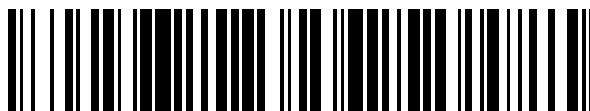


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 524**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/078** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03754548 .0**  
96 Fecha de presentación: **12.09.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1536688**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Célula progenitora de megacariocitos de mamífero**

30 Prioridad:  
**13.09.2002 US 410490 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.04.2012**

73 Titular/es:  
**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY  
OFFICE OF TECHNOLOGY LICENSING 1705 EL  
CAMINO REAL  
PALO ALTO, CA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:  
**NAKORN, Thanyaphong Na;  
MYIAMOTO, Toshihiro y  
WEISSMAN, Irving, L.**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 378 524 T3

## DESCRIPCIÓN

Célula progenitora de megacariocitos de mamífero

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0001]** El sistema hematopoyético comprende poblaciones dinámicas de glóbulos sanguíneos que incluyen eritrocitos, linfocitos, monocitos, células polimorfonucleares, por ejemplo, basófilos, eosinófilos y neutrófilos; y megacariocitos. Todas estas diversas células se derivan del citoblasto hematopoyético pluripotente. A lo largo de una serie de divisiones de células hay una diferenciación de uno de estos linajes. Se cree que, al menos *in vivo*, después de cada división de células, el potencial de desarrollo de las células hijas es o bien mantenido o bien limitado adicionalmente con respecto al padre, nunca expandido. Por tanto, se observa que los citoblastos pluripotentes dan lugar a células progenitoras comprometidas de múltiple linaje que dan lugar a linajes específicos y finalmente a células maduras. Los cambios coordinados de propiedades celulares que conducen a restricción irreversible del compromiso de linaje pueden ser debidos a activación secuencial o silenciamiento de diversos genes.

**[0002]** Se ha mostrado que la médula ósea de ratón sin fraccionar contiene múltiples tipos de unidades formadoras de colonias (UFC) que incluyen UFC multipotentes para todas las células mieloides (UFC-GEMM o UFC-Mix), UFC bipotentes para granulocitos y macrófagos (UFC-GM), para megacariocitos y eritrocitos (UFC-MegE), además de UFC monopotentes para granulocitos (UFC-G), macrófagos (UFC-M), eritrocitos (UFC-E) o megacariocitos (UFC-MK).

**[0003]** Se han caracterizado individualmente tres poblaciones diferentes de progenitores mieloides: progenitores mieloides comunes (CMP), progenitores de granulocitos/monocitos (GMP) y progenitores de megacariocitos/eritrocitos (MEP). Las CMP dan lugar a todos los linajes mieloides, mientras que las GMP y MEP dan lugar a células en los linajes de granulocitos/monocitos y megacariocitos/eritrocitos, respectivamente. La capacidad de diferenciación restringida y el compromiso de linaje de estas células se ha demostrado claramente por ensayo tanto en cultivo *in vitro* como de trasplante *in vivo* por Akashi y col. (2000) Nature 404, 193-197; y Na Nakorn y col. (2002) J. Clin. Invest. 109, 1579-1585. Si los progenitores monopotentes para cada linaje mieloides existen o no del mismo modo tiene todavía que demostrarse, ya que se han aislado y probado prospectivamente para los potenciales de diferenciación *in vitro* e *in vivo* al nivel clónico.

**[0004]** En el linaje megacariocítico se cree ampliamente que las UFC-MK se derivan de progenitores comprometidos con megacariocitos (MKP) monopotentes en la médula ósea. Véase, por ejemplo, Burstein y col. (1979) Blood 54, 169-179; Long y col. (1982) J. Cell. Physiol. 112, 339-344; Long y col. (1984) J. Clin. Invest. 74, 1686-1692; y Paulus y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4410-4414.

**[0005]** El uso de células progenitoras comprometidas con linaje salva muchos de los problemas que se producirían a partir de la transferencia de células maduras, y proporciona un medio para cribar agentes con actividad altamente específica. Sin embargo, tales células progenitoras deben separarse de otras células hematopoyéticas. La separación requiere identificación de la célula y caracterización de diferencias fenotípicas que pueden utilizarse en un procedimiento de separación. Las células que están dispuestas a manipulación genética son particularmente deseables.

45 *Bibliografía relevante*

**[0006]** Se han publicado varios artículos de revisión que tratan el fenotipo de células en linajes hematopoyéticos. El desarrollo global del sistema hematopoyético se trata en Orkin (1996) Curr. Opin. Genet. Dev. 6:597-602. La función de factores de transcripción en la regulación de la diferenciación hematopoyética se trata en Georgopoulos y col. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:155-176; y Singh (1996) Curr. Opin. Immunol. 8:160-165. El fenotipo de citoblastos hematopoyéticos se trata en Morrison & Weissman (1994) Immunity 1, 661-673; Spangrude y col. (1988) Science 241, 58-62; Enver y col. (1998) Blood 92, 348-351; discusión 352; Uchida y col. (1994) Blood 83, 3758-3779; Morrison y col., The aging of hematopoietic stem cells. Nat Med 2, 1011-1016 (1996).

## 55 RESUMEN DE LA INVENCION

**[0007]** Se proporciona una población de células hematopoyéticas de mamífero sustancialmente enriquecida que se caracteriza como una célula progenitora comprometida con el linaje de megacariocitos, en este documento se denomina en lo sucesivo células MKP. Estas células dan lugar exclusivamente a megacariocitos y plaquetas como se demuestra por su crecimiento y diferenciación *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, las MKP ni tienen actividad formadora de colonias en el bazo ni contribuyen a la hematopoyesis de múltiples linajes a largo plazo, pero dan lugar

a plaquetas durante aproximadamente 3 semanas. Las células MKP son útiles en trasplante, para evaluación experimental y como fuente de linaje y productos específicos de célula, incluyendo especies de ARNm útiles en la identificación de genes específicamente expresados en estas células, y como dianas para el descubrimiento de factores o moléculas que pueden afectarlas.

**[0008]** La selección positiva para la expresión de CD9, CD41 y CD34 se usa para separar las células progenitoras comprometidas con megacariocitos de progenitores menos comprometidos y de megacariocitos maduros. Opcionalmente, la población de células también puede seleccionarse negativamente para la expresión de un panel de linaje; Thy-1 (CD90); y/o IL-7R $\alpha$ .

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0009]** FIG. 1. Identificación de MKP en médula ósea de ratón. A) Análisis de citometría de flujo de médula ósea después de disminuirse las células positivas para linaje con perlas magnéticas. Las puertas de clasificación para MKP se muestran en el panel superior. La frecuencia de MKP se muestra con respecto a las células de la médula ósea nucleadas totales antes de la disminución negativa. El re-análisis después de la primera ronda de clasificación encontró que las MKP era una población limpiamente aislable (panel inferior). B) Las MKP fueron células similares a mieloblasto sin rasgos característicos de megacariocitos (tinción con Giemsa, aumento original x1000). C) El análisis del contenido de ADN mostró que las MKP eran células diploides. Después de una incubación de 5 días con SCF y Tpo, en el cultivo se encontraron megacariocitos poliploides (16N).

**[0010]** FIG. 2. Formación de colonias clonogénicas de megacariocitos. A) Morfología de UFC-MK y UFR-MK típicas derivadas de MKP en el día 10 de cultivo (contraste de fase; aumento original 100x para UFC-MK, 40x para UFR-MK). B) Megacariocitos maduros de una única colonia (Giemsa; aumento original 200x y 1000x). C) Lecturas de colonias en el día 10 de progenitores individuales en metilcelulosa que contiene SCF, ligando Flt3, IL-3, IL-11, GM-CSF, Epo y Tpo. Se puntuaron un total de 270 pocillos depositados con un único progenitor. Las CMP dieron lugar a todos los tipos de colonias mieloides con eficiencia de siembra en placa superior al 80%. Las MEP dieron lugar a colonias de tanto megacariocitos como eritroides, mientras que las MKP formaron exclusivamente colonias de megacariocitos.

**[0011]** FIG. 3. Diferenciación *in vivo* de MKP. A) Histología del bazo en el día 8 (hematoxilina y eosina, aumento original: control y MEP = 200x, MKP = 400x y recuadro = 1000x). Los ratones se irradiaron mortalmente, luego se inyectaron sin célula (control), 1000 MKP o 500 MEP. Las MKP dieron lugar a focos microscópicos de megacariocitos (Meg), mientras que las MEP formaron grandes colonias que sólo estaban constituidas por células eritroides (E). No se observaron colonias eritroides o de megacariocitos en los animales de control. B) Representaciones de FACS representativas de plaquetas en la sangre periférica de ratones receptores 14 días después de recibir los progenitores purificados de donantes transgénicos para la GFP  $\beta$ -actina. Los glóbulos sanguíneos se seleccionaron primero en la dispersión frontal y la dispersión lateral. Los porcentajes de células GFP<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup> en la selección de plaquetas se muestran en los recuadros. C) Las MKP generaron plaquetas *in vivo* durante 3 semanas. La cinética del injerto funcionante de plaquetas de 3000 MKP fue similar a 10.000 CMP y MEP (líneas de rayas). A diferencia, 10.000 GMP no generaron plaquetas detectables en ningún momento de tiempo del análisis (línea negra). El umbral para detectar plaquetas GFP<sup>+</sup> en la población completa fue 1 en 100.000.

**[0012]** FIG. 4. Relaciones de linaje entre progenitores mieloides. Análisis de citometría de flujo para células con el fenotipo de MKP en el cultivo de CMP y MEP. Se observan más MKP presentes en el cultivo de CMP.

## DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ESPECÍFICAS

**[0013]** Se proporcionan células progenitoras hematopoyéticas de mamífero comprometidas con el linaje de megacariocitos, en este documento se llama progenitor de megacariocitos, o MKP. La población de MKP es útil en trasplante; para el cribado de fármacos; modelos experimentales de diferenciación e interacción hematopoyética; ensayos de cribado *in vitro* para definir factores de crecimiento y de diferenciación, y para caracterizar genes implicados en el desarrollo y la regulación de megacariocitos; y similares. Pueden usarse células nativas para estos fines, o pueden modificarse genéticamente para proporcionar capacidades alteradas.

**[0014]** Las células progenitoras de megacariocitos pueden separarse de una mezcla compleja de células usando reactivos que reconocen específicamente marcadores sobre la superficie celular. Las células MKP expresan niveles detectables de los marcadores CD41, CD9 y CD34. Opcionalmente, las células pueden seleccionarse adicionalmente para una falta de expresión de los marcadores Thy-1 (CD90), IL-7R $\alpha$  (CD127); y/o con un panel de linaje de marcadores, como se describe adicionalmente más adelante. Otros marcadores de interés incluyen expresión positiva de CD38 y c-kit (CD117).

