

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 882 360**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A01N 63/00** (2010.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007 E 17168021 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.06.2021 EP 3255061**

54 Título: **Inmunoempobrecimiento selectivo de un nicho de células madre endógenas para injerto**

30 Prioridad:

**03.11.2006 US 856435 P**

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

**01.12.2021**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad P O Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**WEISSMAN, IRVING L.;  
CZECHOWICZ, AGNIESZKA;  
BHATTACHARYA, DEEPTA y  
KRAFT, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 882 360 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

Inmunoempobrecimiento selectivo de un nicho de células madre endógenas para injerto

5 Las células madre proporcionan los medios para que los organismos mantengan y reparen ciertos tejidos, a través de la capacidad de estas células de auto-renovarse y a través de la replicación asimétrica, para generar células diferenciadas. La potencia de las células madre varía: mientras que las células madre embrionarias pueden dar origen a todos los tejidos de un organismo, las células madre somáticas pueden estar limitadas a un linaje específico. Clínicamente, el trasplante de médula ósea y de células madre hematopoyéticas (HSC) se utilizan habitualmente como un medio para proporcionar a los pacientes la capacidad de generar células sanguíneas, por lo general cuando el paciente ha empobrecido sus células madre endógenas como consecuencia de dosis altas de quimioterapia o radiación. La médula ósea y la sangre periférica se utilizan actualmente como fuentes de células madre autólogas. En el futuro, las células madre cultivadas pueden suponer una alternativa a las células autólogas para trasplantes.

15 En pacientes con cáncer, las células madre hematopoyéticas pueden administrarse como cuidados de soporte para eludir la morbilidad y la mortalidad asociadas con regímenes de tratamiento ablativo de dosis altas que se usan en intentos de curar o prolongar la supervivencia en pacientes con alto riesgo de fracaso terapéutico o cáncer recurrente utilizando la terapia convencional.

20 El rechazo del injerto se define como el fracaso del establecimiento del injerto (rechazo del injerto primario) o la pérdida de un injerto establecido (rechazo del injerto secundario). La aceptación del injerto (o el rechazo del injerto) puede detectarse determinando la presencia de antígenos de superficie celular del tipo donante, isoenzimas, marcadores cromosómicos o polimorfismos de longitud de fragmento de restricción de ADN. Para el injerto hematopoyético, el rechazo puede definirse como granulocitos que no se recuperan hasta  $> 0,5 \times 10^9/l$  o que caen por debajo de este nivel durante  $\geq 3$  días después de la recuperación inicial.

25 El rechazo del injerto o el mal funcionamiento del injerto pueden ser causados por la administración de fármacos mielosupresores, enfermedad de injerto contra huésped e infecciones en el período inicial posterior al trasplante. El ganciclovir, administrado para la prevención o el tratamiento de las infecciones por citomegalovirus, es el fármaco más común que produce rechazo del injerto; este es generalmente reversible cuando se suspende el fármaco. Trimetoprim-sulfametoxazol administrado para prevenir infecciones por *Pneumocystis carinii* es modestamente mielosupresor y en raras ocasiones produce mal funcionamiento del injerto. El citomegalovirus, el parvovirus, el herpesvirus humano 6 y las infecciones micobacterianas y fúngicas también pueden comprometer el injerto. Una aceptación insuficiente también puede ser debido al microambiente o disfunción del estroma de la médula ósea relacionada con la enfermedad subyacente del paciente o con la terapia previa.

30 Las células madre hematopoyéticas endógenas habitualmente residen dentro de los sinusoides de la médula ósea, aunque un número pequeño de las mismas circulan en la sangre periférica. La movilización en la sangre periférica se ve reforzada por la administración de citocinas tales como el factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Esta movilización produce un aumento sustancial en el número de células progenitoras circulantes.

35 La interacción de las células madre con su microambiente proporciona importantes señales de mantenimiento, proliferación y diferenciación. Este entorno físico en el que residen las células madre puede denominarse microambiente o nicho de células madre. Las células del estroma y otras células implicadas en este nicho proporcionan factores solubles y ligados, que tienen una multitud de efectos. Por ejemplo, se sabe que dos familias de proteínas, la familia TGF $\beta$  y la familia Wnt, están implicadas en la regulación de las células madre y se ha observado que son operativas en una serie de sistemas y organismos diferentes.

40 Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM) son importantes tanto para la inducción como para el mantenimiento de la diferenciación en varios linajes celulares. En el caso de la ECM, los receptores específicos de la superficie celular pueden unirse a componentes particulares de la ECM, activando una vía de transducción de la señal intracelular que es análoga a las vías de señalización que se han identificado para los factores de crecimiento polipeptídicos y los inhibidores del crecimiento.

45 La adhesión a la matriz extracelular está mediada por varias clases de receptores, siendo las integrinas las más extensamente caracterizadas. Es necesaria una elevada expresión de integrinas  $\beta 1$  para el mantenimiento de células madre epidérmicas y las integrinas  $\beta 1$  regulan la diferenciación de queratinocitos y otros tipos de células a través de la señalización de la MAP quinasa. Las integrinas pueden mantener la posición de las células en un tejido, y la pérdida o alteración de la expresión de la integrina puede conducir a la pérdida de una posición en un nicho. La matriz extracelular también puede secuestrar y modular la concentración local de factores secretados disponibles dentro del nicho de células madre.

60 Otras señales que controlan las células madre requieren el contacto directo célula-célula. Por ejemplo, la interacción

entre el receptor Notch y su ligando Delta, los cuales son moléculas transmembrana, requiere el contacto célula-célula. La señalización de Notch está implicada en la regulación de tejidos embrionarios y adultos de vertebrados; ejemplos incluyen neuroepitelio retiniano, músculo esquelético y sangre.

5 Se han propuesto varios modelos para la interacción entre las células madre y el nicho. En su forma más simple, se ha sugerido un modelo donde, cuando una célula madre se divide, solo una hija permanece en el nicho y la otra célula hija sale del nicho para diferenciarse. Alternativamente, se ha sugerido que el fenotipo del injerto se determina simplemente por la proporción entre células madre del hospedador y del donante, siendo innecesario el empobrecimiento de células madre endógenas (Quesenberry and Becker (1998)).

10 Burt et al, Blood, vol. 92, 1998, páginas 3505-3514, describe el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria por acondicionamiento inmunosupresor intenso y trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas. La WO 2004/002425 describe un proceso para promover la aceptación del injerto por empobrecimiento de células madre hematopoyéticas. Ishikawa et al., (2002) Experimental Hematology 30(5):488-494 describe un ensayo para el injerto a largo plazo de células humanas hematopoyéticas en base a ratones NOD/SCID/beta2-microglobulina(null recién nacidos. Gaspar et al. (2006) Molecular Therapy 14(4):505-513 describe la reconstitución con éxito de la inmunidad en ADA-SCID mediante terapia génica de células madre después del cese de PEG-AD y el uso de preacondicionamiento leve. Jacobsohn et al. (2004) The Lancet 364(9429):156-162 describe el trasplante de células madre hematopoyéticas de intensidad reducida para el tratamiento de enfermedades no malignas en niños. Kraft et al. (2006) Biology of Blood and Marrow Transplantation 12(2):131 informa que las células hematopoyéticas humanas adultas se diferencian en células T maduras a través de un producto intermedio de CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> dentro del microentorno tímico de ratones. Kraft et al. (2004) Blood 104(11):322B describe el efecto y cinética de empobrecer anticuerpo monoclonal ant-c-kit ACK-2 en hematopoyesis y progenitores hematopoyéticos y la capacidad para acondicionar para el trasplante de médula ósea. Bartolovic et al. (2004) 103(2):523-529 describe un efecto inhibitorio del imatinib sobre células progenitoras normales in vitro. Kraft et al. (2007) Biology of Blood and Marrow Transplantation 13(2):72 informa sobre la capacidad del anticuerpo monoclonal dirigido a c-kit ACK-2 de dirigirse a células madre hematopoyéticas, y facilitar el injerto de injerto de CD34<sup>+</sup> humano y el desarrollo hematolinfoide en ratones inmunodeficientes. Lambert et al. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5(5):543-549 describe anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos para el tratamiento del cáncer. La EP1263463 describe un uso de un anticuerpo o una inmunotoxina que se une selectivamente a CD123 para alterar células progenitoras de cáncer hematológicas.

Los métodos mejorados para el injerto de células madre hematopoyéticas, son de gran interés clínico. La presente invención responde a esta necesidad.

35 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un anticuerpo que se une selectivamente a c-kit y que se conjuga con una fracción citotóxica para su uso en un método de injerto de células madre hematopoyéticas en un paciente humano, en donde el método comprende:

poner en contacto a dicho paciente humano con dicho anticuerpo en una dosis eficaz para extraer selectivamente células madre hematopoyéticas endógenas en médula ósea; y  
 45 introducir células madre hematopoyéticas exógenas en dicho paciente humano después de un periodo de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente dicho anticuerpo de la circulación del paciente, en donde dicho periodo de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente dicho anticuerpo es tal que el anticuerpo está presente a una concentración de menos de 10 ng/ml en el torrente sanguíneo.

La presente invención se refiere a métodos para el injerto de células madre hematopoyéticas, donde las células madre endógenas se extraen selectivamente, abriendo de este modo un nicho para el injerto de células madre donantes. La extracción selectiva elimina sustancialmente las células madre endógenas en el tejido diana, sin extracción general de las células del tejido. La eficacia del injerto se mejora significativamente mediante la extracción selectiva, en comparación con el injerto obtenido sin pretratamiento. Tal extracción selectiva permite mejorar la función del tejido diana durante el período de injerto, en comparación con los métodos que implican la extracción no selectiva. Los métodos de la invención permiten así un injerto eficaz de células madre en ausencia de métodos de extracción no selectivos, por ej., radiación o quimioterapia, que tienen el efecto indeseable de extracción de células diferenciadas implicadas en la función del tejido diana, así como efectos secundarios indeseables sobre otros tejidos (por ejemplo, en células del sistema gastrointestinal, crecimiento del cabello), así como el aumento del riesgo de tumores malignos secundarios.

60 En un caso, la ablación selectiva se logra administrando un agente citotóxico específico de las células madre al paciente antes del injerto. Después de la extracción, y después de un periodo de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente el agente ablativo de células madre de la circulación del paciente, se introduce una dosis eficaz de células madre donantes en el paciente. Los agentes de interés incluyen anticuerpos que se unen específicamente a marcadores expresados selectivamente en células madre, por ejemplo células madre hematopoyéticas.

En otro caso, la ablación selectiva se logra administrando un agente que interfiere selectivamente con la señalización de factores de crecimiento esenciales para el crecimiento o mantenimiento de las células madre, por ejemplo, un agente que interfiere con la señalización mediada por c-kit, la señalización de trombopoyetina, señalización del factor del crecimiento nervioso, etc. Tales agentes incluyen, sin limitación, anticuerpos que interfieren con la señalización de los factores de crecimiento de células madre; y fármacos que inhiben la señalización de los factores de crecimiento de células madre, por ejemplo, imatinib, nilotinib, etc. Tales agentes son conocidos en la técnica, o pueden identificarse cribando anticuerpos candidatos, etc. para la inhibición del crecimiento de las células madre objetivo, por ejemplo, en un ensayo in vitro.

En la invención, las células madre son células madre hematopoyéticas. Dichas células madre pueden usarse en el tratamiento de diversos trastornos sanguíneos, por ejemplo, trastornos genéticos incluyendo anemia aplásica; anemia falciforme; talasemias; inmunodeficiencia grave y similares. En la presente se divulga un método para tratar un trastorno genético de la sangre en un paciente que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente por ejemplo un anticuerpo, que extrae selectivamente células madre hematopoyéticas endógenas; y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre hematopoyéticas de un donante.

Los métodos de la divulgación también son útiles en la inducción de tolerancia en un paciente humano, por ejemplo tolerancia al tejido donante, por ejemplo, en trasplantes de órganos; tolerancia a los autoantígenos, por ejemplo, en el contexto del tratamiento de la enfermedad autoinmune y similares. En la presente se divulga un método para inducir tolerancia en un paciente que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo un anticuerpo, que extrae selectivamente células madre hematopoyéticas; y administrar al paciente una cantidad eficaz de células madre hematopoyéticas de un donante, cuya administración puede realizarse conjuntamente con la introducción de un aloinjerto en dicho paciente, el tratamiento de una enfermedad autoinmune, etc.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Los nichos de HSC disponibles se pueden saturar con HSC del donante. Se analizó la sangre periférica de ratones RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> no acondicionados trasplantados 16 semanas después del trasplante de HSC para granulocitos Ter119-CD3-B220-Mac-1<sup>alto</sup> dispersión lateral<sup>alto</sup> derivados del donante GFP+. En el panel de la derecha, los ratones fueron co-trasplantados con 1.000 HSC CD45.1 y 100.000 células KLS CD34<sup>+</sup> GFP+. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 4-5 para cada dosis); \*\* indica un valor de p <0,05 con relación al quimerismo procedente del grupo trasplantado con 10 HSC. La línea discontinua representa el quimerismo de HSC teórico si el injerto aumentase linealmente con la dosis de células trasplantadas.