[0015] Las plaquetas desempeñan una función esencial en la hemostasia y la trombosis. Se producen a partir de los megacariocitos de la médula ósea y surgen de la fragmentación del citoplasma. Si el nivel de plaquetas en circulación disminuye por debajo de un cierto número (trombocitopenia), un paciente corre el riesgo de una hemorragia catastrófica. Los pacientes con cáncer que han recibido quimioterapia o trasplantes de médula ósea normalmente tienen trombocitopenia, y la lenta recuperación del número de plaquetas en estos pacientes ha sido una preocupación. La demanda de unidades de plaquetas para transfusión ha ido aumentando regularmente principalmente debido a la necesidad de mantener un cierto nivel de plaquetas en tales pacientes con cáncer o aquellos que se someten a cirugía cardíaca mayor. Además de su uso en pacientes con trombocitopenia, los agentes que aumentan el número de plaquetas pueden considerarse para la administración a donantes normales de plaquetas.

[0016] Las pruebas preclínicas de TPO de longitud completa o una molécula derivada pegilada truncada han producido resultados impresionantes, con un aumento dependiente de la dosis en el número de plaquetas periféricas en el plazo de 4 a 6 días después de la administración de TPO. Sin embargo, una preocupación es la eficacia de TPO administrada después de la terapia citotóxica, ya que el fármaco sólo puede ser eficaz cuando los citoblastos o células progenitoras apropiados están disponibles para la expansión y diferenciación. La presente invención proporciona una fuente de células progenitoras de megacariocitos altamente purificadas que se muestra que da lugar a plaquetas *in vivo*. Las células también son útiles en la prueba de agentes tales como factores de crecimiento y/o de diferenciación para la estimulación de trombogénesis.

#### CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

[0017] Se entenderá por aquellos expertos en la materia que los niveles de expresión establecidos reflejan cantidades detectables de la proteína marcadora sobre la superficie celular. Una célula que es negativa para la tinción (el nivel de unión de un reactivo específico de marcador no es detectablemente diferente de un control del mismo isotipo) puede todavía expresar cantidades menores del marcador. Y, aunque es común en la materia referirse a células como "positivas" o "negativas" para un marcador particular, los niveles de expresión reales son un rasgo cuantitativo. El número de moléculas sobre la superficie celular puede variar varios logaritmos y, sin embargo, se caracterizan como "positivas".

[0018] La intensidad de la tinción de células puede monitorizarse por citometría de flujo, en la que los láseres detectan los niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de marcador de la superficie celular unido por reactivos específicos, por ejemplo, anticuerpos). La citometría de flujo, o FACS, también puede usarse para separar poblaciones de células basándose en la intensidad de unión a un reactivo específico, además de otros parámetros tales como tamaño de las células y dispersión de la luz. Aunque el nivel de tinción absoluto puede diferenciarse con un fluorocromo particular y preparación de reactivo, los datos pueden normalizarse a un control.

[0019] Con el fin de normalizar la distribución a un control, cada célula se registra como un punto de datos que tiene una intensidad de tinción particular. Estos puntos de datos pueden mostrarse según una escala logarítmica en la que la unidad de medida es intensidad de tinción arbitraria. En un ejemplo, las células teñidas más brillantes en una muestra pueden ser nada menos que 4 logaritmos más intensas que las células sin teñir. Cuando se muestran de este modo, es evidente que las células que se encuentran en el mayor logaritmo de intensidad de tinción son más brillantes, mientras que aquellas en la menor intensidad son negativas. Las células teñidas positivamente "bajas" tienen un nivel de tinción superior al brillo de un control del mismo isotipo, pero no es tan intenso como las células que se tiñen más brillantemente normalmente encontradas en la población. Un control alternativo puede utilizar un sustrato que tiene una densidad de marcador definida sobre su superficie, por ejemplo, una perla fabricada o línea celular que proporciona el control positivo para la intensidad.

#### MARCADORES

[0020] Las células MKP son positivas para la expresión de CD34. CD34 es un antígeno de superficie de células monoméricas con una masa molecular de aproximadamente 110 kD que se expresa selectivamente en células progenitoras hematopoyéticas humanas. El gen se expresa por células endoteliales receptoras pequeñas, además de células progenitoras hematopoyéticas, y es una glicoproteína transmembrana pesadamente O-glicosilada de 105-120 kDa monocaténaria. La secuencia se desvela por Simmons y col. (1992) J. Immun. 148:267-271. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., número de catálogo 550760.

[0021] Las células MKP expresan el antígeno CD9 tetraspanina. El antígeno CD9 es una molécula de 227 aminoácidos con 4 dominios hidrófobos y 1 sitio de N-glicosilación. El antígeno se expresa ampliamente, pero no está presente en ciertas células progenitoras en los linajes hematopoyéticos. CD9 interactúa con la familia de la

integrina y otras proteínas de la membrana, y se da por supuesto que participa en la migración y adhesión de células. Véase, por ejemplo, Boucheix y col. (1991) J. Biol. Chem. 266:117-122. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., número de catálogo 559456.

**[0022]** Las células MKP expresan CD41, también denominado en lo sucesivo la integrina glicoproteína IIb/IIIa, que es el receptor plaquetario para fibrinógeno y varias otras moléculas de la matriz extracelular. GP IIIa es una proteína de 788 aminoácidos que incluye un péptido señal del extremo amino de 26 residuos, un dominio transmembrana de 29 residuos próximo al extremo carboxi y 4 dominios ricos en cisteína repetidos en tándem de 33-38 residuos. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., número de catálogo 340929, 555466.

**[0023]** Las células MKP son positivas para la expresión de CD117. CD117 reconoce el receptor tirosina cinasa c-Kit. Este receptor participa particularmente con citoblastos, que incluyen citoblastos hematopoyéticos. También existen múltiples isoformas de c-Kit como resultado del corte y empalme de ARNm alterno, escisión proteolítica y el uso de promotores internos crípticos en ciertos tipos de células. Estructuralmente, c-Kit contiene cinco dominios similares a inmunoglobulina extracelularmente y un dominio catalítico dividido en dos regiones por un inserto de 77 aminoácidos intracelularmente; la secuencia puede encontrarse en Yarden y col. (1987) EMBO J. 6 (11):3341-3351. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., nº de cat. 340529.

**[0024]** Las células MKP son positivas para la expresión de CD38. CD38 es una proteína transmembrana de tipo II de 300 aminoácidos con una cola citoplásmica corta en el extremo N y 4 sitios de N-glicosilación extracelulares en el extremo C. La secuencia se desvela por Jackson y col. (1990) J. Immun. 144: 2811-2815. El marcador está generalmente asociado a linfocitos, mieloblastos y eritroblastos. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., número de catálogo 347680.

**[0025]** Las células MKP tienen el fenotipo de falta de expresión de marcadores específicos de linaje. Para los fines de tinción puede usarse una mezcla de reactivos de unión, designada en este documento "lin". El panel de lin comprenderá reactivos de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión funcional de los mismos, ligandos, peptidomiméticos, etc., que reconocen dos o más de los marcadores de linaje. Un panel de lin incluirá generalmente al menos un marcador expresado sobre linfocitos B maduros, sobre linfocitos T maduros, sobre granulocitos maduros y sobre macrófagos maduros. Los marcadores adecuados para su uso en un panel de linaje se expresan normalmente sobre estas células maduras, pero no están presentes en múltiples linajes, o en citoblastos y células progenitoras. Los marcadores de linaje pueden incluir CD2; CD3; CD4; CD7; CD8; CD10; CD11b; CD14; CD19; CD20; CD56; y glicoforina A (GPA) en seres humanos y CD2; CD3; CD4; CD8; CD19; IgM; Ter110; Gr-1 en ratones.

**[0026]** Las células MKP son negativas para la expresión de Thy-1 (CD90), que es una molécula de 25-35 kD expresada en el 1-4% de células de hígado fetal humano, glóbulos sanguíneos de la médula espinal y células de la médula ósea. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., número de catálogo 555595.

#### PROCEDIMIENTOS DE ENRIQUECIMIENTO

**[0027]** Se proporcionan procedimientos para enriquecer células MKP. La población de células enriquecida tendrá normalmente al menos aproximadamente el 80% de células del fenotipo seleccionado, más normalmente al menos el 90% células, y puede ser el 95% de las células o más del fenotipo seleccionado. Las poblaciones de células de sujetos se separan de otras células, por ejemplo, células hematopoyéticas, basándose en marcadores específicos que se identifican con reactivos de afinidad, por ejemplo, anticuerpos monoclonales.

**[0028]** Las poblaciones de células *ex vivo* e *in vitro* útiles como fuente de células pueden incluir células frescas o congeladas que pueden ser fetales, neonatales, juveniles o adultas, que incluyen médula ósea, bazo, hígado, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, sangre periférica movilizada, saco vitelino, etc. Para autotrasplante o alotrasplante, la médula ósea y la sangre periférica movilizada son los materiales de partida preferidos. Para sangre periférica, las células progenitoras se movilizan del compartimento medular a la circulación sanguínea periférica después del tratamiento con quimioterapia; G-CSF o GM-CSF, o ambos. Se han usado varios agentes quimioterapéuticos solos y de combinación para movilizar células. Una revisión de citoblastos de sangre periférica puede encontrarse en Shpall y col. (1997) Annu Rev Med 48:241-251, y la caracterización de la movilización de citoblastos en Moog y col. (1998) Ann Hematol 77(4):143-7. Como fuente alternativa de células, citoblastos hematopoyéticos, como se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.061.620 concedida el 29 de octubre de 1991; y 5.087.570 concedida el 11 de febrero de 1992, pueden cultivarse e inducirse para diferenciarse *in vivo* o

*in vitro* para proporcionar una fuente de células.

**[0029]** Las células progenitoras pueden obtenerse a partir de cualquier especie de mamífero, por ejemplo, humano, equino, bovino, porcino, canino, felino, roedor, por ejemplo, ratones, ratas, hámster, primate, etc. El tejido puede obtenerse por biopsia o aféresis de un donante vivo, u obtenerse de un donante muerto o moribundo en el plazo de aproximadamente 48 horas desde la muerte, o tejido recientemente congelado, tejido congelado en el plazo de aproximadamente 12 horas desde la muerte y mantenido a por debajo de aproximadamente -20°C, normalmente a aproximadamente la temperatura del nitrógeno líquido (-180°C) indefinidamente.