Figura 2. El tratamiento con ACK2 empobrece las HSC in vivo. A) ACK2 se elimina del suero de ratones RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> siete días después de la inyección. El suero de ratones que recibieron 500 μg de ACK2 se analizó cada dos días para determinar la persistencia del anticuerpo ACK2 por tinción de mastocitos c-kit<sup>+</sup>. B) La administración de ACK2 conduce al empobrecimiento de HSC de la médula ósea. El número de HSC KLS CD135<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup> en ambos fémures y tibia de ratones tratados con ACK2 y de control se determinó por citometría de flujo en varios puntos de tiempo después del tratamiento. Se muestran valores medios +/- EEM (n = 3 para cada punto temporal); \*\* indica valor p <0,001. C) ACK2, pero no el tratamiento con 2B8, empobrece las HSC funcionales de la médula ósea. El trasplante de 200.000 células de médula ósea no fraccionadas de ratones tratados con 500 μg de ACK2 nueve días antes en receptores irradiados conduce a un quimerismo disminuido en comparación con los controles y otro anticuerpo anti-c-kit 2B8. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 5-8); \*\* indica un valor de p <0,01. D) El tratamiento con ACK2 no causa directamente la movilización de HSC al bazo. Las suspensiones monocelulares de los bazos se generaron a partir de ratones tratados con 500 μg de ACK2 nueve días antes y las suspensiones enteras se trasplantaron junto con 200.000 células de médula ósea competidora de ratones de tipo silvestre. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 3-9); \*\* indica valor p <0,001. E) ACK2 inhibe la proliferación de HSC 19 mediada por SCF. Se aislaron HSC de ratones de tipo silvestre y se cultivaron en presencia de SCF o TPO y ACK2 o 2B8. La proliferación se observó mediante microscopía óptica. \*\* indica un valor de p <0,05 en comparación con muestras tratadas con ACK2. F) El tratamiento con ACK2 empobrece selectivamente las HSC en los momentos iniciales. Se cuantificaron los números totales de HSC (lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD135<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>), MEP (lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>FcyR<sup>-</sup>), CMP (lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>bajo</sup>FcyR<sup>bajo</sup>) y GMP (lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>alto</sup>FcyR<sup>alto</sup>) y se compararon con los de los ratones de control no tratados. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 3); \*\* indica un valor de p <0,001 en comparación con el número relativo de HSC en el mismo punto temporal.

Figura 3. El tratamiento con ACK2 mejora el injerto de HSC. A) El acondicionamiento con ACK2 conduce a mayor quimerismo mieloide del donante. El quimerismo de los granulocitos del donante se midió tras el trasplante de 5.000 HSC en ratones RAG2<sup>-/-</sup> acondicionados con ACK2 siete días antes del trasplante y se comparó con el de los ratones no acondicionados. Se muestran valores medios +/- EEM (n = 4); \*\* indica valor p <0,01. B) El trasplante de HSC de animales tratados con ACK2 conduce a la reconstitución de linfocitos. Los linfocitos B derivados del donante y los linfocitos T de ratones RAG2<sup>-/-</sup> tratados con ACK2 y no acondicionados esplénicos se enumeraron 39 semanas después del trasplante con HSC de tipo silvestre. Se muestran los

valores medios +/- EEM (n = 3-5); \*\* indica valor p <0,01. C) El quimerismo de los granulocitos mide con exactitud el quimerismo de HSC de la médula ósea. El quimerismo de los granulocitos de sangre periférica (Ter119<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>Mac-1<sup>alto</sup> dispersión lateral<sup>alto</sup>) a las 37 semanas después del trasplante se correlacionó con el quimerismo de HSC (c-kit<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>) en la médula ósea a las 39 semanas después del trasplante tras el sacrificio. La línea continua ilustra la regresión lineal con un intervalo de confianza del 95 % sombreado en gris. La línea discontinua representa los valores teóricos si el quimerismo del granulocito del donante era idéntico al quimerismo de las HSC del donante. D) Las HSC del donante, trasplantadas secundariamente de ratones tratados con ACK2, dan lugar a un injerto multilinjaje a largo plazo. El quimerismo de sangre periférica de linfocitos B (B), linfocitos T (T) y granulocitos (G) se muestra 16 semanas después del trasplante secundario en 2 experimentos independientes. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 7-8 en cada experimento).

Figura 4. El quimerismo del donante aumenta con el número de células HSC trasplantadas en ratones tratados con ACK2. A) El tratamiento con ACK2 aumenta el espacio de nicho de HSC disponible. En dos experimentos independientes, se trataron ratones RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> con ACK2 y se trasplantaron nueve días después con dosis variables de HSC (CD45.1). El quimerismo de los granulocitos de los donantes se midió como antes 24 semanas después del trasplante en el primer experimento y 4 semanas después del segundo experimento. Se muestran los valores medios +/- EEM. B) Perfiles de citometría de flujo de ratones trasplantados con 35.000 HSC. Se muestra el quimerismo de los granulocitos de sangre periférica CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>Mac1<sup>alto</sup> dispersión lateral<sup>alto</sup>.

Figura 5. El quimerismo total del donante no refleja con exactitud el quimerismo de las HSC después del trasplante de médula ósea no fraccionado. Se trasplantaron 6,5 x 10<sup>7</sup> células de médula ósea nucleadas no fraccionadas de ratones CD45.2 hembra de tipo silvestre a receptores F1 CD45.1 x CD45.2 femeninos no irradiados de tipo silvestre. La sangre periférica total y el quimerismo de las HSC de médula ósea (definido como KLS CD135-CD34-) se midió 16 semanas después del trasplante.

Figura 6. El tratamiento con ACK2 conduce a una marcada reducción de la celularidad de la médula ósea y aumenta el tamaño de los osteoblastos. Los huesos de húmero de ratones RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> no tratados (Día 0) o tratados con ACK2 se aislaron 2 o 9 días después de la inyección del anticuerpo. Los huesos fueron fijados, descalcificados, embebidos en parafina y se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina en cortes. Ob, osteoblasto; Er, colonia eritroide inmadura.

Figura 7. El tratamiento con ACK2 da como resultado un empobrecimiento de HSC casi completo pero transitorio in vivo. Se utilizó la celularidad de la médula ósea y la frecuencia de HSC para determinar el número de HSC en la médula ósea. También se evaluaron los tamaños de bazo para detectar signos de hematopoyesis extramedular. A), control, B) En el momento de la eliminación de ACK2 (Día 9), C) una semana después de la eliminación de ACK2 (Día 16). Los perfiles de citometría de flujo de las HSC en médula ósea linaje<sup>-</sup> utilizando 3C11, un anticuerpo específico de c-kit que se une a un epítipo distinto de ACK2, así como la frecuencia de KLS CD135-CD150<sup>+</sup>, de las cuales 19,5 % son HSC, se muestran adyacentes a cada punto temporal correspondiente. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 3 para cada punto temporal).

Figura 8. La administración de ACK2 da lugar al empobrecimiento de HSC tanto en ratones de tipo silvestre como inmunodeficientes. El número de HSC KLS CD135-CD150<sup>+</sup> tanto en los fémures como en la tibia de ratones tratados con ACK2 y control se determinaron mediante citometría de flujo 2 días después del tratamiento con 1 mg de ACK2. Se muestran los valores medios +/- EEM (n = 2); \*\* indica valor p <0,001.

Figura 9. Estado normal del ciclo celular en HSC receptoras y donantes después del tratamiento con ACK2. Se obtuvieron los perfiles de ciclo celular de los controles no tratados y tanto de las HSC receptoras como donantes de ratones RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> que habían sido trasplantados 7 meses antes con HSC de tipo silvestre. Las HSC se identificaron como células KLS CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>.

Figura 10. Múltiples rondas de tratamiento con ACK2 y trasplante de HSC dan como resultado niveles sistemáticamente altos de quimerismo del donante. A) Ratones RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> fueron acondicionados con 500 μg de ACK2 y trasplantados siete días más tarde con 5.000 LT-HSC CD45.1+. Se permitió la recuperación de los ratones durante siete días y se acondicionaron una vez más con ACK2 y se trasplantaron siete días más tarde con 5.000 HSC LT GFP<sup>+</sup>. Se realizó una tercera ronda de tratamiento con ACK2 y trasplante de HSC LT utilizando 5.000 HSC CD45.2+CD45.1. La sangre periférica se analizó 24 semanas más tarde para determinar el quimerismo de los granulocitos donantes como antes. Se muestran los valores de quimerismo procedentes de cada trasplante en cuatro animales separados.

Figura 11: El empobrecimiento transitorio de CD4 permite el injerto productivo de HSC con incompatibilidades en el complejo menor de histocompatibilidad. Tres ratones Cμ<sup>-/-</sup> que fueron tratados con anticuerpo anti-CD4 y dos ratones Cμ<sup>-/-</sup> que no se trataron fueron trasplantados con 800 HSC GFP<sup>+</sup>. Se analizó la sangre periférica a las 8 semanas después del trasplante para determinar el quimerismo de granulocitos, linfocitos B y linfocitos T.

### Descripción detallada de las realizaciones

Se describen en la presente métodos para el injerto de células madre, donde las células madre endógenas son extraídas selectivamente. La extracción selectiva puede conseguirse administrando anticuerpos citotóxicos específicos de células madre al paciente antes del injerto. Como alternativa, la extracción selectiva se logra administrando un anticuerpo o fármaco que interfiere selectivamente con la señalización del factor de crecimiento esencial para el crecimiento o mantenimiento de células madre, por ej., un agente que interfiere con la señalización de c-kit, etc. Después de la extracción, y después de un período de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente

el agente de extracción de células madre de la circulación del paciente, se introducen células madre exógenas en el paciente, donde las células madre exógenas ocupan el mismo nicho que las células madre endógenas extraídas. Las células madre exógenas pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas en relación con el paciente.

5 El periodo de tiempo requerido para la eliminación del agente de extracción puede determinarse empíricamente, o puede estar basado en la experiencia previa de la farmacocinética del agente. Cuando el agente es un anticuerpo, la determinación puede controlarse convenientemente conteniendo células madre con suero receptor y determinando la presencia de anticuerpos que se unen a las células madre. En otra alternativa, el suero del paciente puede controlarse para determinar la presencia de inhibición del crecimiento selectivo de células madre. El tiempo de  
10 eliminación es habitualmente el tiempo suficiente para que el nivel del agente de extracción disminuya al menos aproximadamente 10 veces respecto a los niveles máximos, habitualmente al menos aproximadamente 100 veces, 1.000 veces, 10.000 veces o más. Es preferible introducir las células madre donantes dentro de la "ventana" de nicho vacío después de la extracción, habitualmente en aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 día o en el momento de la eliminación.

15 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un nuevo método clínicamente aplicable de trasplante de células madre que facilite el injerto y reconstituya la inmunocompetencia del receptor sin necesidad de radioterapia o quimioterapia o desarrollo de GVHD o rechazo de injerto. Los aspectos de la presente invención se basan en el descubrimiento de que el empobrecimiento del nicho de células madre endógenas facilita el injerto eficaz de células madre hematopoyéticas (HSC). En particular, la presente invención combina el uso de la extracción selectiva de células madre hematopoyéticas endógenas, en combinación con la administración al receptor de células madre hematopoyéticas exógenas, dando como resultado un injerto y tolerancia eficaces a largo plazo.

20 Las células madre endógenas se extraen específicamente mediante la administración de un agente selectivo, por ej., un anticuerpo que destruye las células diana, es decir, las células a las que se une el agente; o un fármaco que interfiere selectivamente con la señalización del factor de crecimiento requerida para el crecimiento o mantenimiento de las células madre. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente a las células madre endógenas de interés. Se entenderá por un experto en la técnica que los marcadores pueden ser compartidos entre células madre y por lo tanto un marcador selectivo puede unirse a ciertas otras células presentes  
30 en el tejido diana y un fármaco selectivo puede actuar sobre otras determinadas células. Por extracción se entiende una reducción en el número de células madre endógenas viables en el tejido diana, que puede ser una reducción de al menos aproximadamente 20 % de células madre endógenas viables, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o más, mediante la administración de uno o más agentes citotóxicos que extraen selectivamente dichas células madre endógenas.

35 El tejido objetivo está determinado por el nicho en el que normalmente reside una célula madre de interés. En un mamífero adulto, las células madre hematopoyéticas endógenas residen en la médula ósea y, por lo tanto, los agentes de extracción reducirán el número de células madre hematopoyéticas residentes en la médula ósea. En un mamífero adulto, las células madre neuronales pueden residir en el hipocampo y, por lo tanto, los agentes de extracción reducirán el número de células madre neurales residentes en el hipocampo. Las células madre mesenquimales también residen en la médula ósea y, por lo tanto, pueden empobrecerse, con agentes para los marcadores apropiados de la médula ósea. Un experto en la materia determinará fácilmente el tejido apropiado para las células madre residentes.

45 Los marcadores ejemplares para la extracción mediada por anticuerpos de células madre hematopoyéticas humanas incluyen CD34; CD90 (thy-1); CD59; CD110 (c-mpl); c-kit; etc. Las células madre hematopoyéticas de ratón pueden ser extraídas selectivamente a través de los marcadores Sca-1; CD150; c-kit; ESAM; etc. Los marcadores útiles para la extracción de células madre mesodérmicas incluyen FcyRII, FcyRIII, Thy-1, CD44, VLA-4 $\alpha$ , LFA-1 $\beta$ , HSA, ICAM-1, CD45, Aa4.1, Sca-1, etc. Las células madre de la cresta neural pueden seleccionarse positivamente con anticuerpos  
50 específicos del receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR). Se han descrito en la técnica células madre/progenitoras neuronales y su uso en varios protocolos terapéuticos ha sido ampliamente descrito. Por ejemplo, entre otros, en las patentes US-6.638.501, Bjornson et al.; US-6.541.255, Snyder et al.; US-6.498.018, Carpenter; Solicitud de patente de los Estados Unidos 20020012903, Goldman et al.; Palmer et al. (2001) Nature 411 (6833): 42-3; Palmer et al. (1997) Mol Cell Neurosci. 8(6):389-404; Svendsen et al. (1997) Exp. Neurol. 148(1):135-46 y Shihabuddin (1999) Mol Med Today. 5(11): 474-80. Las células madre mesenquimales humanas pueden ser extraídas usando los marcadores tales como SH2 (CD105), SH3 y SH4 y Stro-1.

55 El marcador para la extracción mediada por anticuerpos es el c-kit (CD117). Los anticuerpos de interés pueden unirse a, y bloquear la actividad de señalización de, c-kit.

60 Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término también incluye formas genéticamente modificadas tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados. El término "anticuerpo" también incluye formas  
65 de anticuerpos que se unen a antígenos, incluyendo fragmentos con capacidad de unión al antígeno (por ejemplo,

Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG. El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena única recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

5 La selección de anticuerpos para la extracción de células madre endógenas puede estar basada en varios criterios, incluyendo selectividad, afinidad, citotoxicidad, etc. La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “es específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con”, cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. De este modo, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a secuencias de proteínas particulares al menos en un factor dos veces respecto al valor de fondo y más generalmente en un factor de 10 a 100 veces respecto al valor de fondo. En general, los anticuerpos de la presente invención se unen a antígenos en la superficie de células diana en presencia de células efectoras (tales como células asesinas naturales o macrófagos). Los receptores Fc en las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos. La acción cruzada de los receptores Fc indica a las células efectoras que deben destruir las células diana por citólisis o apoptosis. En una realización, la inducción se consigue mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En realizaciones alternativas, los anticuerpos son activos en la inhibición del crecimiento de las células diana y la extracción se consigue interfiriendo con la señalización del factor de crecimiento, por ej., anticuerpos específicos para receptores de factor de crecimiento tales como c-kit.

20 Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede ser generado por métodos recombinantes tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, o por inmunización de un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos pueden ser, en otra alternativa, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma. En un método de hibridoma, un animal hospedador apropiado es generalmente inmunizado con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. En otra alternativa, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

30 Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos. De forma similar, pueden producirse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, la cual se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos.

40 Los anticuerpos también existen como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas. De este modo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')<sub>2</sub>, un dímero de Fab que es una cadena ligera unida a V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> por un enlace disulfuro. El F(ab')<sub>2</sub> puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de esta manera el dímero F(ab')<sub>2</sub> en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra. Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse *de novo* ya sea químicamente o utilizando la metodología del ADN recombinante. De este modo, el término anticuerpo, tal como se utiliza en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos enteros o los sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados utilizando bibliotecas de presentación de fagos.

50 Un “anticuerpo humanizado” es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los restos de una región determinante del complemento (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o estructurales importadas. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y, generalmente, dos dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales (FR) son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, generalmente la de una inmunoglobulina humana.

65 La selectividad de un anticuerpo particular se determina generalmente por la capacidad de un anticuerpo para inhibir competitivamente la unión del segundo anticuerpo al antígeno o por la capacidad de un anticuerpo para reaccionar de forma cruzada con múltiples epítopos. Puede usarse cualquiera de una serie de ensayos de unión competitiva

para medir la competencia entre dos anticuerpos frente al mismo antígeno o entre dos antígenos a un anticuerpo. Un ejemplo de ensayo es un ensayo BIACORE™. Brevemente en estos ensayos, los sitios de unión pueden ser cartografiados en términos estructurales probando la capacidad de los interactuantes, por ej., diferentes anticuerpos, para inhibir la unión de otro. Inyectar dos muestras de anticuerpo o antígeno consecutivas en concentración  
 5 suficiente puede identificar pares de anticuerpos competidores para el mismo epítipo de unión. Las muestras de anticuerpos deben tener el potencial de alcanzar una saturación significativa con cada inyección. La unión neta de la segunda inyección de anticuerpo es indicativa del análisis de epítipos de unión. Se pueden utilizar dos niveles de respuesta para describir los límites de la competencia perfecta frente a la unión no competitiva debido a distintos epítipos. La cantidad relativa de respuesta de unión de la segunda inyección de anticuerpo con relación a la unión  
 10 de epítipos de unión idénticos y distintos determina el grado de superposición del epítipo.

Los anticuerpos de interés para la extracción se pueden ensayar en cuanto a su capacidad para inducir ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). La actividad de ADCC asociada con anticuerpos puede controlarse y cuantificarse mediante la detección de la liberación de marcador o lactato deshidrogenasa de las  
 15 células lisadas, o la detección de la viabilidad celular reducida de la diana (por ejemplo, el ensayo de anexina). Los ensayos de apoptosis pueden realizarse mediante el ensayo Marcado de final de corte de dUTP de Terminal desoxinucleotidil transferasa (TUNEL) (Lazebnik et al., Nature: 371, 346 (1994)). La citotoxicidad también puede detectarse directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, tales como el kit de detección de citotoxicidad de Roche Applied Science (Indianápolis, Ind.). Preferiblemente, los anticuerpos de la presente  
 20 invención inducen al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 80 % de citotoxicidad de las células diana.

Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con un aumento de la actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), especialmente a dosis bajas de anticuerpo. Los métodos para preparar anticuerpos sin fucosa incluyen el crecimiento en células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células  
 25 YB2/0 expresan niveles bajos de ARNm de FUT8, que codifica una enzima ( $\alpha$  1,6-fucosiltransferasa) necesaria para la fucosilación de polipéptidos. Las realizaciones alternativas para promover la citotoxicidad de las células con el tratamiento con anticuerpos incluyen la estimulación mediada por anticuerpos de cascadas de señalización que da como resultado la muerte celular de la célula unida al anticuerpo. Además, la estimulación mediada por anticuerpos del sistema inmunitario innato (por ejemplo, a través de linfocitos NK) también puede dar como resultado la muerte  
 30 de células tumorales o células infectadas viralmente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un resto efector. El resto efector puede ser cualquier número de moléculas, incluyendo restos marcadores tales como marcadores radiactivos o marcadores fluorescentes, o  
 35 puede ser un resto citotóxico. Los agentes citotóxicos son numerosos y variados e incluyen, pero no se limitan a, fármacos citotóxicos o toxinas o fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus correspondientes fragmentos incluyen cadena A de la difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina, auristatina-E y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen compuestos radioquímicos fabricados conjugando radioisótopos a anticuerpos. El direccionamiento del resto  
 40 citotóxico a proteínas transmembrana sirve para aumentar la concentración local del resto citotóxico en el área diana.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo es de un isotipo que puede unirse a los receptores Fc en los macrófagos e impulsar la opsonización (Rashid et al., J. Immunol 1992, 148:1382-1388). En algunas realizaciones, el anticuerpo es de un isotipo de IgG, por ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, etc. En algunas realizaciones, el anticuerpo es  
 45 un anticuerpo de roedor del tipo IgG2b. En otras realizaciones, el isotipo es un anticuerpo humano o humanizado del isotipo IgG3 (para revisión, véase Davies y Metzger, Ann Rev Immunol 1983 1:87-117). Cuando un anticuerpo candidato es de un isotipo que no se une a los receptores Fc y/o impulsa la opsonización, el anticuerpo puede modificarse a través de diversos métodos conocidos en la técnica para cambiar el isotipo a uno que se una a los  
 50 receptores Fc y/o impulse la opsonización.

En ciertas realizaciones, el agente de extracción es un inhibidor selectivo de la señalización del factor de crecimiento requerida para el mantenimiento o crecimiento de las células madre. Ejemplos de tales agentes son los que inhiben la señalización mediada por c-kit, que se requiere para el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas. Tales agentes incluyen anticuerpos que se unen e interfieren con la señalización de c-kit y fármacos que inhiben  
 55 selectivamente la señalización de c-kit, por ej., imatinib, nilotinib, ciertos 1,4-dihidroindeno[1,2-c]pirazoles 5-sustituidos, etc., como se conoce en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos WO03028711; WO/2005/115304; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007) 17:3136-3140 y Chow et al. (2007) Leuk Lymphoma. 2007 48(7):1379-88. Dichos agentes pueden ser seleccionados para determinar la actividad de extracción *in vitro* o *in vivo*, por ej., como se ha demostrado en el Ejemplo 1. Dichos métodos de selección pueden implicar la adición de un agente candidato a un cultivo de células madre y la determinación de la inhibición del  
 60 crecimiento obtenida por el mismo. La inhibición selectiva puede determinarse cuantificando el crecimiento en presencia de uno o más factores de crecimiento. Además de c-kit, los receptores de factor de crecimiento de interés incluyen el receptor de trombopoyetina (CD110) sobre células madre hematopoyéticas y el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR) en células madre neurales. Al igual que con los anticuerpos de extracción, se administran agentes inhibidores del factor de crecimiento a una dosis eficaz para disminuir el número  
 65

de células madre endógenas viables en el tejido diana, la cual puede ser una reducción de al menos aproximadamente 20 % de células madre endógenas viables, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o más. Por ejemplo, se puede administrar imatinib a una dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones de la invención, se administra una combinación de anticuerpos de extracción y agentes inhibidores del factor de crecimiento. En tales terapias de combinación, se pueden obtener efectos sinérgicos cuando se utiliza una cantidad reducida de uno o ambos agentes para conseguir el efecto deseado.

Para la extracción, el agente de extracción se formula en una composición farmacéutica. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y será verificable por un experto en la materia usando técnicas conocidas (por ej., Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*; Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999) y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)). Como es sabido en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para el acondicionamiento del paciente, la administración sistémica frente a localizada, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la interacción del fármaco y la gravedad de la afección y será verificable con experimentación rutinaria por los expertos en la materia.

Un "paciente" para los propósitos de la presente invención es un humano. El paciente es un humano.

La administración de los agentes se puede hacer de diversas maneras como se ha descrito anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular.

En una realización, las composiciones farmacéuticas están en una forma soluble en agua, tal como estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluyan tanto sales de adición de ácido como de base. "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de otro modo indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p- toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. "Sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables" incluyen las derivadas de bases inorgánicas tales como las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Particularmente útiles son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más de los siguientes: proteínas portadoras tales como seroalbúmina; tampones; cargas tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; agentes colorantes y polietilenglicol.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en varias formas de dosificación unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitarias adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas para chupar. Se reconoce que las composiciones de la invención cuando se administran por vía oral, deben protegerse de la digestión. Esto se logra generalmente mediante la formación de complejos de las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o envasando las moléculas en un vehículo adecuadamente resistente, tal como un liposoma o una barrera de protección. Los medios para proteger a los agentes de la digestión son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones para administración comprenderán comúnmente un anticuerpo u otro agente de extracción disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar varios vehículos acuosos, por ejemplo, una solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están exentas de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science* (15<sup>a</sup> ed., 1980) y *Goodman and Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman et al., Eds., 1996)).