**[0030]** Las células MKP se caracterizan por su expresión de receptores de factores de crecimiento. Además de proporcionar un marcador conveniente para la separación, los ligandos relacionados se usan en la evaluación de receptividad para factores de crecimiento, y como ligandos para separación. Los receptores de factores de crecimiento de interés expresados en células MKP incluyen *c-kit* (CD117). Por ejemplo, el ligando *c-kit*, factor de Steel (Slf), puede usarse para identificar células que expresan *c-kit*.

**[0031]** Las células del sujeto se separan de una mezcla compleja de células por técnicas que enriquecen células que tienen las características anteriores que se seleccionan preferentemente para células CD34<sup>+</sup>, CD41<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>. Opcionalmente, las células se seleccionan adicionalmente como lin<sup>-</sup>, y pueden purificarse adicionalmente por selección para el fenotipo CD117<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, IL-7Ra<sup>+</sup>, y en el ratón, Sca-1<sup>+</sup>.

**[0032]** Para el aislamiento de células de tejido puede usarse una disolución apropiada para la dispersión o suspensión. Tal disolución será generalmente una disolución salina equilibrada, por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada con Hank, etc., convenientemente complementada con suero bovino fetal u otros factores que se producen naturalmente, conjuntamente con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5-25 mM. Tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

**[0033]** La separación de las poblaciones de células del sujeto usarán entonces separación por afinidad para proporcionar una población sustancialmente pura. Las técnicas para la separación por afinidad pueden incluir separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usarse conjuntamente con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, complemento y citotoxinas, e "inmunopurificación" con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, placa, u otra técnica conveniente. Técnicas que proporcionan separación precisa incluyen citometrías de flujo activadas por fluorescencia, que pueden tener grados variables de sofisticación, tales como múltiples canales de color, canales de detección de bajo ángulo y de dispersión de la luz obtusa, canales de impedancia, etc. Las células pueden seleccionarse contra células muertas empleando colorantes asociados a células muertas (por ejemplo, yoduro de propidio). Puede emplearse cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

**[0034]** Los reactivos de afinidad pueden ser receptores o ligandos específicos para las moléculas de la superficie celular indicada anteriormente. Además de reactivos de anticuerpo pueden usarse pares de péptido-antígeno de MHC y receptores de linfocitos T; ligandos de péptido y receptor; moléculas efectoras y receptoras, y similares. Los anticuerpos y los receptores de linfocitos T pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden producirse por animales transgénicos, animales inmunizados, linfocitos B humanos o animales inmortalizados, células transfectadas con vectores de ADN que codifican el anticuerpo o receptor de linfocitos T, etc. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión específica son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

**[0035]** Es de particular interés el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. Convenientemente, estos anticuerpos están conjugados con una marca para su uso en separación. Marcas incluyen perlas magnéticas, que permiten la separación directa, biotina, que puede eliminarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que pueden usarse con una citometría de flujo activada por fluorescencia, o similares, para permitir la fácil separación del tipo de célula particular. Los fluorocromos que se usan incluyen ficobiliproteínas, por ejemplo, ficoeritrina y alofococianinas, fluoresceína y rojo de Texas. Frecuentemente, cada anticuerpo está marcado con un fluorocromo diferente para permitir la clasificación independiente para cada marcador.

**[0036]** Los anticuerpos se añaden a una suspensión de células y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para unir los antígenos de superficie a células disponibles. La incubación será normalmente al menos aproximadamente 5 minutos y normalmente inferior a aproximadamente 30 minutos. Se desea tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de forma que la eficiencia de la separación no esté limitada por la falta de anticuerpo. La concentración apropiada se determina por valoración. El medio en el que las células se separan será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene del 0,1 a 0,5% de BSA. Diversos medios están comercialmente

disponibles y pueden usarse según la naturaleza de las células, incluyendo medio Eagle modificado por Dulbecco (dMEM), solución salina básica de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., frecuentemente complementados con suero bovino fetal, BSA, HSA, etc.

**[0037]** Entonces, las células marcadas se separan en cuanto a la expresión de los marcadores de la superficie celular como se ha descrito previamente, pudiendo limitarse una población inicial a células que son CD34<sup>+</sup>, CD41<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>. Opcionalmente, la población de células se selecciona adicionalmente basándose en la expresión de un panel de linaje; CD117, CD90, IL-7R $\alpha$ , CCD38 y/o Sca-1.

**[0038]** Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, que normalmente tiene un cojín de suero en el fondo del tubo de recogida. Diversos medios están comercialmente disponibles y pueden usarse según la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., frecuentemente complementados con suero bovino fetal.

**[0039]** Las composiciones altamente enriquecidas en actividad progenitora de megacariocitos se consiguen de este modo. La población de sujetos será el o aproximadamente el 90% o más de la composición de células, y preferentemente será el o aproximadamente el 95% o más de la composición de células. Las células deseadas se identifican por su fenotipo superficial, por la capacidad para responder a factores de crecimiento y podrán proporcionar el desarrollo *in vivo* e *in vitro* de megacariocitos y plaquetas exclusivamente. La población de células enriquecida puede usarse inmediatamente, o puede congelarse a temperaturas del nitrógeno líquido y guardarse durante largos periodos de tiempo, descongelándose y pudiendo volver a usarse. Las células se almacenarán normalmente en medio 10% de DMSO, 50% de SBF, 40% de RPMI 1640. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse usando factores de crecimiento o células del estroma asociadas a proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

#### CULTIVO *IN VITRO*

**[0040]** La población de células enriquecida puede cultivarse *in vitro* bajo diversas condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, por ejemplo, contener agar, metilcelulosa, etc. La población de células puede suspenderse convenientemente en un medio nutritivo apropiado tal como DMEM o RPMI-1640 modificado con Iscove, normalmente complementado con suero bovino fetal (aproximadamente 5-10%), L-glutamina, un tiol, particularmente 2-mercaptoetanol, y antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina.

**[0041]** El cultivo puede contener factores de crecimiento a los que las células son sensibles. Factores de crecimiento, como se define en este documento, son moléculas que pueden promover la supervivencia, crecimiento y/o diferenciación de células, tanto en cultivo como en el tejido intacto, mediante efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen polipéptidos y factores de no polipéptido. De particular interés para las células del sujeto son factores que promueven la trombopoyesis, que incluyen trombopoyetina. Factores de crecimiento específicos que pueden usarse en el cultivo de las células de sujeto incluyen factor de Steel (ligando c-kit), ligando Flk-2, IL-11, IL-3, GM-CSF, eritropoyetina y trombopoyetina. Las condiciones de cultivo específicas se eligen para lograr un fin particular, es decir, diferenciación en megacariocitos, mantenimiento de la actividad de células progenitoras, etc. Además de los propios factores, la actividad del factor puede proporcionarse por miméticos, anticuerpos que se unen al receptor relacionado y similares. Por ejemplo, en la técnica se conocen varios miméticos de la trombopoyetina. Duffy y col. (2002) J Med Chem. 45(17):3576-8 identifican un farmacóforo para actividad trombopoyética; y Cwirla y col. (1997) Science 276:1696 describe un mimético de trombopoyetina que es altamente activo.

**[0042]** Además de o en lugar de factores de crecimiento, las células del sujeto pueden cultivarse en un co-cultivo con células de capas del estroma o nodrizas. Células del estroma adecuadas para su uso en el crecimiento de células hematopoyéticas se conocen en la técnica. Éstas incluyen estroma de médula ósea como se usa en condiciones de cultivo "Whitlock-Witte" (Whitlock y col. [1985] Annu Rev Immunol 3:213-235) o "Dexter" (Dexter y col. [1977] J Exp Med 145:1612-1616); y células del estroma tímico heterogéneo (Small y Weissman [1996] Scand J Immunol 44:115-121).

**[0043]** Las células del sujeto cultivadas pueden usarse en una amplia variedad de formas. El medio nutritivo, que es un medio acondicionado, puede aislarse en diversas etapas y analizarse los componentes. La separación puede lograrse con HPLC, HPLC de fase inversa, electroforesis en gel, isoelectroenfoque, diálisis u otras técnicas no degradativas que permitan la separación por peso molecular, volumen molecular, carga, combinaciones de los mismos o similares. Pueden combinarse una o más de estas técnicas para enriquecer adicionalmente en fracciones específicas.

**[0044]** Es probable que la megacariocitopoyesis implique una interacción entre citoblastos y células progenitoras, elementos del estroma y factores de crecimiento. Hay una necesidad de caracterizar estas interacciones para definir los factores que participan y para analizar la producción resultante de plaquetas. Las células progenitoras pueden usarse conjuntamente con el sistema de cultivo en el aislamiento y la evaluación de factores asociados a la diferenciación y maduración de megacariocitos y plaquetas. Por tanto, las células progenitoras pueden usarse en ensayos para determinar la actividad de medios tales como medios acondicionados, evaluar fluidos para la actividad de factores de crecimiento, implicación con dedicación de linajes, o similares.

**[0045]** Pueden introducirse genes en las células MKP para una variedad de fines, por ejemplo, sustituir genes que tienen una pérdida de mutación funcional, marcadores, etc. Alternativamente se introducen vectores que expresan ARNm antisentido o ribozimas, bloqueándose así la expresión de un gen no deseado. Otros procedimientos de terapia génica son la introducción de genes de resistencia a fármacos para permitir que células progenitoras normales tengan ventaja y se sometan a presión selectiva, por ejemplo, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR), o genes antiapoptóticos tales como bcl-2. Pueden usarse diversas técnicas conocidas en la técnica para transfectar células diana, por ejemplo, electroporación, ADN precipitado con calcio, fusión, transfección, lipofección y similares. El modo particular en el que el ADN se introduce no es crítico para la práctica de la invención.

**[0046]** Están disponibles muchos vectores útiles para transferir genes exógenos a células de mamífero diana. Los vectores pueden ser episómicos, por ejemplo, plásmidos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, etc., o pueden integrarse en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga o integración al azar, por ejemplo, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, VIH-1, ALV, etc. Se ha mostrado que los vectores derivados de retrovirus son particularmente útiles si las células diana son células progenitoras hematopoyéticas. Por ejemplo, véase Schwarzenberger y col. (1996) Blood 87:472-478; Nolte y col. (1996) P.N.A.S. 93:2414-2419; y Maze y col. (1996) P.N.A.S. 93:206-210.

**[0047]** Pueden usarse combinaciones de retrovirus y una línea de encapsidación apropiada en la que las proteínas de la cápside serán funcionales para infectar las células diana. Normalmente, las células y el virus se incubarán durante al menos aproximadamente 24 horas en el medio de cultivo. Entonces, se deja que las células se cultiven en el medio de cultivo durante cortos intervalos en algunas aplicaciones, por ejemplo, 24-73 horas, o durante al menos dos semanas, y puede dejarse que se cultiven durante cinco semanas o más antes del análisis. Los vectores retrovíricos comúnmente usados son "defectuosos", es decir, no pueden producir las proteínas víricas requeridas para la infección productiva. La replicación del vector requiere crecimiento en la línea celular de encapsidación. Los vectores lentivíricos tales como aquellos basados en secuencias gag del VIH o VIF pueden usarse para transfectar células no divisorias tales como la fase de reposo de los citoblastos hematopoyéticos humanos a largo plazo (véase Uchida y col. (1998) P.N.A.S. 95(20):11939-44).

**[0048]** La especificidad de células huésped del retrovirus se determina por la proteína de la envuelta, *env* (p120). La proteína de la envuelta se proporciona por la línea celular de encapsidación. Las proteínas de la envuelta son de al menos tres tipos, ecotrópicas, anfotrópicas y xenotrópicas. Los retrovirus encapsidados con proteína de la envuelta ecotrópica, por ejemplo, MMLV, pueden infectar la mayoría de los tipos de células murinas y de rata. Las líneas celulares de encapsidación ecotrópicas incluyen BOSC23 (Pear y col. (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396). Los retrovirus que llevan proteína de la envuelta anfotrópica, por ejemplo, 4070A (Danos y col., arriba.), pueden infectar la mayoría de los tipos de células de mamífero que incluyen ser humano, perro y ratón. Las líneas celulares de encapsidación anfotrópicas incluyen PA12 (Miller y col. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller y col. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902) GRIP (Danos y col. (1988) PNAS 85:6460-6464). Los retrovirus encapsidados con proteína de la envuelta xenotrópica, por ejemplo, AKR *env*, pueden infectar la mayoría de los tipos de células de mamífero, excepto células murinas.

**[0049]** Las secuencias en los extremos 5' y 3' del retrovirus son repeticiones terminales largas (LTR). En la técnica se conocen y pueden usarse varias secuencias de LTR, incluyendo MMLV-LTR; HIV-LTR; AKR-LTR; FIV-LTR; ALV-LTR; etc. También puede accederse a secuencias específicas mediante por bases de datos públicas. También se conocen diversas modificaciones de las secuencias de LTR nativas. La LTR de 5' actúa de promotor fuerte, accionando la transcripción del gen introducido después de la integración en un genoma de célula diana. Sin embargo, para algunos usos se desea tener un promotor regulable que accione la expresión. Si se incluye un promotor tal, se inactivará la función del promotor de LTR. Esto se lleva a cabo por una delección de la región U3 en la LTR de 3', que incluye las repeticiones del potenciador y promotor, que es suficiente para inactivar la función del promotor. Después de la integración en un genoma de célula diana hay una transposición de LTR de 5' y 3', produciendo un provirus transposicionalmente defectuoso llamado un "vector auto-inactivante".

**[0050]** Los vectores pueden incluir genes que posteriormente deben eliminarse, por ejemplo, usando un sistema de recombinasa tal como Cre/Lox, o destruir las células que los expresan, por ejemplo, incluyendo genes

que permiten toxicidad selectiva tal como el virus del herpes TK, bcl-xs, etc.

**[0051]** Los promotores inducibles adecuados se activan en un tipo de célula diana deseado, tanto la célula transfectada como la progenie de la misma. Por activación transcripcional se indica que la transcripción se aumentará por encima de los niveles basales en la célula diana al menos aproximadamente 100 veces, más normalmente al menos aproximadamente 1000 veces. Se conocen diversos promotores que se inducen en tipos de células hematopoyéticas.

**[0052]** Pueden emplearse diversas técnicas para demostrar que uno tiene células progenitoras genéticamente modificadas. El genoma de las células pueden restringirse y usarse con o sin amplificación. Pueden emplearse reacción en cadena de la polimerasa; electroforesis en gel; análisis de restricción; transferencias Southern, Northern y Western; secuenciación; o similares. Las células pueden cultivarse bajo diversas condiciones para garantizar que las células puedan madurar a todos los linajes mieloides, a la vez que mantienen la capacidad para expresar el ADN introducido. Pueden emplearse diversas pruebas *in vitro* e *in vivo* para garantizar que se ha mantenido la capacidad pluripotente de las células.

#### TRASPLANTE

**[0053]** Las células MKP del sujeto pueden usarse para la reconstitución de la función plaquetaria en un receptor, por ejemplo, en trombocitopenia. La afección puede producirse por condiciones genéticas o medioambientales, por ejemplo, quimioterapia, exposición a radiación, etc. Pueden usarse células autólogas, particularmente si se eliminan antes de la terapia citorreductora u otra terapia, o células alogénas, para el aislamiento de células progenitoras y posterior trasplante.

**[0054]** Las células progenitoras pueden administrarse en cualquier medio fisiológicamente aceptable, normalmente intravascularmente, aunque también pueden introducirse en hueso u otro sitio conveniente en el que las células puedan encontrar un sitio apropiado para la regeneración y diferenciación. Normalmente se administrarán al menos  $1 \times 10^5$  células, preferentemente  $1 \times 10^6$  o más. Las células pueden introducirse mediante inyección, catéter o similares. Las células pueden congelarse a temperaturas del nitrógeno líquido y guardarse durante largos periodos de tiempo, pudiendo usarse después de descongelarse. Si se congelan, las células se almacenan normalmente en un medio 10% de DMSO, 50% de SBF, 40% de RPMI 1640. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse usando factores de crecimiento y/o células del estroma asociadas a proliferación y diferenciación de células progenitoras.

#### PROCEDIMIENTOS DE CRIBADO

**[0055]** Las células del sujeto son útiles para ensayos y cribado *in vitro* para detectar factores que son activos sobre los progenitores de megacariocitos, particularmente aquellos que son específicos para linajes megacariocíticos y que no afectan otros linajes. Son de particular interés ensayos de cribado para agentes que son activos sobre células humanas. Para este fin puede usarse una amplia variedad de ensayos que incluyen inmunoensayos para la unión a proteínas; determinación del crecimiento, diferenciación y actividad funcional de células; producción de citocinas, por ejemplo, IL-1; y similares.

**[0056]** También es de interés el examen de expresión génica en las células MKP. El conjunto expresado de genes puede compararse entre progenitores y megacariocitos maduros, o con otros subconjuntos hematopoyéticos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el conjunto de genes expresados en las células MKP podría compararse con células progenitoras de citoblastos o linfoides.

**[0057]** Puede usarse cualquier procedimiento cualitativo o cuantitativo adecuado conocido en la técnica para detectar ARNm específicos. El ARNm puede detectarse, por ejemplo, por hibridación con una micromatriz, hibridación *in situ* en secciones de tejido, por PCR con transcriptasa inversa o en transferencias Northern que contienen poli A+ ARNm. Un experto en la materia puede usar fácilmente estos procedimientos para determinar diferencias en el tamaño o cantidad de transcritos de ARNm entre dos muestras. Por ejemplo, el nivel de ARNm particulares en células MEP se compara con la expresión de los ARNm en una muestra de referencia, por ejemplo, células CMP.

**[0058]** Cualquier procedimiento adecuado para detectar y comparar niveles de expresión de ARNm en una muestra puede usarse a propósito de los procedimientos de la invención. Por ejemplo, los niveles de expresión de ARNm en una muestra pueden determinarse por generación de una biblioteca de marcas de secuencias expresadas (EST) de una muestra. La enumeración de la representación relativa de EST dentro de la biblioteca puede usarse para aproximarse a la representación relativa de un transcrito de gen dentro de la muestra inicial. Los resultados del análisis de EST de una muestra de prueba pueden entonces compararse con análisis de EST de una muestra de

referencia para determinar los niveles de expresión relativos de un polinucleótido seleccionado, particularmente un polinucleótido correspondiente a uno o más de los genes diferencialmente expresados descritos en este documento.

**[0059]** Alternativamente, la expresión génica en una muestra de prueba puede realizarse usando la metodología de análisis en serie de la expresión génica (SAGE) (Velculescu y col., Science (1995) 270:484). En resumen, el SAGE implica el aislamiento de marcas de secuencias únicas cortas de una localización específica dentro de cada transcrito. Las marcas de secuencias se concatenan, clonan y secuencian. La frecuencia de transcritos particulares dentro de la muestra inicial se refleja por el número de veces que la marca de secuencia asociada se encuentra con la población de secuencias.

**[0060]** La expresión génica en una muestra de prueba también puede analizarse usando metodología de visualización diferencial (DD). En DD, los fragmentos definidos por delimitadores de secuencias específicas (por ejemplo, sitios de enzimas de restricción) se usan como identificadores únicos de genes acoplados a información sobre la longitud del fragmento o la localización del fragmento dentro del gen expresado. La representación relativa de un gen expresado con una muestra puede entonces estimarse basándose en la representación relativa del fragmento asociado a ese gen dentro del conjunto de todos los fragmentos posibles. Los procedimientos y composiciones para llevar a cabo la DD son muy conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.776.683; y U.S. 5.807.680.

**[0061]** Alternativamente, la expresión génica en una muestra usando análisis de hibridación, que se basa en la especificidad de interacciones de nucleótidos, oligonucleótidos o ADNc puede usarse para identificar o capturar selectivamente ADN o ARN de composición de secuencia específica, y la cantidad de ARN o ADNc hibridarse con una secuencia de captura conocida determinada cualitativamente o cuantitativamente para proporcionar información sobre la representación relativa de un mensajero particular dentro del conjunto de mensajeros celulares en una muestra. El análisis de hibridación puede diseñarse para permitir el cribado simultáneo de la expresión relativa de cientos a miles de genes usando, por ejemplo, tecnologías basadas en matriz que tienen formas de alta densidad que incluyen filtros, portaobjetos de microscopio o microchips, o tecnologías basadas en disolución que usan análisis espectroscópicos (por ejemplo, espectrometría de masas). Un uso a modo de ejemplo de matrices en los procedimientos de diagnóstico de la invención se describe más adelante en más detalle.

**[0062]** La hibridación con matrices puede realizarse cuando las matrices pueden producirse según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, procedimientos de producir grandes matrices de oligonucleótidos se describen en los documentos U.S. 5.134.854 y U.S. 5.445.934 usando técnicas de síntesis de luz dirigida. Usando un sistema controlado por ordenador, una matriz heterogénea de monómeros se convierte, mediante acoplamiento simultáneo a varios sitios de reacción, en una matriz heterogénea de polímeros. Alternativamente, las micromatrices se generan por deposición de oligonucleótidos presintetizados sobre un sustrato sólido, por ejemplo, como se describe en la solicitud publicada PCT nº WO 95/35505.