65

Por lo tanto, una composición farmacéutica típica para administración intravenosa sería de aproximadamente 0,1 a 10 mg por paciente y día. Puede usarse dosis de 0,1 hasta 100 mg por paciente y día, particularmente cuando el fármaco se administra a un sitio aislado y no al torrente sanguíneo, tal como en una cavidad corporal o en un lumen de un órgano. Pueden administrarse dosis sustancialmente mayores en la administración tópica. Los métodos  
 5 actuales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science y Goodman and Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, *supra*.

Las composiciones que contienen agentes de extracción, por ej., anticuerpos, se pueden administrar para  
 10 tratamiento terapéutico. Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para extraer sustancialmente células madre endógenas dirigidas, como se ha descrito anteriormente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden administrarse dependiendo de la dosificación y frecuencia según se requiera y toleradas por el paciente. La dosis particular requerida para un tratamiento dependerá de la afección y la historia del mamífero, así  
 15 como de otros factores tales como edad, peso, sexo, vía de administración, eficacia, etc.

En una realización alternativa de la invención, se administra un agente acondicionador, particularmente un anticuerpo específico de uno o más de CD4, una especificidad de linfocitos NK, una especificidad de macrófagos y CD8 antes de la infusión de células madre exógenas. En una realización, el anticuerpo específico de uno o más de  
 20 CD4; una especificidad de linfocitos NK, una especificidad de macrófagos y CD8 se administra antes del trasplante de las células, por lo general desde alrededor 3 días hasta alrededor 12 horas antes del trasplante, más generalmente alrededor de un día antes del trasplante. Puede mantenerse una reducción en el nivel de linfocitos T en el animal receptor durante al menos una semana, al menos dos semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o más después del trasplante. Tal reducción puede proporcionar alrededor de aproximadamente un 50 %, alrededor de aproximadamente un 75 %, alrededor de aproximadamente un 90 % de reducción de los linfocitos T CD4 positivo, en comparación con los niveles de linfocitos T en ausencia de tratamiento. La reducción de los linfocitos T puede lograrse, por ejemplo, mediante administración semanal de un anticuerpo anti-CD4, a una dosis eficaz para disminuir los linfocitos T en el nivel deseado.  
 25

La expresión célula madre se utiliza en la presente memoria para referirse a una célula de mamífero que tiene la capacidad de auto-renovarse y de generar progenie diferenciada (véase Morrison et al. (1997) Cell 88: 287- 298). Generalmente, las células madre también tienen una o más de las siguientes propiedades: una capacidad de someterse a la replicación asincrónica o simétrica, es decir, donde las dos células hijas después de la división pueden tener diferentes fenotipos; amplia capacidad de auto-renovación; capacidad para la existencia en una forma mitóticamente quiescente y la regeneración clonal de todo el tejido en el que existen, por ejemplo, la capacidad de las células madre hematopoyéticas para reconstituir todos los linajes hematopoyéticos.  
 30  
 35

Las células madre endógenas pueden caracterizarse por la presencia de marcadores asociados con epítomos específicos identificados por anticuerpos. Las células madre de interés incluyen células madre hematopoyéticas; células madre de la cresta neural (véase Morrison et al. (1999) Cell 96: 737 - 749); células madre mesenquimales; células madre mesodérmicas; etc. Las células de interés son generalmente de mamíferos, donde el término se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de laboratorio, deportivos o animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, ratones, ratas, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.  
 40  
 45

Para los fines del injerto, se administra a un paciente una composición que comprende células madre hematopoyéticas. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Negrin et al. (2000) Biol Blood Marrow Transplant. 6(3): 262-71 describe el trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> intensivamente purificadas. Después de una dosis alta de quimioterapia, las células se perfundieron a una mediana de la dosis de 11,3 x 10<sup>5</sup>/kg. Los receptores mostraron una aceptación del injerto hematopoyético rápido y sostenido. McNiece et al. (2000) Blood 96 (9): 3001-7 observaron que las células progenitoras de sangre periférica expandidas *ex vivo* proporcionan una recuperación rápida de los neutrófilos después de una quimioterapia de dosis alta en pacientes con cáncer de mama. Los injertos autólogos de células madre hematopoyéticas se describen, entre otros, en Balduzzi et al. (2001) Leukemia. 15(1):50-6. Se perfundieron células CD34<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>, lo que permitió la aceptación inmediata del injerto y la reconstitución inmunológica. Abundantes trabajos exploran varios métodos para la purificación de células madre y el subsecuente injerto, incluyendo la citometría de flujo; un sistema isolex (Klein et al. (2001) Bone Marrow Transplant. 28(11):1023-9; Prince et al. (2002) Cytotherapy 4(2):137-45); separación inmunomagnética (Prince et al. (2002) Cytotherapy 4(2):147-55; Handgretinger et al. (2002) Bone Marrow Transplant. 29(9):731-6; Chou et al. (2005) Breast Cancer. 12(3): 178-88) y similares. Estas referencias describen procedimientos, composiciones celulares y dosis para el trasplante de células madre hematopoyéticas.  
 50  
 55  
 60

Las células que se emplean pueden ser frescas, congeladas o haber sido sometidas a cultivo previo. Pueden ser fetales, de neonatos, adultos, etc. Las células madre hematopoyéticas pueden obtenerse del hígado fetal, médula ósea, sangre, particularmente de sangre periférica movilizada por G-CSF o GM-CSF, o cualquier otra fuente convencional. Las células para injerto opcionalmente se aíslan de otras células, donde la forma en la que las células  
 65

madre se separan de otras células del linaje hematopoyético u otro no es crítica para esta invención. Si se desea, puede obtenerse una población sustancialmente homogénea de células madre o progenitoras mediante aislamiento selectivo de células libres de marcadores asociados con células diferenciadas, al tiempo que presentan características epitópicas asociadas con las células madre.

5 Las células pueden ser alteradas genéticamente para introducir genes útiles en la célula diferenciada, por ej., para la reparación de un defecto genético en un marcador individual seleccionable, etc., o genes útiles en la selección contra células ES indiferenciadas. Las células también pueden ser modificadas genéticamente para aumentar la supervivencia, la proliferación de control y similares. Las células pueden alterarse genéticamente por transfección o  
10 transducción con un vector adecuado, recombinación homóloga, u otra técnica apropiada, de manera que expresen un gen de interés. En una realización, las células se transfectan con genes que codifican un componente catalítico de telomerasa (TERT), generalmente bajo un promotor heterólogo que aumenta la expresión de la telomerasa más allá de lo que ocurre bajo el promotor endógeno (véase la Solicitud de patente internacional WO 98/14592). En otras realizaciones, se introduce un marcador seleccionable, para proporcionar una mayor pureza de la célula  
15 diferenciadora deseada. Las células pueden alterarse genéticamente usando sobrenadantes que contienen vector durante un periodo de 8-16 h y después intercambiarse a medio de crecimiento durante 1-2 días. Las células genéticamente alteradas se seleccionan usando un agente de selección de fármacos tal como puromicina, G418, o blasticidina y después se vuelven a cultivar.

20 Las células de esta invención también pueden ser alteradas genéticamente con el fin de aumentar su capacidad para participar en la regeneración de tejidos, o para administrar un gen terapéutico a un sitio de administración. Se diseña un vector utilizando la secuencia de codificación conocida para el gen deseado, operativamente unido a un promotor que es constitutivo, panespecífico, específicamente activo en un tipo celular diferenciado, etc. Los promotores inducibles adecuados se activan en un tipo de célula diana deseada, ya sea la célula transfectada, o su  
25 progenie. Por activación transcripcional, se pretende que la transcripción se incremente por encima de los niveles basales en la célula diana al menos aproximadamente 100 veces, más habitualmente por lo menos aproximadamente 1000 veces. Se conocen varios promotores que son inducidos en diferentes tipos de células.

30 Existen muchos vectores útiles para transferir genes exógenos a células de mamífero diana. Los vectores pueden ser episomales, por ej., plásmidos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, etc. o pueden estar integrados en el genoma de la célula diana, mediante recombinación homóloga o integración aleatoria, por ej., vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, HIV-1, ALV, etc. Para la modificación de las células madre, se prefieren vectores lentivirales. Los vectores lentivirales tales como los basados en secuencias gag del VIH o VIF pueden usarse para transfectar células que no se dividen, tales como la fase de reposo de las células madre  
35 humanas (ver Uchida et al. (1998) P.N.A.S. 95(20):11939-44).

También pueden utilizarse combinaciones de retrovirus y una línea de empaquetado apropiada, donde 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. Las células se dejan a continuación crecer en  
40 el medio de cultivo durante intervalos cortos en algunas aplicaciones, por ej., 24-73 horas, o durante al menos dos semanas y pueden dejarse crecer durante cinco semanas o más, antes del análisis. Los vectores retrovirales comúnmente utilizados son "defectuosos", es decir, incapaces de producir proteínas virales necesarias para la infección productiva. La replicación del vector requiere crecimiento en la línea celular de empaquetado.

45 La especificidad de la célula hospedadora del retrovirus está determinada por la proteína de la envoltura, *env* (p120). La proteína de la envoltura es proporcionada por la línea de células de empaquetado. Las proteínas de la envoltura son de al menos tres tipos, ecotrópico, anfotrópico y xenotrópico. Los retrovirus empaquetados con una proteína de cubierta ecotrópica, por ej., MMLV, son capaces de infectar a la mayoría de los tipos de células murinas y de ratas. Las líneas celulares de empaquetado ecotrópicas incluyen BOSC23 (Pear et al. (1993) P.N.A.S. 90:8392-8397). Los  
50 retrovirus que llevan una proteína de envoltura anfotrópica, por ej., 4070A (Danos et al, *supra.*), son capaces de infectar la mayoría de los tipos de células de mamífero, incluyendo el ser humano, perro y ratón. Las líneas celulares de empaquetamiento anfotrópico incluyen PA12 (Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902) GRIP (Danos et al. (1988) PNAS 85:6460-6464). Los retrovirus empaquetados con una proteína de envoltura xenotrópica, por ej., AKR *env* son capaces de infectar la mayoría de los tipos de  
55 células de mamíferos, excepto las células murinas.

Los vectores pueden incluir genes que deben eliminarse posteriormente, por ej., utilizando un sistema de recombinasa tal como Cre/Lox o las células que las expresan pueden ser destruidas, por ej., mediante la inclusión de genes que permiten la toxicidad selectiva, como herpesvirus TK, bcl-xs, etc.

60 En la invención, el agente de extracción como se define en la reivindicación 1 y el agente acondicionador opcional se administran en forma de ciclo corto de terapia antes del trasplante. Habitualmente, el tratamiento de extracción se completa por lo menos aproximadamente una semana antes del trasplante, por lo menos aproximadamente 5 días antes del trasplante, por lo menos aproximadamente 3 días antes del trasplante. El período de tiempo entre la finalización del tratamiento de extracción y el trasplante es suficiente para eliminar sustancialmente los agentes de  
65

extracción de la circulación del paciente. Como se usa en la presente expresión “eliminar sustancialmente” cuando se hace referencia a anticuerpos proporciona una concentración de menos de aproximadamente 10 ng/ml presente en el torrente sanguíneo.

5 Las células madre exógenas, que pueden ser parcialmente o sustancialmente purificadas, se administran al paciente de acuerdo con la práctica estándar, por ej., a una concentración de aproximadamente  $10^4$  aproximadamente  $10^6$  células madre/kg de peso del paciente.

10 El proceso de extracción, acondicionamiento opcional y trasplante puede repetirse, por ejemplo como se muestra en la Figura 10, en procesos en serie.

15 Las realizaciones del sistema y los métodos de acuerdo con la invención son clínicamente aplicables al trasplante en receptores humanos y, por ejemplo, son adaptables para tener en cuenta incertidumbres tales como el momento de la disponibilidad de células alogénicas para receptores humanos y similares. Las realizaciones de acuerdo con la invención son aplicables a trasplantes semi-alogénicos tales como, pero sin limitarse a, trasplante entre donantes/receptores relacionados que son parcialmente incompatibles en un locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II y a trasplantes totalmente alogénicos tales como, pero sin limitarse a, trasplante entre donante/receptor no relacionados, completamente incompatibles para MHC, incluyendo trasplantes xenogénicos a seres humanos. En realizaciones específicas, se realizan trasplantes de acuerdo con la invención en los que el donante y el receptor no comparten loci de histocompatibilidad, por ejemplo, trasplantes entre especies o trasplantes entre el donante y el receptor de la misma especie en el que el donante y el receptor no comparten loci. En un ejemplo más específico, el trasplante es de un donante humano a un receptor humano, donde el donante y el receptor no comparten marcadores HLA. La invención abarca el trasplante de donantes a receptores de cualquier especie, en los que el donante y el receptor no comparten ningún inmunodeterminante análogo a los marcadores HLA o los loci del MHC. En diversas realizaciones, el donante y el receptor pueden ser individuos genéticamente no relacionados, o pueden ser parientes próximos.

20 Las realizaciones de la invención incluyen el trasplante en un paciente que sufre un trastorno genético sanguíneo, donde se trasplantan células madre exógenas de un fenotipo normal al paciente. Tales enfermedades incluyen, sin limitación, el tratamiento de anemias causadas por la síntesis de hemoglobina defectuosa (hemoglobinopatías).

25 La molécula de Hb de un adulto normal (Hb A) consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ . La Hb fetal (Hb F, en la cual las cadenas gamma reemplazan a las cadenas beta) disminuye gradualmente en los primeros meses de vida hasta alcanzar <2 % de la Hb total en adultos. En ciertos trastornos de la síntesis de Hb y en los estados aplásicos y mieloproliferativos, se puede aumentar la HbF. La sangre normal también contiene aproximadamente el 2,5 % de Hb A2 (compuesta por cadenas alfa y delta). Los defectos pueden tener como resultado moléculas de Hb con propiedades físicas o químicas anormales; algunos tienen como resultado anemias que son graves en homocigotos pero leves en heterocigotos. Algunos pacientes pueden ser heterocigotos por dos de tales anomalías y tienen anemia con características de ambos rasgos.

30 Las enfermedades de células falciformes incluyen la enfermedad HbS, la anemia drepanocítica y la meniscocitosis. La anemia hemolítica crónica que se produce casi exclusivamente en los negros y se caracteriza por eritrocitos en forma de hoz causada por la herencia homocigótica de la Hb S. Los homocigotos tienen anemia de células falciformes; los heterocigotos no son anémicos, pero el rasgo falciforme (anemia falciforme) puede ser demostrado *in vitro*. En la Hb S, la valina está sustituida por ácido glutámico en el sexto aminoácido de la cadena beta. La desoxi-Hb S es mucho menos soluble que la desoxi-Hb A; forma un gel semisólido de tactoides en forma de varilla que hace que los glóbulos rojos se hinchen en sitios de baja  $PO_2$ . Los eritrocitos distorsionados e inflexibles se adhieren al endotelio vascular y tapan pequeñas arteriolas y capilares, lo que conduce a la oclusión y al infarto. Debido a que los eritrocitos falciformes son demasiado frágiles para resistir el embate mecánico de la circulación, se produce la hemólisis después de entrar en la circulación. En los homocigotos, las manifestaciones clínicas son causadas por la anemia y acontecimientos de oclusión de vasos que tienen como resultado isquemia e infarto del tejido. El crecimiento y el desarrollo se deterioran y la susceptibilidad a la infección aumenta. La anemia suele ser grave, pero varía mucho entre los pacientes. La anemia puede exacerbarse en los niños por secuestro agudo de las células falciformes en el bazo.

35 La crisis aplásica se produce cuando la eritropoyesis de la médula disminuye durante la infección aguda (especialmente viral). Los infartos óseos producen crisis de dolor, el complejo de síntomas más común en los estados Hb S-S, S-A y S-C. El dolor de huesos largos es el síntoma más común; en niños, el dolor intenso en las manos y los pies es común y típico. Puede producirse artralgia con fiebre y es común la necrosis avascular de la cabeza femoral. Las úlceras crónicas perforadas en los tobillos también son comunes. El dolor abdominal intenso con vómito puede simular trastornos abdominales graves; tales crisis dolorosas suelen asociarse con dolor de espalda y articular. La hemiplejía, la parálisis de los nervios craneales y otras alteraciones neurológicas pueden tener como resultado la oclusión de los vasos intracraneales mayores. Las infecciones, particularmente neumocócicas, son comunes, especialmente en la primera infancia y se asocian con una alta tasa de mortalidad.

65

En la actualidad, la terapia es sintomática porque no hay ningún fármaco antidepranocítico *in vivo*. En general, las crisis se manejan con una hidratación oral o IV intensa y con analgésicos, incluyendo narcóticos para el dolor. En caso necesario pueden administrarse transfusiones (generalmente cada 3 a 4 semanas) para mantener la Hb A en > 50 % (50 a 70 %) de la Hb total. El trasplante de médula ósea ha tenido éxito en un pequeño número de pacientes.  
 5 La terapia génica ofrece actualmente la mejor esperanza para la curación.

En la enfermedad de la hemoglobina C, el grado de anemia es variable pero puede ser moderadamente grave. De los negros en los EE.UU., del 2 al 3 % muestran el rasgo. Los síntomas en los homocigotos son causados por la anemia. La artralgia es común. Puede producirse dolor abdominal, pero no se producen las crisis abdominales de la anemia de células falciformes. El paciente puede tener una ligera ictericia. El bazo generalmente se agranda. Pueden ocurrir episodios de secuestro esplénico con dolor en el cuadrante superior izquierdo y disminuciones abruptas en los valores de eritrocitos; si son graves, puede ser necesaria una esplenectomía.  
 10

En los homocigotos, la anemia es normocítica, donde se observa en el frotis del 30 al 100 % de células diana, esferocitos asociados y, raramente, glóbulos rojos que contienen cristales. En pacientes con microcitosis que no presentan deficiencia de Fe, está presente alfa-talasemia concomitante. Los reticulocitos aumentan ligeramente y pueden observarse eritrocitos nucleados. Los eritrocitos no tienen forma de hoz. En la electroforesis, la Hb es de tipo C. La bilirrubina sérica está ligeramente elevada y el urobilinógeno aumenta en las heces y la orina. No hay un tratamiento específico. La anemia no suele ser lo suficientemente grave como para requerir la transfusión de sangre.  
 15  
 20

La enfermedad por hemoglobina E es la tercera Hb más frecuente en el mundo (después de la Hb A y la Hb S), principalmente en las poblaciones de Asia Sudoriental (> 15 %) y negras, pero rara vez en las poblaciones chinas. La Hb E es  $\alpha_2 \beta_2 26$  (glu  $\rightarrow$  lis). En los heterocigotos (Hb AE), no se observan anomalías en la sangre periférica. La Hb E homocigótica se asocia con una anemia microcítica leve con focalización prominente. Los heterocigotos dobles para la Hb E y la beta-talasemia tienen una enfermedad hemolítica más grave que en el caso de la S-talasemia.  
 25

Las talasemias son un grupo de anemias crónicas, hereditarias y microcíticas, caracterizadas por una síntesis de Hb defectuosa y una eritropoyesis ineficaz, particularmente común en personas de ascendencia mediterránea, africana y del sudeste asiático. La talasemia es uno de los trastornos hemolíticos hereditarios más comunes. Es el resultado de la síntesis desequilibrada de Hb causada por la disminución de la producción de al menos una cadena polipeptídica de globina ( $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ).  
 30

La  $\beta$ -talasemia es el resultado de la disminución de la producción de cadenas peptídicas  $\beta$ . La enfermedad suele ser autosómica recesiva: los heterocigotos son portadores y tienen anemia microcítica leve a moderada asintomática (talasemia menor); los síntomas típicos se producen en los homocigotos (talasemia mayor). También existen las formas autosómicas dominantes. La  $\alpha$ -talasemia, que resulta de la disminución de la producción de cadenas de polipéptido  $\alpha$ , tiene un patrón de herencia más complejo, porque el control genético de la síntesis de la cadena  $\alpha$  implica dos pares de genes estructurales. Los heterocigotos para el defecto en un solo gen (alfa-talasemia-2 [silenciosa]) no suelen presentar anomalías clínicas. Los heterocigotos para un defecto en dos genes u homocigotos para el defecto en un solo gen (alfa-talasemia-1 [rasgo]) tienden a manifestar un cuadro clínico similar al de los heterocigotos para  $\beta$ -talasemia. La herencia tanto de un defecto de un solo gen como de un defecto para dos genes perjudica más gravemente a la producción de la cadena alfa. La deficiencia en la cadena  $\alpha$  da lugar a la formación de tetrámeros de las cadenas  $\beta$  en exceso (Hb H) o, en lactantes, de las cadenas  $\gamma$  (Hb de Bart). La homocigosidad para el defecto de doble gen es letal porque la Hb que carece de cadenas alfa no transporta O<sub>2</sub>.  
 35  
 40  
 45

Las características clínicas de las talasemias son similares pero varían en gravedad. La  $\beta$ -talasemia menor es clínicamente asintomática. La  $\beta$ -talasemia mayor (anemia de Cooley) presenta síntomas de anemia grave, espacio de médula ampliamente expandido y sobrecarga de Fe transfusional y absorbente. Los pacientes tienen ictericia y úlceras en las piernas y se produce colelitiasis (como en la anemia de células falciformes). La esplenomegalia es común y el bazo puede ser enorme. Si se desarrolla un secuestro esplénico, se acorta el tiempo de supervivencia de los eritrocitos normales transfundidos. La hiperactividad de la médula ósea provoca el engrosamiento de los huesos craneales y las eminencias malares. La afectación de los huesos largos hace que las fracturas patológicas sean comunes. Las tasas de crecimiento se deterioran y la pubertad puede verse significativamente retrasada o ausente. Los depósitos de Fe en el músculo cardíaco pueden causar disfunción e insuficiencia cardíaca. La siderosis hepática es típica, lo que conduce a trastornos funcionales y cirrosis. La  $\alpha$ -talasemia-1 (rasgo) tiene una presentación similar a la de la  $\beta$ -talasemia menor. Los pacientes con enfermedad de la Hb H a menudo tienen anemia hemolítica sintomática y esplenomegalia.  
 50  
 55

El trasplante alogénico de médula ósea ha tenido éxito en el pequeño número de pacientes que lo han recibido, pero el trasplante para enfermedades hematológicas se ha visto limitado por la morbilidad y mortalidad asociadas con la radiación y la quimioterapia utilizadas para el acondicionamiento.  
 60

La anemia aplásica es el resultado de una pérdida de precursores de eritrocitos, ya sea por un defecto en la reserva de células madre o por una lesión en el microambiente que soporta la médula ósea, y a menudo con valores de MCV altos en el límite. El término anemia aplásica implica comúnmente una panhipoplasia de la médula con  
 65

leucopenia y trombocitopenia asociadas.

Aproximadamente la mitad de los casos de anemia aplásica verdadera son idiopáticos. Una forma rara de anemia aplásica, la anemia de Fanconi ocurre en niños con cromosomas anormales. La aplasia pura de eritrocitos implica un mecanismo selectivamente destructivo para los precursores eritroides. La aplasia crónica de los eritrocitos se ha asociado con trastornos hemolíticos (eritroblastopenia aguda), timomas, lesiones inmunológicas y menos frecuentemente con fármacos (por ejemplo, tranquilizantes, anticonvulsivos), toxinas (fosfatos orgánicos), deficiencia de riboflavina y leucemia linfocítica crónica. Una forma congénita rara, el síndrome de Blackfan-Diamond, que originalmente se creía que se manifestaba durante la lactancia, se ha diagnosticado en la edad adulta.

El trasplante de médula ósea de un gemelo idéntico o un hermano HLA compatible es un tratamiento probado para la anemia aplásica grave, particularmente en pacientes de <30 años. Al diagnóstico, los hermanos pueden ser evaluados para la compatibilidad HLA.

La inmunodeficiencia combinada es un grupo de trastornos caracterizados por una deficiencia congénita y habitualmente hereditaria de sistemas de linfocitos B y T, aplasia linfocítica y displasia tímica. Las inmunodeficiencias combinadas incluyen inmunodeficiencia combinada severa, agammaglobulinemia suiza, inmunodeficiencia combinada con deficiencia de adenosina desaminasa o nucleósido fosforilasa e inmunodeficiencia combinada con inmunoglobulinas (síndrome de Nezelof). La mayoría de los pacientes presentan infecciones tempranas con aftas, neumonía y diarrea. Si no se trata, la mayoría muere antes de los 2 años. La mayoría de los pacientes tienen deficiencia profunda de linfocitos B e inmunoglobulina. Los siguientes puntos son característicos: linfopenia, niveles bajos o ausencia de linfocitos T, respuesta proliferativa deficiente a mitógenos, anergia cutánea, ausencia de sombra tímica y reducción del tejido linfocítico. La neumonía por *Pneumocystis* y otras infecciones oportunistas son comunes.

Existen varias variantes del trastorno. En el 67 % de los casos, puede establecerse una herencia ligada al cromosoma X o una herencia autosómica recesiva. La mayoría de los pacientes con herencia ligada al cromosoma X tienen inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X, asociada con mutaciones de la cadena  $\gamma$  y del receptor de IL-2.