**[0063]** Los procedimientos para la recogida de datos de la hibridación de muestras con una matriz también son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polinucleótidos de las muestras de células pueden generarse usando una marca fluorescente detectable, y la hibridación de los polinucleótidos en las muestras detectadas por barrido de las micromatrices para la presencia de la marca detectable. Los procedimientos y dispositivos para detectar fluorescentemente dianas marcadas en dispositivos se conocen en la técnica. Generalmente, tales dispositivos de detección incluyen un microscopio y fuente de luz para dirigir la luz a un sustrato. Un contador de fotones detecta la fluorescencia del sustrato, mientras que una etapa de traslación x-y varía la localización del sustrato. Un dispositivo de detección confocal que puede usarse en los procedimientos objeto se describe en la patente de EE.UU. nº 5.631.734. Un microscopio láser de barrido se describe en Shalon y col., Genome Res. (1996) 6:639. Para cada fluoróforo usado se realiza un barrido usando la línea de excitación apropiada. Las imágenes digitales generadas a partir del barrido se combinan luego para el posterior análisis. Para cualquier elemento de matriz particular, la relación de la señal fluorescente de una muestra se compara con la señal fluorescente de otra muestra, y se determina la intensidad de señal relativa.

**[0064]** Los procedimientos para analizar los datos recogidos de la hibridación con matrices son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, si la detección de la hibridación implica una marca fluorescente, el análisis de datos pueden incluir las etapas de determinar la intensidad fluorescente en función de la posición del sustrato a partir de los datos recogidos, eliminar los valores atípicos, es decir, los datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada, y calcular la afinidad de unión relativa de las dianas a partir de los datos restantes. Los datos resultantes pueden visualizarse como una imagen variando la intensidad en cada región según la afinidad de unión entre dianas y sondas.

**[0065]** La coincidencia de patrones puede realizarse manualmente, o puede realizarse usando un programa informático. Los procedimientos para la preparación de matrices de sustrato (por ejemplo, matrices), el diseño de

oligonucleótidos para su uso con tales matrices, el marcado de sondas, condiciones de hibridación, barrido de matrices hibridadas y análisis de patrones generados, que incluye el análisis de comparación, se describen en, por ejemplo, el documento U.S. 5.800.992.

- 5 **[0066]** En otro procedimiento de cribado, la muestra de prueba se ensaya para el nivel de un polipéptido. El diagnóstico puede llevarse a cabo usando distintos procedimientos para determinar la ausencia o presencia o cantidades alteradas de un polipéptido diferencialmente expresado en la muestra de prueba. Por ejemplo, la detección puede utilizar la tinción de células o secciones histológicas (por ejemplo, de una muestra de biopsia) con anticuerpos marcados, realizada según procedimientos convencionales. Las células pueden permeabilizarse para
- 10 teñir moléculas citoplásmicas. En general, los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptido diferencialmente expresado de la invención se añaden a una muestra, y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión al epítipo, normalmente al menos aproximadamente 10 minutos. El anticuerpo puede marcarse detectablemente para la detección directa (por ejemplo, usando radioisótopos, enzimas, agentes que fluorescen, agentes quimioluminiscentes y similares), o puede usarse conjuntamente con un anticuerpo o
- 15 reactivo de segunda etapa para detectar la unión (por ejemplo, biotina con avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante, un anticuerpo secundario conjugado con un compuesto fluorescente, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo de Texas, etc.) La ausencia o presencia de unión del anticuerpo puede determinarse por diversos procedimientos que incluyen citometría de flujo de células disociadas, microscopía, radiografía recuento por centelleo, etc. Puede usarse cualquier procedimiento alternativo adecuado de detección cualitativa o cuantitativa de
- 20 niveles o cantidades de polipéptido diferencialmente expresado, por ejemplo, ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, etc.

#### PARTE EXPERIMENTAL

- 25 **[0067]** Los siguientes ejemplos se exponen de manera que se provea a aquellos expertos en la materia de una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar la invención objeto, y no pretenden limitar el alcance de lo que se considera la invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.), pero deben preverse algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, partes son partes en peso, peso molecular es
- 30 peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados; y la presión es a o próxima a atmosférica.

- [0068]** Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies animales o géneros y reactivos descritos, ya que tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de sólo describir realizaciones particulares, y no pretende
- 35 limitar el alcance de la presente invención, que será limitado por las reivindicaciones adjuntas.

- [0069]** Como se usa en este documento, las formas en singular “un”, “una”, “el”, “la” incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, referencia a “una célula” incluye una pluralidad de tales células y referencia a “la proteína” incluye referencia a una o más proteínas y
- 40 equivalentes de la misma conocidos para aquellos expertos en la materia, etc. Todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención, a menos que se indique claramente de otro modo.

#### EJEMPLO 1

- 45 **MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

- [0070]** *Cepas de ratón.* Se usaron ratones C57Bl/Ka-Thy1.1 de seis a 8 semanas de edad para el aislamiento de progenitores de megacariocitos (MKP) y otros progenitores mieloides. Los ensayos de repoblación competitiva y de unidades formadoras de colonias del bazo (UFC-B) se hicieron en el sistema de antígeno Ly5 congénico (Ly5.1 frente a Ly5.2) como se describe por Na Nakorn y col. (2002) J. Clin. Invest. 109:1579-1585. Los inventores
- 50 generaron en su laboratorio ratones transgénicos para la proteína verde fluorescente (GFP)  $\beta$ -actina (Wright y col. (2001) Blood 97, 2278-2285) y se han retrocruzado con ratones C57Bl/Ka-Thy1.1 durante al menos 5 generaciones. Todos los animales se mantuvieron con agua acidificada (pH 2,5) en la Stanford University Laboratory Animal Facility según las pautas de Stanford.
- 55

- [0071]** *Tinción y clasificación de células.* Se aislaron células progenitoras mieloides (CMP, MEP y GMP) usando el protocolo de tinción descrito previamente por Akashi y col. (2000) Nature 404, 193-197. Para el aislamiento de MKP, células de la médula ósea se tiñeron con anticuerpos específicos para los siguientes
- 60 marcadores de linaje (Lin): CD3 (KT31.1), CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), B220 (6B2), Gr-1 (8C5), Mac-1 (M1/70), TER119, Thy1.1 (19XE5) más IL-7R $\alpha$  (A7R34) y Sca-1 (E13-161-7). Entonces, las células Lin<sup>+</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> se eliminaron con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos de oveja dirigidos contra IgG de rata (Dynabeads M-

450, Dynal A.S., Oslo, Noruega), y las células restantes se tiñeron con anticuerpos policlonales de cabra dirigidos contra IgG de rata conjugados con Cy5-PE (Caltag Laboratories Inc., Burlingame, CA). Después de la incubación con IgG de rata (Sigma, St. Louis, MO), las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra FcγRII/III conjugado con PE (2.4G2), dirigidos contra CD41 conjugados con FITC (MWRReg30; Farmingen, San Diego, CA), dirigidos contra CD9 biotinilados (KMC8; Farmingen) y dirigidos contra c-Kit conjugados con APC (2B8). Entonces, CD9 se visualizó por estreptavidina-rojo de Texas (Caltag Laboratories Inc.).

**[0072]** Las células se clasificaron o analizaron usando un FACS Vantage de láser triple altamente modificado (láser de argón de 488 nm, láser de colorante de 599 nm y láser de UV) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA). Los progenitores se purificaron por dos rondas de clasificación para obtener las poblaciones que fueron esencialmente puras para el fenotipo del marcador de superficie indicado. En algunos ensayos se realizó reclasificación usando un sistema de unidad de deposición de células automática cuidadosamente calibrada (ACDU) (Becton Dickinson). Este sistema depositó un número específico de células purificadas en cada pocillo de placas de 24 pocillos o de 96 pocillos.

**[0073]** *Tinción de ADN.* Las células se fijaron en etanol al 80% frío en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se incubaron durante la noche a 4°C en 250 µl de disolución de yoduro de propidio (PI)/ ribonucleasa (RNasa) (50 µg/ml de PI + 10 µl/ml de RNasa en 0,1% de Triton X-100). El análisis se hizo en el citómetro FACScan (Becton Dickinson) usando excitación a 488 nm.

**[0074]** *Ensayos de diferenciación in vitro.* El ensayo formador de colonias se realizó en medio de metilcelulosa (MethoCult M3231; StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) complementado con SCF, IL-3, IL-11, ligando Flt3, GM-CSF, eritropoyetina (Epo) y trombopoyetina (Tpo) como se describe por Akashi y col., arriba. Las colonias se puntuaron en el día 10 del cultivo usando un microscopio invertido. La morfología de las células en las colonias individuales se confirmó por tinción con Giemsa. Para evaluar las relaciones de linaje entre los progenitores, 10.000 CMP y MEP se clasificaron sobre capas de células del estroma OP9 en placas de 24 pocillos con medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero bovino fetal (Summit Biotechnology, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) y citocinas (SCF, IL-11 y Tpo). Setenta y dos horas después, las células se recogieron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales como se describe para el aislamiento de MKP. Posteriormente se analizaron y se clasificaron por FACS Vantage.

**[0075]** *Ensayos de diferenciación in vivo.* Los ensayos de reconstitución se hicieron inyectando 1.000 MKP purificadas en el seno venoso retro-orbital de receptores congénicos para Ly5 mortalmente irradiados (9,5 Gy administrados en dos fracciones) junto con 200.000 células de la médula ósea sin fraccionar de tipo huésped. Los ensayos de UFC-B se realizaron con 500-1000 células progenitoras como se ha descrito previamente por Na Nakorn y col., arriba. Los bazo de los receptores también se sometieron a examen histológico convencional. Para las lecturas de plaquetas *in vivo*, los progenitores se purificaron de ratones transgénicos para la GFP β-actina y se trasplantaron en C57Bl/Ka submortalmente irradiados (4,5 Gy). Los ratones se sangraron semanalmente después del trasplante para el análisis de citometría de flujo de plaquetas GFP<sup>+</sup> en la sangre periférica.

## RESULTADOS

**[0076]** Las MKP residen dentro de la fracción CD9<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>FcγR<sup>lo</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Thy1.1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de médula ósea. La expresión de CD9 se comprobó primero en las células de la médula ósea de ratones C57Bl/Ka-Thy1.1 adultos por citometría de flujo. Prácticamente todas las células granulomonocíticas Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> (GM) y megacariocíticas CD61<sup>+</sup> expresaron CD9 a altos niveles. A diferencia, menos del 5% de células eritroides TER119<sup>+</sup> fueron CD9<sup>+</sup>. Las células linfoides coexpresaron moderadamente CD9 con 15% de positividad encontrada en los linfocitos B B220<sup>+</sup> y 7% en los linfocitos T CD3<sup>+</sup>. En el compartimento de progenitores mieloides c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> también se encontró que aproximadamente el 1-2% de las células eran CD9<sup>+</sup>. Pueden subdividirse adicionalmente en 2 poblaciones según la expresión de CD16/32 (FcγR) y CD41 (mostrada en la Figura 1 A). La fracción CD41<sup>lo</sup>FcγR<sup>hi</sup> no tuvo actividad formadora de colonias mieloides significativa y estuvo compuesta principalmente por células GM inmaduras identificadas por tinción con Giemsa.