Aproximadamente la mitad de los pacientes con una herencia autosómica recesiva tienen deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), una enzima de la vía de recuperación de las purinas que convierte la adenosina y la desoxiadenosina en inosina y desoxiinosina, respectivamente. La deficiencia de ADA produce cantidades elevadas de desoxiadenosina trifosfato (dATP), que inhibe la síntesis de ADN. Los pacientes deficientes en ADA pueden ser normales al nacer pero desarrollan un deterioro inmunológico progresivo a medida que se acumula el dATP. En el síndrome de Nezelof (inmunodeficiencia combinada con Igs), existe una profunda inmunodeficiencia celular, pero niveles normales, casi normales o elevados de Igs, pero con una función deficiente de anticuerpos.

Otras variantes incluyen deficiencias de citocinas (deficiencia de IL-1, deficiencia de IL-2, deficiencia múltiple de citocinas), defectos estructurales del receptor de linfocitos T, defectos de la transducción de señales, ausencia de antígenos HLA de la clase II y/o de la clase I (síndrome de linfocitos desnudos), enanismo de miembros cortos, hipoplasia cartílago-cabello con inmunodeficiencia e inmunodeficiencia combinada con eosinofilia (síndrome de Omenn).

## Parte experimental

### Ejemplo 1

#### Empobrecimiento basado en anticuerpos de nichos vacíos de células madre hematopoyéticas para el trasplante eficiente

Demostramos que la administración de un anticuerpo empobrecedor específico de c-kit conduce a la eliminación altamente eficiente de las células madre hematopoyéticas (HSC) del hospedador y a altos niveles de quimerismo de las HSC del donante después del trasplante.

Tras el trasplante intravenoso, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden albergar nichos especializados de médula ósea, sin embargo los niveles de aceptación del injerto rara vez superan el 0,5 % tras el trasplante en receptores inmunodeficientes sin acondicionamiento tóxico. Aquí, proporcionamos la prueba de que, aparte de las barreras inmunitarias, el injerto de HSC del donante está restringido por la ocupación de los nichos apropiados por las HSC del hospedador. La administración de ACK2, un anticuerpo empobrecedor específico de c-kit, condujo a la eliminación transitoria de > 98 % de las HSC endógenas y el trasplante de estos animales con HSC del donante condujo a niveles de quimerismo de hasta el 90 %. La extrapolación de estos métodos a seres humanos puede permitir regímenes de acondicionamiento eficientes pero menos estrictos para el trasplante.

Las HSC son las únicas células dentro de la médula ósea (BM) que poseen la capacidad de diferenciarse en todos los linajes de sangre y sin embargo auto-renovarse y mantenerse durante toda la vida. Estas dos propiedades, junto

con la capacidad de albergar microambientes altamente especializados dentro de la médula ósea que les permiten funcionar correctamente, han permitido que las HSC, incluidas en las preparaciones hematopoyéticas en los trasplantes de BM, se conviertan en las únicas células madre en el uso clínico rutinario. Son ampliamente utilizadas para el tratamiento de algunos trastornos hematológicos, como la inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y el fracaso hematopoyético después de la irradiación y la quimioterapia. También se usan en varios otros trastornos hematológicos. En modelos animales y anecdóticamente en seres humanos, las HSC de donantes normales también han demostrado ser útiles en el tratamiento de una amplia gama de trastornos autoinmunitarios tales como diabetes, el modelo NZB/W de lupus y esclerosis múltiple. Las HSC también son capaces de inducir la tolerancia al trasplante a los tejidos donantes de HSC. Sin embargo, el uso de HSC para tales trastornos no es común debido a los regímenes de acondicionamiento tóxicos actualmente requeridos para el injerto y la enfermedad de injerto contra huésped causada por linfocitos T en la médula o sangre movilizada que suministra las HSC.

Generalmente, el trasplante alogénico eficiente requiere acondicionamiento del receptor con tratamientos citorreductores tóxicos con el fin de prevenir el rechazo inmunológico del injerto. Sin embargo, incluso en ausencia de barreras inmunitarias, los niveles de aceptación del injerto del donante después del trasplante de HSC parecen estar restringidos en receptores no acondicionados. En concordancia con los datos clínicos sobre el trasplante de BM de pacientes con SCID que no habían sido acondicionados con fármacos citorreductores, se encontró que el trasplante de HSC en ratones SCID no acondicionados condujo a una restauración de los linfocitos B y T funcionales, aunque el quimerismo de las HSC del donante permaneció < 1%. Estos niveles bajos de quimerismo también se pudieron lograr cuando se trasplantaron HSC CD45.1 en ratones CD45.1 x CD45.2 de tipo silvestre no acondicionados, que son genéticamente incapaces de rechazar el injerto, pero no en receptores de CD45.2, los cuales presumiblemente pueden rechazar el injerto basándose en las diferencias antigénicas de la proteína CD45.

Hemos planteado la hipótesis de que la aceptación del injerto de HSC del donante podría estar limitada por la ocupación de los nichos de HSC adecuados y que la eliminación específica de las HSC del hospedador de estos nichos podría aumentar la aceptación del injerto de HSC del donante. En los estudios que se describen a continuación, se proporciona la prueba de que el empobrecimiento mediado por anticuerpos específicos de las HSC del hospedador conduce a una drástica mejora en la eficacia del injerto de HSC del donante. Estos datos confirman que la disponibilidad de nichos regula la eficiencia del trasplante de HSC. Además, estos estudios proporcionan un marco para el uso de anticuerpos altamente específicos para eliminar de forma segura y reemplazar las HSC genéticamente anormales para el tratamiento de trastornos hematológicos.

Hemos demostrado previamente que las HSC normales en la médula están en recirculación continua de la médula a la sangre y de nuevo a la médula. Las células de la sangre entran en la médula ósea, el bazo y el hígado y pueden establecer una auto-renovación y una hematopoyesis a largo plazo. Hemos demostrado previamente que en cualquier instante, aproximadamente 0,1-4,5 % de las HSC están en este proceso, lo que nos lleva a proponer que hay un número equivalente de nichos vacíos de HSC en cualquier instante. De acuerdo con esta hipótesis, observamos poca diferencia en el quimerismo de granulocitos o de HSC cuando dosis de células que van desde 500 a 4.000 HSC purificadas se trasplantaron en un único bolo en ratones no acondicionados deficientes en el gen de activación de la recombinasa 2 (RAG2<sup>-/-</sup>) o con deficiencia en la cadena gamma común de la interleucina 2 RAG2<sup>-/-</sup> (RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>), que se comportan de manera similar entre sí con respecto al trasplante de HSC.

Para abordar más rigurosamente si los nichos apropiados en receptores no acondicionados pueden ser saturados por HSC trasplantados de una manera dependiente de la dosis, trasplantamos ratones Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> no acondicionados con números variables de HSC c-kit<sup>+</sup>linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> (KLS) CD34<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup> de ratones transgénicos GFP. El quimerismo de granulocitos de sangre periférica se midió a las 16 semanas después del trasplante, lo que previamente se ha demostrado que refleja con exactitud el quimerismo de las HSC del donante en este sistema no acondicionado. El quimerismo de los granulocitos de los donantes aumentó significativamente en dosis entre 10 y 250 de HSC trasplantadas, pero el trasplante de más de 250 células condujo a aumentos más modestos en el quimerismo (Fig. 1).

Por lo tanto, el aumento de la dosis de HSC trasplantadas no dio lugar a un aumento lineal en el quimerismo del donante, como cabría esperar en un modelo donde las HSC endógenas pueden reemplazarse fácilmente por HSC trasplantadas. En cambio, los datos confirman que el nicho de HSC es una entidad muy específica y sugieren que el número de nichos disponibles para el injerto en cualquier punto dado en condiciones homeostáticas es similar al número de HSC estimado en su fase circulatoria. En este modelo, las dosis aumentadas de HSC trasplantadas conducen a niveles de quimerismo ligeramente aumentados, lo que aumenta la probabilidad de que una HSC endógena salga a la circulación y desocupe un nicho en una proximidad espacial cercana a la HSC de un donante aún no injertado. Sin embargo, el proceso es claramente ineficiente y no lineal, ya que el trasplante de 1.000 HSC, equivalente a aproximadamente el 5 % del número total de HSC en un ratón, condujo solo al 0,6 % de quimerismo (Fig. 1).

Para determinar si pueden ocupar estos nichos solo las HSC o bien otros tipos celulares, trasplantamos competitivamente ratones Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> (CD45.2) no acondicionados con 1.000 HSC CD45.1 junto con 100.000 células progenitoras GFP KLS CD34<sup>+</sup>, que son la progenie descendente inmediata de las HSC. La inclusión de 100.000

células progenitoras KLS CD34<sup>+</sup> en el trasplante no afectó a la aceptación del injerto del HSC, ya que no hubo diferencias significativas en el quimerismo del donante en relación a los receptores que recibieron 1.000 HSC solo (Fig. 1). A pesar de la inclusión de un exceso de 100 veces de células progenitoras, el quimerismo del donante resultante de las 1.000 HSC fue significativamente mayor que la dosis de células HSC 10 (Fig. 1). Estos datos implican que las células progenitoras KLS CD34<sup>+</sup> no compiten efectivamente con las HSC para los mismos nichos y que la presencia o ausencia de estas células progenitoras no auto-renovables no afecta el injerto de HSC.

La contribución mieloide y linfoide derivada del donante GFP<sup>+</sup> de las células KLS CD34<sup>+</sup> trasplantadas se mantuvo hasta al menos 8 semanas después del trasplante en niveles similares a los que hemos observado anteriormente, lo que sugiere que las HSC y su progenie inmediata utilizan nichos distintos para mantener la función. Los estudios en ratones no acondicionados han demostrado que los trasplantes de BM no fraccionados de donantes conducen a niveles de quimerismo que son linealmente proporcionales a la dosis de células trasplantadas, lo que sugiere que el "espacio" no es un factor limitante en los trasplantes de BM. Sin embargo, estos estudios no determinaron si todos los tipos de células o solo ciertos subconjuntos de células que están presentes dentro del compartimento heterogéneo de la BM son fácilmente desplazados.

Debido a que las HSC representan <0,01 % de todas las células nucleadas de la médula ósea, quisimos determinar si el quimerismo total del donante medido en estos estudios refleja con exactitud el quimerismo de las HSC. Para examinar este punto, se trasplantaron 6,5 x 10<sup>7</sup> células de médula ósea no fraccionadas de ratones CD45.2 hembra en receptores F1 CD45.1 x CD45.2 para excluir la posibilidad de rechazo del injerto. Esta dosis celular trasplantada representa 12-15 % de la celularidad total de la médula ósea receptora, según una estimación, o 20-28 % según otra. Dieciséis semanas después del trasplante, medimos el quimerismo total de sangre periférica y el quimerismo de las HSC de médula ósea directamente. El quimerismo total en la sangre periférica fue del 11 % (Fig. 5), similar a las predicciones realizadas en estudios anteriores. Sin embargo, el quimerismo medio de las HSC fue solo 4,5 %, aproximadamente 2,5 veces menor que el quimerismo total (Fig. 5). Estos datos demuestran que la medición del quimerismo total conduce a una sobrestimación del quimerismo de las HSC de la BM. Por lo tanto, los datos confirman que incluso en este sistema, la sustitución de HSC es ineficiente en receptores no acondicionados.

Teniendo en cuenta estos datos, razonamos que la eliminación específica de las HSC del hospedador que ocupan estos nichos altamente específicos en animales no acondicionados permitiría altos niveles de aceptación del injerto de HSC del donante. *In vivo*, se ha demostrado que en muchos contextos, la administración de anticuerpos específicos de antígenos particulares, tales como CD20, media el empobrecimiento celular específico mediante opsonización, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), reclutamiento de complemento o la interrupción de vías de señalización esenciales. Hemos planteado la hipótesis de que los anticuerpos también pueden ser utilizados para dirigir y empobrecer las HSC, creando así más nichos disponibles de HSC para el injerto de HSC del donante. Para probar esta hipótesis, comparamos una serie de diferentes anticuerpos monoclonales y ACK2 seleccionados, un anticuerpo conocido por reconocer c-kit, el receptor para el factor de células madre (SCF), y antagonizar la función *in vivo*.

Además, planteamos la hipótesis de que si los anticuerpos ACK2 eran capaces de empobrecer las HSC endógenas, los anticuerpos residuales en el suero de ratones también inhibirían y/o empobrecerían las HSC del donante trasplantado. Para determinar la cinética del aclaramiento de anticuerpos *in vivo*, se administraron 500 µg de ACK2 por vía intravenosa a ratones inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> y se ensayó el suero cada dos días para determinar la presencia de anticuerpo mediante tinción de mastocitos c-kit<sup>+</sup>. El anticuerpo residual se detectó en el suero hasta cinco días después de la inyección; sin embargo, todos los anticuerpos ACK2 detectables se habían eliminado del suero siete días después de la inyección (Fig. 2A). En ciertas otras preparaciones de ACK2, el anticuerpo persistió en el suero de ratones hasta ocho días después de la inyección.

Para determinar si la administración de ACK2 podría empobrecer las HSC *in vivo*, hemos cuantificado los números de HSC y las frecuencias en la médula ósea de ratones tratados en el momento de la eliminación de ACK2. En este punto temporal, se observó una disminución de ~ 99 % en el número de HSC fenotípicamente identificables (KLS CD135<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) (Fig. 2B). También se cuantificó el número de HSC de médula ósea utilizando la expresión de Sca-1 y CD150, junto con la falta de expresión de CD34, CD135, CD244, CD48 y CD41 y otros antígenos asociados con el compromiso de linaje y observamos una disminución similar en el número de HSC y de la frecuencia. Este tratamiento no condujo a una movilización evidente de HSC, ya que no se detectó un aumento en las HSC fenotípicas en los bazo o sangre de ratones tratados con ACK2.

Con el fin de controlar la posibilidad de que el tratamiento con ACK2 cambiase el fenotipo de la superficie celular de las células HSC del hospedador y para verificar que ACK2 empobrecía las HSC funcionales del hospedador, la médula ósea no fraccionada de animales acondicionados con ACK2 o control tratados con IgG de rata, se trasplantaron en receptores irradiados junto con la médula ósea competidora. Los ratones Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> fueron acondicionados con 500 µg de ACK2 y en el momento de la eliminación del anticuerpo, 200.000 células de médula ósea de animales acondicionados con ACK2 se trasplantaron junto con 200.000 células de médula ósea competidora marcadas congénicamente procedentes de ratones de tipo silvestre no tratados a receptores irradiados letalmente. El trasplante de BM a partir de animales tratados con ACK2 condujo a unos valores de aceptación del

injerto marcadamente reducidos con respecto a los obtenidos con el trasplante de BM de control (Fig. 2C). Estos datos demuestran que ACK2 empobrece las HSC funcionales de la BM.

5 Para determinar los posibles efectos de la movilización directa del tratamiento con ACK2, se trasplantó toda la población de esplenocitos de animales acondicionados con ACK2 o control junto con 200.000 células de médula ósea competidora marcadas congénicamente procedentes de ratones de tipo silvestre no tratados a receptores irradiados letalmente. El quimerismo del donante resultante del trasplante de esplenocitos de animales acondicionados con ACK2 se redujo significativamente en relación con el quimerismo resultante del trasplante de esplenocitos de control (Fig. 2D). Estos datos indican que el tratamiento con ACK2 empobrece las HSC del bazo así como de la BM y no induce directamente a la movilización temprana de las HSC.

15 Con el fin de determinar el mecanismo mediante el cual ACK2 empobrece las HSC, se compararon los efectos del tratamiento con ACK2 con el de 2B8, otro anticuerpo monoclonal anti-c-kit del mismo isotipo que IgG2b, que tiñe células que expresan c-kit con intensidad equivalente a la de ACK2. Sin embargo, el tratamiento con 2B8 no disminuyó los números de HSC funcionales *in vivo* y el trasplante de células de médula ósea de ratones tratados con 2B8 dio lugar a un injerto normal (Fig. 2C). Planteamos la hipótesis de que ACK2 puede empobrecer las HSC antagonizando la función de c-kit mediada por SCF, como se ha demostrado anteriormente en los melanocitos. Para probar esta hipótesis, cultivamos HSC purificadas en presencia de ACK2 y observamos que inhibía la proliferación dependiente de SCF (Fig. 2E), pero no la proliferación mediada por trombopoyetina (TPO) (Fig. 2E). A diferencia de ACK2, los efectos de 2B8 (un anticuerpo anti-c-kit diferente) sobre la proliferación mediada por SCF fueron modestos (Fig. 2E). Por lo tanto, es probable que ACK2 provoque el empobrecimiento de HSC a través de la inhibición de la señalización de SCF, mientras que 2B8 se une a una región de la molécula c-kit que no es esencial para la señalización. La importancia de la señalización de c-kit mediada por SCF para las HSC se ha demostrado en ratones W/W, que carecen de la expresión de c-kit funcional y mueren *in utero* salvo que se trasplanten con HSC normales.

30 Adicionalmente, se ensayó el efecto de ACK2 sobre varias células progenitoras hematopoyéticas *in vivo* a los dos y nueve días después de la administración de ACK2. Dos días después de la administración de ACK2, todos los progenitores mieloides en la médula ósea, que expresan niveles similares de c-kit como las HSC, comenzaron a disminuir, sin embargo las HSC se vieron más afectadas (Fig. 2F). Por lo tanto, estos datos son de nuevo incompatibles con una actividad de empobrecimiento directa mediada por Fc de células c-kit<sup>+</sup> por ACK2 y más bien apoyan un mecanismo por el cual las células progenitoras se pierden gradualmente debido a la falta de reposición por HSC y otros progenitores tempranos dentro del compartimento de KLS, o por el bloqueo de sus receptores de c-kit.

35 En consonancia con este mecanismo, nueve días después de la administración de ACK2, las HSC (Fig. 2F), los progenitores mieloides (Fig. 2F) y los progenitores linfoides comunes estaban muy disminuidos. Tras el examen histológico, encontramos una disminución gradual similar de la celularidad de la médula ósea (Fig. 6). Además, se observó un aumento progresivo en el tamaño de los osteoblastos (Fig. 6, columna derecha). Estos datos indican que ACK2 provoca un empobrecimiento significativo pero transitorio de las HSC del hospedador y da como resultado una ventana corta en la cual los animales tratados con ACK2 son receptivos al trasplante de HSC de un donante.

45 Es importante destacar que todos los ratones sobrevivieron al tratamiento sin signos evidentes de estrés aparte de una pérdida temporal del color de la piel, como se ha descrito anteriormente. La falta de mortalidad en ratones tratados con ACK2 es probablemente debida al mecanismo de empobrecimiento de ACK2, dado que las células sanguíneas efectoras maduras no se ven afectadas directamente por el tratamiento y solo se pierden gradualmente debido al desgaste. Esto es apoyado por la observación de que una serie de parámetros hematológicos en la sangre periférica solo se ven ligeramente afectados por el tratamiento con ACK2 (Tabla 1).

**Tabla complementaria S1. Efectos hematológicos del tratamiento con ACK2.**

	Control	ACK2
Eritrocitos ( $\times 10^6$ células/ $\mu$ l)	9,92	8,21
Hemoglobina (gramos/dl)	14,5	11,8
55 Hematocrito (%)	45,9	36,9
Volumen corpuscular medio (fl)	46,3	45,0
Hemoglobina corpuscular media (pg)	14,6	14,4
60 Hematocrito corpuscular medio (g/dl)	31,6	32,0

Además, se observó un número significativo de eritrocitos maduros y colonias eritroides regeneradoras en la médula ósea 9 días después del tratamiento con ACK2 (Figura 6, panel inferior izquierdo). Además, tanto los ratones machos como las hembras tratados con ACK2 permanecieron fértiles y tuvieron descendencia viable. Por lo tanto, los efectos secundarios del empobrecimiento mediado por anticuerpos de las HSC están en marcado contraste con la irradiación letal, que requiere el trasplante temprano de la médula ósea o progenitores hematopoyéticos para

prevenir la muerte del animal, un procedimiento que en los seres humanos se acompaña de altos niveles de morbilidad y mortalidad significativa.

Se observó un empobrecimiento casi completo de las HSC ya a los dos días después de la administración de ACK2. Sin embargo, algunas HSC claramente permanecen y conservan la capacidad de auto-renovación, ya que dos semanas después de la eliminación del suero del anticuerpo, los perfiles de superficie celular de HSC (Fig. 7) y los números (Fig. 2B) habían vuelto a niveles casi normales. Aunque el tratamiento con ACK2 no causa directamente la movilización de HSC del hospedador (Fig. 2D), se produce una hematopoyesis extramedular esplénica significativa durante la fase de recuperación una semana después del aclaramiento de ACK2 (Fig. 7). A las dos semanas después de la eliminación de ACK2 del suero, los bazo de los animales parecían idénticos a los de los animales de control no tratados. Los ratones de tipo silvestre, así como los ratones  $\mu$ MT deficientes en linfocitos B también mostraron niveles disminuidos de HSC en su médula ósea después del tratamiento con ACK2 (Fig. 8). Curiosamente, la recuperación de los números de HSC parecía ser más rápida en animales con un número suficiente de linfocitos B o con un número suficiente de linfocitos T después de la eliminación de ACK2, lo que sugiere un papel potencial inesperado para los linfocitos en la estimulación de la recuperación hematopoyética.

Para probar si la extracción de HSC del hospedador podría mejorar la eficacia del injerto de HSC del donante, acondicionamos ratones  $RAG2^{-/-}$  (CD45.1), que se comportan de forma idéntica a  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  con respecto al tratamiento con anticuerpos, con 500  $\mu$ g de ACK2. Estos ratones se trasplantaron después con 5.000 LT-HSC de CD45.2 de tipo silvestre siete días después de la administración del anticuerpo, un punto temporal en el que no había ACK2 detectable en el suero. Se obtuvo sangre periférica de los receptores cada cuatro semanas después del trasplante y se cuantificó quimerismo de granulocitos. El quimerismo medio de los granulocitos de los donantes a las 37 semanas después del trasplante fue del 16,1 %, lo que refleja un aumento de > 10 veces en comparación con los animales de control no tratados que fueron trasplantados con el mismo número de HSC (Fig. 3A). Las HSC injertadas también dieron lugar a linfocitos B y linfocitos T periféricos derivados del donante (Fig. 3B). También analizamos el quimerismo de HSC de la médula ósea del donante directamente en este punto temporal tardío para confirmar el aumento de aceptación del injerto del donante, y de hecho encontró que se correlacionaba bien con el quimerismo de granulocitos de la sangre periférica del donante (Fig. 3C).

Finalmente, para verificar que estábamos identificando con precisión las HSC funcionales del donante con fenotipos normales de superficie celular, se volvieron a aislar HSC  $KLS$   $CD34^{-}$   $CD150^{+}$  de donantes de la médula ósea de receptores primarios y realizaron trasplantes secundarios en ratones receptores irradiados junto con 200.000 células de médula ósea competidora de tipo silvestre. Estas HSC dieron lugar a un injerto multi-linaje durante al menos 16 semanas después del trasplante (Fig. 3D), confirmando que las HSC trasplantadas recuperaban su fenotipo de superficie celular normal al menos 7-9 meses después del trasplante en animales tratados con ACK2. En consonancia con esta observación, se encontró que los perfiles del ciclo celular de HSC tanto del hospedador como del donante en la BM de ratones tratados con ACK2 y trasplantadas 7 meses antes eran idénticos a los de los animales no tratados (Fig. 9).

Estos datos indican que a través de la extracción específica de HSC del hospedador, hemos sido capaces de aumentar significativamente la aceptación del injerto de HSC del donante. Sin embargo, no estaba claro si el tratamiento con ACK2 aumentaba el espacio de nicho, conduciendo a un alto nivel de aceptación del injerto inicial de las HSC después del trasplante, o si debido al empobrecimiento de las HSC del hospedador, se podían expandir competitivamente un número pequeño de HSC inicialmente injertadas en ratones tratados con ACK2. Si el espacio del nicho hubiera sido realmente liberado, se esperaría que el quimerismo de HSC aumentara con la dosis de células trasplantadas. Por el contrario, si el injerto de HSC inicial era el mismo entre ratones tratados con ACK2 y no acondicionados, no se esperaría un aumento lineal en el quimerismo del donante con números de HSC trasplantadas por encima de 250 células, ya que dosis superiores a estas no conducen a incrementos linealmente proporcionales del quimerismo en animales no acondicionados (Fig. 1). Con el fin de determinar los efectos de la dosis de células en este sistema, se acondicionaron ratones  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  (CD45.2) receptores con 500  $\mu$ g de ACK2 como antes y se trasplantaron con dosis variables de LT-HSC CD45.1 doble clasificado. La sangre periférica se ensayó cada cuatro semanas para determinar el quimerismo de los granulocitos del donante hasta 24 semanas después del trasplante. La aceptación del injerto del donante aumentó linealmente con la dosis de HSC trasplantadas (Fig. 4A) y, por tanto, se demostró que la dosis de HSC trasplantadas necesaria para saturar los nichos disponibles se había incrementado significativamente con respecto a los ratones no acondicionados (Fig. 1). Estos datos demuestran que el tratamiento con ACK2 aumenta la proporción de nichos disponibles para el injerto y que la disponibilidad de nichos está regulada por la ocupación de las HSC del hospedador y que superar esta barrera puede proporcionar altos niveles de aceptación del injerto de HSC del donante.