**[0077]** A diferencia, pareció que las células CD41<sup>+</sup>FcγR<sup>lo</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Thy1.1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> eran todas células similares a mieloblastos (mostrado en la Figura 1 B). Análisis fenotípicos adicionales usando anticuerpos para los otros dos marcadores para progenitores mieloides mostraron el patrón de expresión uniformemente positivo de tanto CD34 como CD38 en esta población. Estas células fueron claramente aislables por FACS y representaron ~ 0,008-0,012% de las células de la médula ósea nucleadas totales. Contuvieron inicialmente la cantidad 2N-4N de ADN, pero se desarrollaron en células poliploides (16N) con los rasgos característicos de megacariocitos cuando se cultivaron con SCF y Tpo durante 5 días (Figura 1 C). Esta población de células se denominará en lo sucesivo MKP.

Las MKP forman exclusivamente colonias de megacariocitos *in vitro*. En el sistema de cultivo de metilcelulosa que se fijó para detectar todos los resultados posibles de diferenciación mieloide, las MKP dieron lugar principalmente a UFC-MK con menos del 1% de UFC-GM, UFC-M y UFR-E (Tabla 1). Las lecturas de estas colonias de no megacariocitos pueden eliminarse totalmente usando puertas de clasificación más restringidas que indican que se derivaron de los contaminantes de los otros conjuntos de progenitores en vez de a partir de MKP. Interesantemente, aproximadamente el 1-2% de las colonias derivadas de MKP fueron colonias grandes que se parecieron a la unidad formadora en ramillete de megacariocitos (UFR-MK) previamente descrita por Long y col. (1985) J. Clin. Invest. 76, 431-438. La morfología de UFC-MK y UFR-MK derivadas de MKP se muestran en la Figura 2A. La tinción con Giemsa de células en las colonias individuales reveló que UFC-MK sólo contuvo megacariocitos maduros (Figura 2B), mientras que UFR-MK también contuvo frecuentemente pequeños números de células eritroides. Por tanto, estas colonias deberían definirse con más exactitud como UFR-MK/E, y probablemente representan la etapa anterior de progenitores de megacariocitos.

Tabla 1.

| Actividad de UFC de células CD9 <sup>+</sup> CD41 <sup>+</sup> FcγR <sup>lo</sup> c-kit <sup>+</sup> Sca-1 <sup>-</sup> IL-7Rα <sup>-</sup> Thy1.1 <sup>-</sup> Lin <sup>-</sup> . |             |           |           |           |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Experimento n°                                                                                                                                                                     | UFC-MK      | UFR-MK/E  | UFR-E     | UFC-GM    | UFC-M     |
| 1                                                                                                                                                                                  | 47,6 ± 6,7  | 1,3 ± 0,6 | 0,3 ± 0,6 | 0         | 0         |
| 2                                                                                                                                                                                  | 49,3 ± 11,0 | 1,3 ± 1,2 | 0,3 ± 0,6 | 1,0 ± 1,0 | 0         |
| 3                                                                                                                                                                                  | 46,7 ± 7,2  | 1,3 ± 1,5 | 0         | 0         | 0,3 ± 0,6 |

Se clasificaron directamente cien células sobre placas de 35 mm que contenían medio de metilcelulosa complementado con SCF, ligando Flt3, IL-3, IL-11, GM-CSF, Tpo y Epo. Las colonias se contaron en el día 10. Las UFC-MK se definieron por la presencia de tres o más megacariocitos y ningún otro tipo de células en la colonia. Cada experimento se hizo por triplicado. Los datos se presentan aquí como el número promedio de colonias por placa ± EEM.

- 5 **[0078]** Para comparar la formación de colonias clonogénicas entre las poblaciones de progenitores mieloides, los progenitores individuales se clasificaron en cada pocillo de la placa de 96 pocillos que contenía medio de metilcelulosa y citocinas. Noventa y nueve de los 150 pocillos (66%) depositados con una única MKP desarrollaron UFC-MK en el día 10 del cultivo (Figura 2C). El número promedio de megacariocitos en cada colonia fue 3,9. En la misma condición, el 16,7% y el 21,6% de CMP y MEP dieron lugar a UFC-MK con el número promedio de 8,9 y 8,7
- 10 megacariocitos por colonia, respectivamente. Colonias grandes que incluyen UFR-MK/E se derivaron más frecuentemente de CMP o MEP que de MKP. Estos resultados sugieren que las MKP están comprometidas sólo con el linaje megacariocítico y están al menos un etapa aguas abajo de CMP y MEP en la jerarquía de desarrollo de la hematopoyesis.
- 15 Se requiere trombopoyetina para la actividad de UFC-MK de MKP. A continuación, los inventores probaron el requisito de las citocinas para el desarrollo de megacariocitos a partir de MKP.

Tabla 2.

| Efectos de citocinas sobre la actividad formadora de colonias de MKP |                                           |          |       |        |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|-------|--------|
| Citocinas añadidas                                                   | Número de colonias en el día 10 / 100 MKP |          |       |        |
|                                                                      | UFC-MK                                    | UFR-MK/E | UFR-E | UFC-GM |
| SCF+IL-11                                                            | 0                                         | 0        | 0     | 0      |
|                                                                      | 1                                         | 0        | 0     | 0      |
| SCF+IL-11+Tpo                                                        | 28                                        | 0        | 0     | 0      |
|                                                                      | 31                                        | 0        | 0     | 0      |
| SCF+IL-11+Epo                                                        | 3                                         | 0        | 1     | 0      |
|                                                                      | 2                                         | 0        | 0     | 0      |
| SCF+IL-11+IL-3+GM-CSF                                                | 5                                         | 0        | 0     | 0      |
|                                                                      | 6                                         | 0        | 0     | 1      |
|                                                                      | 4                                         | 0        | 0     | 0      |
|                                                                      | 8                                         | 0        | 0     | 0      |
| SCF+IL-11+Tpo+Epo                                                    | 29                                        | 0        | 0     | 0      |
|                                                                      | 34                                        | 0        | 0     | 0      |
|                                                                      | 42                                        | 0        | 1     | 0      |
|                                                                      | 37                                        | 0        | 0     | 0      |
| SCF+IL-11+IL-3+GM-CSF+Tpo+Epo                                        | 61                                        | 0        | 1     | 1      |
|                                                                      | 46                                        | 2        | 0     | 0      |
|                                                                      | 55                                        | 1        | 0     | 0      |
|                                                                      | 42                                        | 3        | 0     | 0      |

**[0079]** Como se muestra en la Tabla 2, Tpo es la citocina más importante para la formación de UFC-MK. La eficiencia de la siembra en placa de MKP disminuyó espectacularmente a menos del 10% en ausencia de Tpo. No se observaron colonias cuando las MKP se cultivaron con sólo citocinas de acción temprana tales como SCF y IL-11. Con la adición de Tpo solo se rescató aproximadamente el 50-60% de las posibles UFC-MK. Otras citocinas tuvieron poco efecto, si lo tuvieron, sobre el desarrollo de UFC-MK a partir de MKP. Sin embargo, también se observó la sinergia entre citocinas dirigidas a GM (GM-CSF y IL-3) y citocinas dirigidas a ME (Epo y Tpo). En realidad, pudieron encontrarse UFC-MK grandes que incluían UFR-MK/E sólo cuando todas las citocinas estaban presentes en el cultivo.

**[0080]** Diferenciación *in vivo* de MKP. Mil MKP no dieron lugar a ninguna colonia superficial en los bazo de receptores en tanto el día 8 como el día 12. Esto fue una diferencia con los resultados de los experimentos previos de los inventores usando las otras poblaciones de progenitores mieloides en las que los inventores encontraron que los MEP eran la principal fuente de UFC-B en el día 8 (14). Sin embargo, el examen histológico de los bazo en el día 8 revelaron algunos focos microscópicos de megacariocitos en ratones que recibieron MKP (Figura 3A). En el mismo momento de tiempo, CMP y MEP formaron principalmente colonias eritroides (Figura 3A y Ref. 14), sugiriendo que las MKP carecen de potencial de diferenciación eritroide *in vivo*. En los ensayos de reconstitución no se detectaron células Gr-1<sup>+</sup>, Mac-1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> o Ter119<sup>+</sup> derivadas del donante en sangre, médula ósea o bazo de ratones que recibieron 1.000 MKP junto con células colaboradoras de la médula ósea. Como las plaquetas no expresan el antígeno Ly5, el injerto funcionante en el linaje megacariocítico no puede evaluarse en este sistema congénico.

**[0081]** Para medir la generación de plaquetas directamente *in vivo*, los inventores purificaron MKP CD9<sup>+</sup>FcγR<sup>lo</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de la médula ósea de ratones para la GFP β-actina y las trasplantaron a receptores submortalmente irradiados. Similar a lo que se observó en el sistema de trasplante congénico, las MKP no dieron lugar a células GM, eritroides o linfoides GFP<sup>+</sup> en ningún momento de tiempo del análisis. Sin embargo, produjeron niveles detectables de plaquetas en estos ratones (Figura 3B). El pico del injerto funcionante de plaquetas se produjo aproximadamente el día 14 después del trasplante, oscilando los porcentajes de plaquetas GFP<sup>+</sup> en la sangre periférica del 0,005 al 1%. No se detectaron plaquetas GFP<sup>+</sup> más allá de tres semanas después del trasplante (Figura 3C).

**[0082]** En el mismo experimento, 10.000 células CD9-FcγR<sup>lo</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (CMP + MEP) presentaron un patrón similar de injerto funcionante de plaquetas, mientras que 10.000 células CD9-FcγR<sup>hi</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (GMP) fracasaron en generar cualquier plaqueta detectable en la sangre periférica. Este resultado confirma la observación previa de que las GMP sólo pueden dar lugar a células GM *in vivo*. Y, lo que es más importante, excluye la posibilidad de que señales de GFP observadas en las plaquetas puedan haberse generado no específicamente a partir de otras células GFP<sup>+</sup> trasplantadas. En conjunto, estos datos demuestran que las MKP no tienen capacidad de autorrenovación *in vivo* significativa o potenciales de diferenciación multipotente, sino que sólo dan lugar transitoriamente a megacariocitos y plaquetas.

**[0083]** Las CMP y las MEP dieron lugar a MKP *in vitro*. Para examinar las relaciones entre los progenitores mieloides, los inventores cultivaron CMP y MEP (CD9<sup>+</sup>) en capas del estroma OP9 en presencia de SCF, IL-11 y Tpo durante 72 horas. Tanto CMP como MEP pueden dar lugar a células con el fenotipo de MKP como se encuentra en médula ósea recientemente aislada (Figura 4A). Estas células CD9<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>FcγR<sup>lo</sup>c-kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> representaron - 0,78% y 0,33% de las células totales en el cultivo de CMP y MEP, respectivamente. También formaron sólo UFC-MK en cultivo de metilcelulosa. En la misma condición de cultivo, las MKP nunca dieron lugar a CMP o MEP, pero se diferenciaron en megacariocitos multinucleados en el plazo de 5 días. Estos hallazgos en combinación con los resultados de los ensayos de formación de colonias de progenitores individuales demuestran que las MKP son los progenitores comprometidos aguas abajo de CMP y MEP.

**[0084]** El concepto de progenitores comprometidos con megacariocitos se introdujo en los años 70 después del descubrimiento de colonias de megacariocitos del cultivo de células de la médula ósea de ratón en medios semisólidos. Desde entonces, varios grupos de investigadores han desarrollado sistemas de cultivo para detectar diferentes tipos de colonias de megacariocitos en tanto seres humanos como ratones. De aquellas colonias que contienen megacariocitos descritas en la bibliografía, las colonias grandes que contienen adicionalmente células en los otros linajes se atribuyen en gran medida a los progenitores multipotentes, mientras que las colonias puras de megacariocitos se consideran que representan los verdaderos progenitores comprometidos con megacariocitos monopotentes. Sin embargo, esta suposición puede no ser completamente correcta ya que posteriormente se encontró que muchas colonias puras eran bi- u oligo-potentes cuando los ensayos se hicieron en condiciones diferentes. Además, raramente se realizaron experimentos *in vivo* para confirmar la restricción del linaje de estas células.

**[0085]** Recientemente se ha informado que tanto las MEP como las CMP dan frecuentemente lugar a UFC-MK y todavía pueden diferenciarse también en células de otros linajes cuando se inyectan a ratones mortalmente irradiados. Estos hallazgos aumentaron la posibilidad de que un precursor aislable aguas abajo de las MEP pudiera ser el origen de estas colonias de megacariocitos. En este estudio, los inventores buscaron prospectivamente células que pudieran dar lugar a sólo megacariocitos y probaron extensivamente sus potenciales de diferenciación en varios ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las MKP aisladas aquí cumplieron todos los criterios para los progenitores comprometidos con megacariocitos y, por tanto, proporcionan una prueba definitiva de la existencia de estos progenitores monopotentes en médula ósea de ratón.

**[0086]** Intentos previos para aislar progenitores de megacariocitos han incluido el uso de diversos procedimientos tales como separación física mediante velocidad de sedimentación, gradiente densidad, tinción citoquímica, enriquecimiento *in vivo* con el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo y, recientemente, citometría de flujo, véase, por ejemplo, Pallavicini y col. (1987) Exp. Hematol. 15, 704-709; Bauman y col. (1987) Exp. Hematol. 15, 1074-1079; y Hodohara y col. (2000) Blood 95, 769-775.

**[0087]** Aunque las UFC-MK pueden recuperarse en algunas poblaciones aisladas, siempre se observó un número significativo de otras actividades de UFC. Una de las principales limitaciones en la búsqueda de MKP es la escasez de marcadores de superficie específicos en el linaje megacariocítico. En el sistema humano, las glicoproteínas plaquetarias (GP) tales como GPIIb (CD41) o GPIIIa (CD61) se han usado ampliamente para el enriquecimiento de progenitores de megacariocitos. Hodohara y col. también han mostrado recientemente que las células de la médula ósea CD41<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> de ratones tratados con Tpo estuvieron altamente enriquecidas en actividad de UFC-MK. En el presente sistema de cultivo, estas células dieron lugar a números significativos de UFC-GM y UFR-MK/E, además de UFC-MK. Además, se encontró que el nivel de expresión de CD41 no era diferente entre las poblaciones de progenitores mieloides. Estas observaciones están de acuerdo con los estudios en ser humano y pollo, en los que se informó que los progenitores multipotentes eran CD41<sup>+</sup>. Por tanto, la fracción CD41<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> de médula ósea contiene otras poblaciones de progenitores mieloides, además de MKP.

**[0088]** CD9 pertenece a la superfamilia de la tetraspanina de proteínas de la superficie celular que generalmente participan en muchos procesos celulares tales como adhesión, motilidad, proliferación y diferenciación de células, además de en la transducción de señales. CD9 se expresa en diversos tejidos que incluyen médula ósea en los que la mayor expresión puede observarse en plaquetas, megacariocitos, células granulomonocíticas y del estroma. Aunque la función de CD9 es todavía desconocida, se ha mostrado que el anticuerpo dirigido contra CD9 inhibe la diferenciación mieloide de progenitores primitivos en cultivos de estroma, supuestamente mediante la interacción con células del estroma, debido a que no tenía efecto directo en el ensayo de UFC. Estos presentes datos indican que CD9 es un marcador de diferenciación útil para definir el compromiso en el linaje megacariocítico.

**[0089]** Interesantemente, las células CD9<sup>+</sup>FcγR<sup>hi</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>IL-7Rα</sup>Lin<sup>-</sup> no tienen actividad formadora de colonias significativa a pesar de la alta expresión de CD9 en células GM. Este resultado sugiere que, a diferencia de en el linaje megacariocítico, la expresión de CD9 en el linaje GM se produce relativamente tarde en el desarrollo. Esto se confirma por el hecho de que las GMP, los progenitores comprometidos con GM más tempranos identificados en médula ósea, sólo expresan CD9 a un bajo nivel y la expresión de CD9 aumenta gradualmente junto con la diferenciación de GMP hacia células GM maduras. Recientemente, dos grupos independientes han generado ratones que carecen de la proteína CD9 y se informa que tienen infertilidad femenina debido a un defecto en la fusión espermatozoide-ovocito. Sorprendentemente, no se observó anomalía en el sistema hematopoyético. Los resultados de los datos de los inventores sugieren que el análisis detallado de los progenitores mieloides - particularmente del linaje megacariocítico - debería hacerse en estos ratones para tratar la función de CD9 en la hematopoyesis.

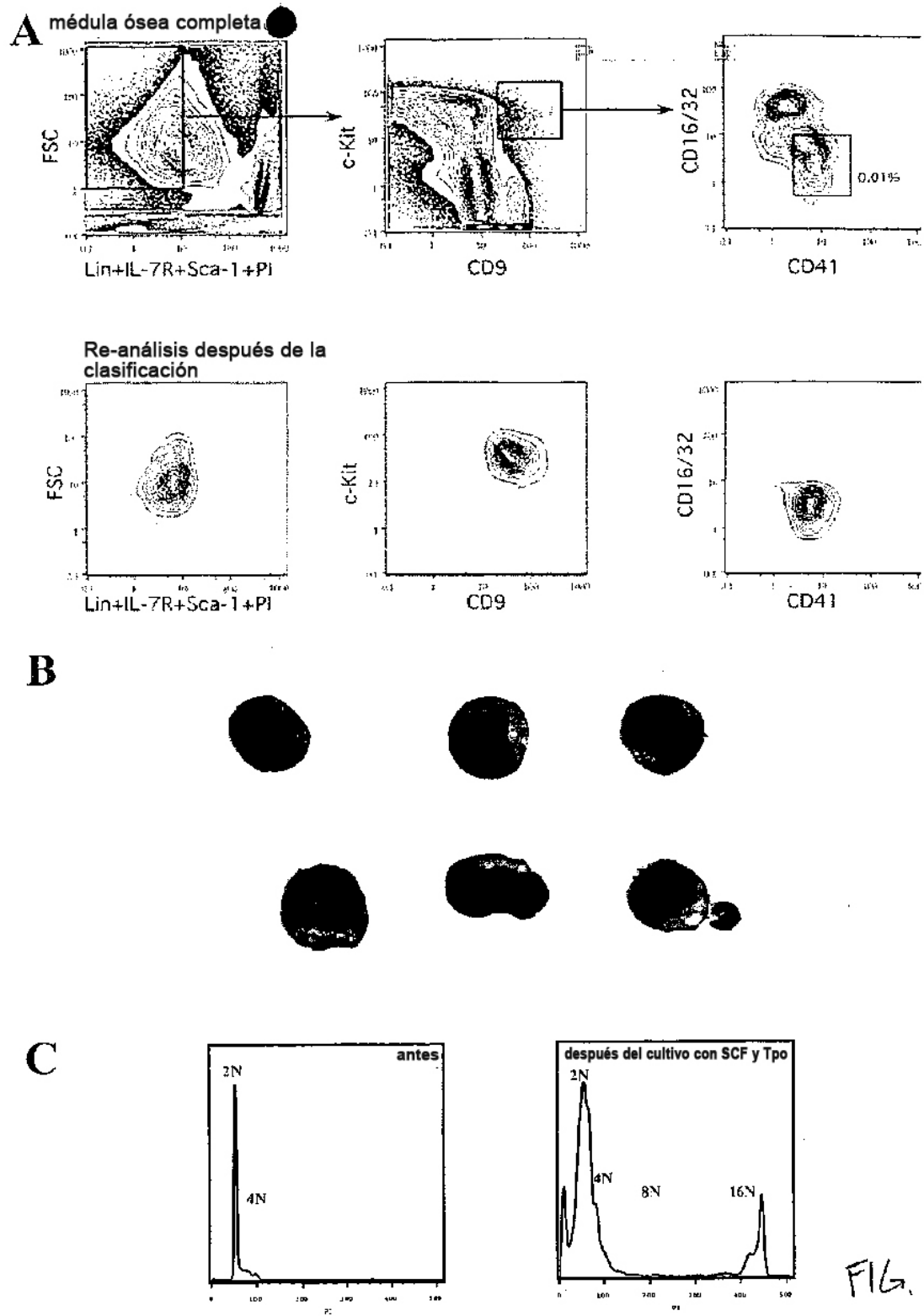
**[0090]** Las relaciones de MKP con los otros dos progenitores mieloides también se investigaron en este estudio. Los resultados de cultivos *in vitro* demostraron claramente que tanto CMP como MEP pueden dar lugar a MKP. Al nivel de una única célula también generaron mayores UFC-MK con al menos dos veces los números de megacariocitos en comparación con las colonias derivadas de MKP. Estos resultados indican que las MKP están de hecho aguas abajo de CMP y MEP.

**[0091]** En conclusión, se han generado prospectivamente progenitores comprometidos con megacariocitos monopotentes clonogénicos que generan uniformemente UFC-MK en cultivo de metilcelulosa. Están aguas abajo de CMP y MEP. Las MKP no muestran las propiedades de progenitores multipotentes u oligopotentes, pero están comprometidas exclusivamente con el linaje megacariocítico y dan lugar a plaquetas *in vivo* durante sólo 3 semanas. Como tales, estas células se usan en la generación de plaquetas y megacariocitos, y en el cribado de agentes que actúan en la trombopoyesis.

**[0092]** Las publicaciones tratadas anteriormente y durante todo el texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a preceder tal divulgación en virtud de la invención anterior.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una composición sustancialmente pura de células progenitoras de megacariocitos de mamífero monopotentes, en la que al menos el 80% de las células en dicha composición expresan CD41, CD9 y CD34 y son panel de linaje, y en la que las células en dicha composición que expresan CD41, CD9 y CD34 y son panel de linaje dan lugar exclusivamente a colonias de megacariocitos; y un medio fisiológicamente aceptable.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho panel de linaje incluye CD2; CD3; CD4; CD7; CD8; CD10; CD11b; CD14; CD19; CD20; CD56; y glicoforina A (GPA).
3. La composición de la reivindicación 1, en la que dichas células progenitoras de megacariocitos, cuando se cultivan en metilcelulosa en presencia de factor de Steel (SLF), ligando flt-3 (FL), interleucina (IL)-3, IL-11, GM-CSF, trombopoyetina (Tpo) y eritropoyetina (Epo), dan lugar a colonias de megacariocitos.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos progenitores de megacariocitos son células de ratón.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que dichas células están genéticamente modificadas para comprender un vector de ADN exógeno.
6. Un procedimiento de enriquecimiento para una composición de células progenitoras de megacariocitos de mamífero monopotentes caracterizadas como CD41<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, comprendiendo el procedimiento:
  - combinar reactivos que reconocen específicamente CD41, CD9 y CD34 con una muestra de células hematopoyéticas; y
  - seleccionar aquellas células que son CD41<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> para proporcionar una población enriquecida de células que tiene actividad progenitora de megacariocitos que dan lugar exclusivamente a colonias de megacariocitos.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha muestra de células hematopoyéticas es médula ósea.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha muestra de células hematopoyéticas es sangre periférica movilizada.
9. Un procedimiento de cribado de secuencias genéticas específicamente expresadas en células exclusivamente comprometidas con el linaje de megacariocitos, comprendiendo el procedimiento:
  - aislar ARN de una población de células según la reivindicación 1,
  - generar una sonda a partir de dicho ARN,
  - cribar una población de ácidos nucleicos para la hibridación con dicha sonda.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dichas células son células de ratón.
11. Una población de células progenitoras de megacariocitos monopotentes, en la que al menos el 80% de las células en dicha población se caracterizan como CD41<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>; en la que dichas células progenitoras de megacariocitos dan lugar a plaquetas *in vivo* para su uso en un procedimiento para tratar un receptor de mamífero para proporcionar plaquetas para el mismo.
12. Una población para su uso en un procedimiento según la reivindicación 11, en la que dichas células se administran conjuntamente con trombopoyetina o un mimético de la misma.
13. Un procedimiento de cribado de factores que afectan la trombopoyesis, comprendiendo el procedimiento:
  - combinar un factor de trombopoyesis candidato con una población de células progenitoras de megacariocitos monopotentes, en el que al menos el 80% de las células en dicha población se caracterizan como CD41<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, y
  - determinar el efecto de dicho agente sobre la formación de megacariocitos y plaquetas.



A

UFC-MK

B

200x

UFR-MK

1000x

C

% de colonias por células sembradas en placa

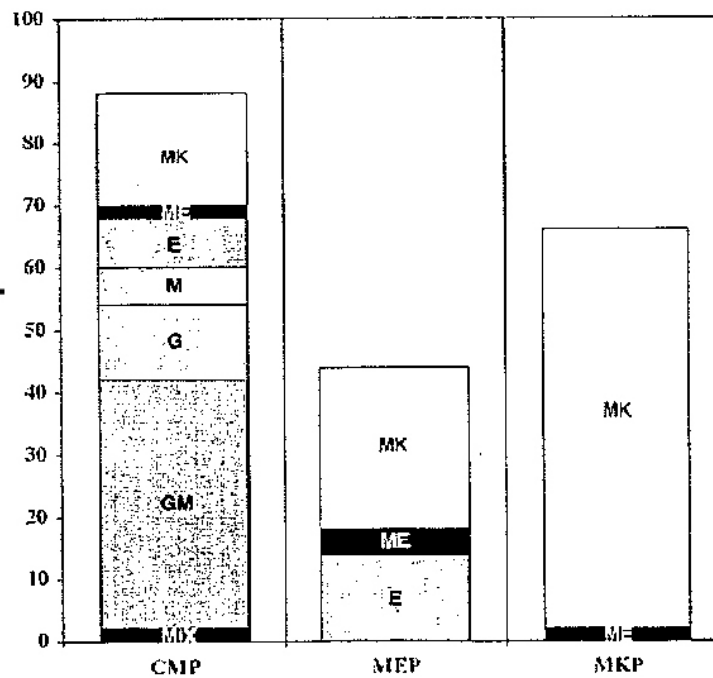
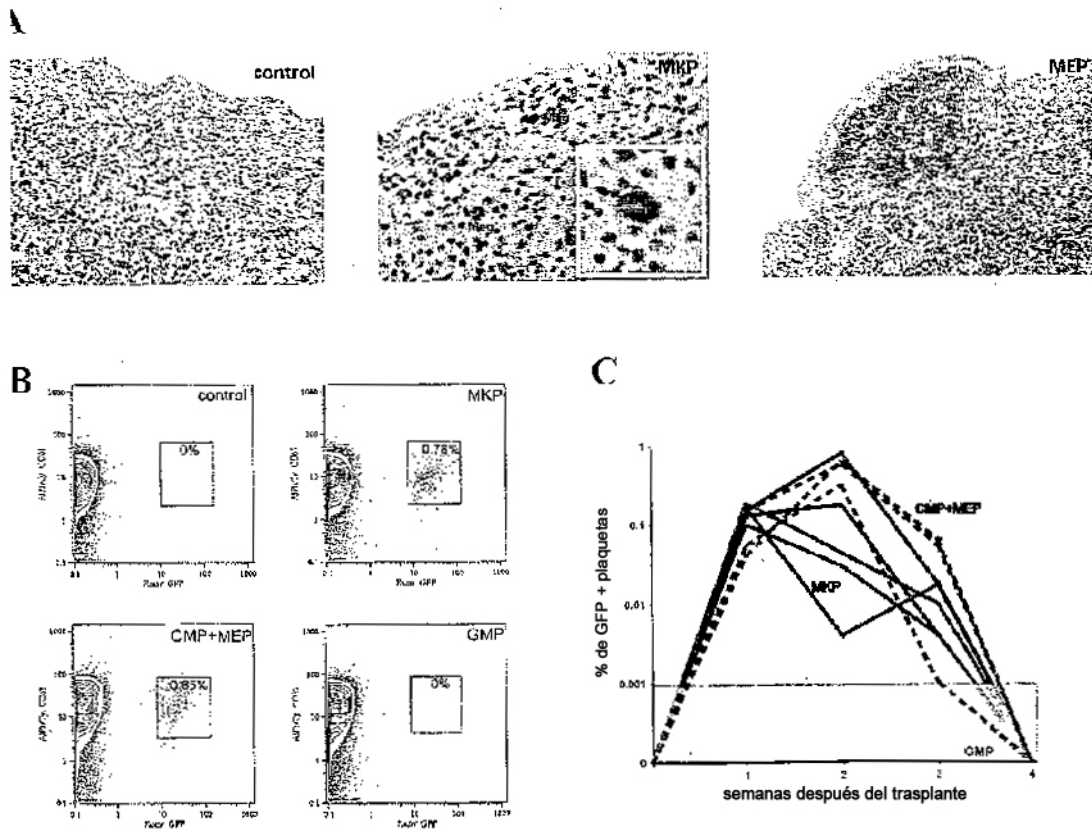


FIG. 2

FIG. 3



A

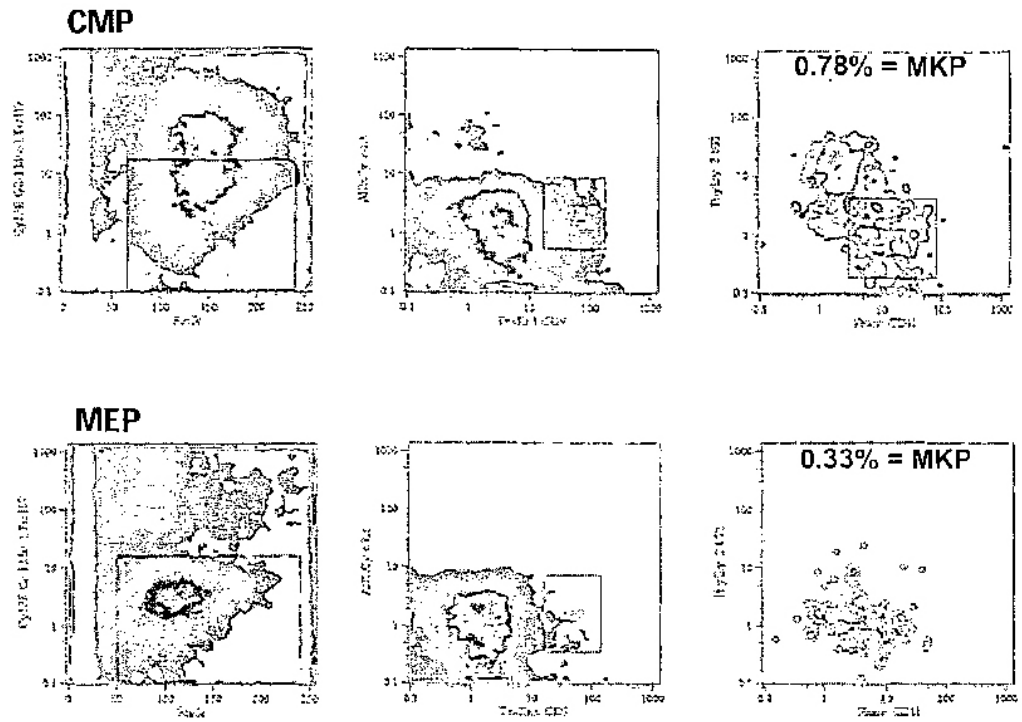


FIG. 4