Los estudios previos que intentaron aumentar el número de nichos disponibles para el trasplante mediante la movilización de HSC endógenas pueden haber fracasado debido a la presencia residual de fármacos movilizadores en el momento del trasplante o debido a los efectos perjudiciales de estos agentes en las propias células del nicho de HSC. En el primer experimento mostrado en la presente memoria, ambos ratones que recibieron 35.000 HSC ( $1,4 \times 10^6$  HSC/kg) presentaron niveles extremadamente altos de quimerismo del donante (90,1 % y 62,7 % Figura 4B). Es importante señalar que la obtención de un alto número de HSC ya ha demostrado ser clínicamente factible,

porque la mayoría de los injertos humanos de HSC se aíslan de la sangre periférica de los donantes movilizados utilizando regímenes que conducen a una expansión de HSC. Sin embargo, el trasplante de un bolo de células tan grande puede ser evitable ya que se obtuvieron consistentemente altos niveles de quimerismo del donante mediante tres rondas de acondicionamiento y trasplante de 5.000 HSC (para un total de 15.000 HSC trasplantadas) (Fig. 10).  
 5 La contribución total del tercer trasplante fue sistemáticamente superior a los dos primeros trasplantes combinados de HSC.

El trasplante de médula ósea (BMT) alogénico se utiliza rutinariamente para una serie de propósitos clínicos, más comúnmente para el tratamiento de las neoplasias malignas después de dosis altas de irradiación y quimioterapia, pero también para el tratamiento de deficiencias hematopoyéticas heredadas tales como la SCID. Los niveles terapéuticos mínimos de quimerismo de las HSC del donante varían entre las enfermedades, oscilando desde <1 % para ciertas formas de SCID hasta ~ 20 % para la anemia de células falciformes. Sin embargo, el nivel terapéutico mínimo de quimerismo puede no ser clínicamente óptimo. Por ejemplo, los niveles de quimerismo del HSC de <1 % en los pacientes con SCID deficientes en  $\gamma\text{c}$  pueden restaurar los linfocitos T funcionales, pero los linfocitos B siguen siendo en gran parte de origen del hospedador. Además, la nueva producción de linfocitos T se correlaciona con el quimerismo mieloide y presumiblemente el quimerismo de HSC, lo que sugiere que los bajos niveles de aceptación del injerto de HSC inicial conducen solo a períodos finitos de producción de linfocitos T en pacientes con SCID.

Aquí, proporcionamos pruebas de que la aceptación del injerto de HSC del donante está limitada por la ocupación de los nichos apropiados por las HSC del hospedador. Estos datos ofrecen una explicación clara de la deficiente aceptación del injerto de HSC del donante observado en pacientes con SCID no acondicionados (Tjonnfjord et al. (1994) Blood 84, 3584; Muller et al. (2000) Blood 96, 4344).

El reto en el BTM, particularmente para el tratamiento de tumores no malignos, es maximizar la eficacia del injerto de HSC del donante, minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios dañinos. Uno de los principales efectos secundarios asociados con el BMT alogénico es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), una afección potencialmente mortal en la que la presencia de linfocitos T alorreactivos dentro del injerto conduce a la destrucción de los tejidos del hospedador. Es importante destacar que los estudios han demostrado que el trasplante de HSC alogénico purificado no provoca la GVHD. Otros efectos secundarios graves del BMT se asocian a menudo con regímenes de acondicionamiento citotóxico. Incluso si se emplea con moderación mediante acondicionamiento no mieloablativo, los regímenes de acondicionamiento citotóxico conllevan riesgos significativos para la salud, incluyendo infertilidad, trombocitopenia prolongada, daño a órganos, inmunosupresión y altas tasas de neoplasias secundarias. De hecho, son estos mismos efectos secundarios los que impiden el uso clínico rutinario de BMT para el tratamiento de enfermedades graves pero que no amenazan la vida de forma inmediata, como la anemia de células falciformes y ciertos tipos de autoinmunidad, que han demostrado ser curados por trasplante de HSC en modelos en animales y en un número limitado de casos clínicos.

Se postuló que la forma más específica y, en consecuencia, la más segura para aumentar el espacio de nicho de las HSC sería a través de la reducción dirigida mediada por anticuerpos. Para generar datos preclínicos que apoyen el uso de anticuerpos que empobrecen las HSC, se ha demostrado anteriormente que la administración de ACK2 *in vivo* conduce al empobrecimiento rápido pero transitorio de HSC y progenitores del hospedador. El trasplante de HSC altamente purificadas en receptores acondicionados con ACK2 conduce a niveles de quimerismo del donante de hasta el 90 %. Estos niveles serían casi seguramente terapéuticos para las deficiencias hematopoyéticas heredadas. Para los pacientes con SCID, el empobrecimiento específico de HSC puede ser el único requisito de un régimen de acondicionamiento eficaz para permitir una reconstitución inmunitaria permanente y completamente funcional por las HSC del donante. Para otros tipos de trastornos hematopoyéticos heredados, los tratamientos con anticuerpos que empobrecen las HSC en combinación con agentes inmunosupresores específicos podrían emplearse potencialmente en lugar de, o en combinación con, dosis bajas de fármacos diseñados para la mielosupresión. Por lo tanto, el uso de reactivos que empobrecen las HSC es una alternativa atractiva a los métodos convencionales de acondicionamiento para el BMT y que reduce los riesgos actualmente asociados con el trasplante de médula ósea considerablemente, aumentando así su utilidad en el tratamiento de varios trastornos hematológicos y no hematológicos.

#### Materiales y métodos

**Ratones.** Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Internacional de Cuidado y Uso de Animales. Los ratones receptores utilizados en estos estudios fueron ratones de 4 a 8 semanas de edad, deficientes en el gen de activación de la recombinasa 2 (RAG2<sup>-/-</sup>), con deficiencia en la cadena gamma común de la interleucina 2 RAG2<sup>-/-</sup> (RAG2<sup>-/-</sup> $\gamma\text{c}^{-/-}$ ) o  $\mu\text{MT}$ . Los ratones donantes utilizados fueron ratones transgénicos GFP de 8-12 semanas de edad que expresan GFP del promotor de la  $\beta$ -actina de pollo, o ratones C57Bl/Ka CD45.1 o CD45.2 congénicamente distinguibles. Todas las líneas de ratón se criaron y se mantuvieron en las instalaciones de animales de investigación de la Universidad de Stanford.

**Trasplante de HSC.** La médula ósea se cosechó a partir de ratones donantes mediante trituración de los huesos, lisis de eritrocitos con tampón de lisis ACK (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHCO<sub>3</sub> 1 mM y EDTA 0,1 mM) y la eliminación de los desechos mediante gradiente de densidad usando Histopaque 1119 (Sigma, St. Louis, MO). La médula ósea a

continuación se enriqueció en c-kit<sup>+</sup> usando microesferas CD117 + (AutoMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células se tiñeron con anticuerpos descritos a continuación y se aislaron HSC mediante FACS simple o doble basándose en la reactividad definida previamente para marcadores de superficie celular particulares (c-kit<sup>+</sup>linaje<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>) en el BD FACS-Aria (BD Biosciences, San José, CA). Las células fueron trasplantadas por inyección retro-orbital.

*Anticuerpos.* Los siguientes anticuerpos monoclonales fueron purificados y conjugados usando hibridomas mantenidos en nuestro laboratorio: 2C11 (anti-CD3), GK1.5 (anti-CD4), 53-6.7 (anti-CD8), 6B2 (anti-B220), 8C5 (anti-Gr-1), M1/70 (anti-Mac-1), TER119 (anti-Ter119), A20.1.7 (anti-CD45.1), AL1-4A2 (anti-CD45.2), 2B8 (anti-c-kit), 3C11 (anti-c-kit), E13-161-7 (anti-Sca-1). Los anticuerpos se conjugaron con biotina, Pacific Blue, Pacific Orange, PE, alofococianina (APC), Alexa 488, Alexa 647 o Alexa 680 (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los siguientes fueron adquiridos a eBiosciences (San Diego, CA): anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, B220, Mac-1, Ter119 y Gr-1 conjugado con PE-Cy5; anti-c-kit y anti-Mac-1 conjugado con PECy7; anti-CD135 (A2F10) conjugado con PE; anti-CD34 conjugado con FITC o biotina y anti-B220 conjugado con APC-Cy7. Anti-CD41 conjugado con FITC, anti-CD48 conjugado con FITC, anti-IgG de rata de cabra conjugado con APC y anti-TCR $\beta$  (H57-597) conjugado con APC se adquirieron a BD Biosciences. Anti-CD150 conjugado con Alexa 647 fue adquirido a Biolegend (San Diego, CA). Estreptavidina conjugada con Alexa 488 y Alexa 680 y anti-IgG de rata de cabra conjugado con Alexa 488 fue adquirido a Invitrogen. La estreptavidina conjugada con Quantum Dot 605 se adquirió a Invitrogen.

*Producción y purificación de ACK2.* El hibridoma ACK2 fue un regalo. La línea celular se expandió y subclonó para establecer una línea celular de hibridoma de alta producción de ACK2. Las células se hicieron crecer en el sistema de matraz Integra (Integra Biosciences, Chur, Suiza) y se recogieron los medios que contenían el anticuerpo. Se purificó ACK2 en una columna de purificación de IgG uniendo ACK2 a la columna y eluyendo con Glicina 100 mM y Na<sub>3</sub> 5 mM. Las fracciones positivas eluidas (OD<sub>280</sub> > 0,2) se combinaron, se dializaron durante 12 horas en PBS y se concentraron utilizando un concentrador Vivaspin (Sartorius AG, Goettingen, Alemania). Las preparaciones subsiguientes de ACK2 fueron preparadas por Bio Express (W. Lebanon, New Hampshire).

*Administración de ACK2 y eliminación.* Se administraron 500  $\mu$ g de ACK2 mediante inyección retro-orbital a ratones Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> de 4-8 semanas. Se aisló sangre periférica de la vena de la cola de estos ratones cada dos días y se dejó coagular durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron durante varios minutos y se aisló el suero. Posteriormente se tiñeron 10.000 mastocitos con 50  $\mu$ l de suero, seguido de IgG de rata anti-cabra APC o Alexa 488, para probar la presencia de anticuerpos ACK2. Además, los mastocitos se tiñeron con un anticuerpo anti-c-kit conocido, 2B8 conjugado con APC como control. Estas células se analizaron en el BD FACS-Aria. Para determinar el empobrecimiento de las HSC, se obtuvieron tanto los fémures como la tibia de ratones acondicionados y se prepararon igual que antes. Se contaron las células y se determinó la frecuencia de HSC en el FACS-Aria de BD acotando las células KLS CD135<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>.

*Acondicionamiento con ACK2 y trasplante.* Se administraron 500  $\mu$ g de ACK2 por vía intravenosa a ratones Rag2<sup>-/-</sup> o Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> de 4-8 semanas. Los ratones se trasplantaron en el momento en el que se demostró que ACK2 ya no estaba presente en el suero (D7 o D9 dependiendo de la preparación). Las HSC para el trasplante se obtuvieron a partir de médula ósea de ratones donantes, que se aislaron en el BD FACS-Aria acotando las células c-kit<sup>+</sup>linaje<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>.

*Análisis de la aceptación del injerto.* Se obtuvo sangre a partir de la vena de la cola de ratones trasplantados en diversos puntos temporales. Se separó usando dextrano al 2 % a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente se lisó usando tampón de lisis ACK (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHCO<sub>3</sub> 1 mM y EDTA 0,1 mM) durante 5 minutos. Las células se tiñeron con anticuerpos descritos anteriormente y se analizaron en el BD FACS-Aria. El quimerismo de los granulocitos del donante se determinó analizando el porcentaje de células Ter119<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>Mac1<sup>alto</sup> dispersión lateral<sup>alto</sup> que también eran donante<sup>+</sup>. Se sacrificaron varios animales y se aislaron HSC de forma similar a la de los ratones donantes para confirmar que el quimerismo de HSC imitaba el quimerismo de los granulocitos. Para determinar los efectos de ACK2 en progenitores hematopoyéticos, se aisló médula ósea de ratones tratados con 500  $\mu$ g de ACK2 como antes. Se contaron las células y se determinó la frecuencia de los progenitores en el BD FACS-Aria. Los números de células se compararon con los de animales no tratados. Las HSC fueron acotadas como lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD135<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>, las MEP fueron acotadas como lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>FcyR<sup>-</sup>, las CMP fueron acotadas como lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD34<sup>bajo</sup>FcyR<sup>bajo</sup> y las GMP fueron acotadas como lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>alto</sup>FcyR<sup>alto</sup>.

*Trasplante en receptores irradiados.* Los ratones receptores fueron tratados con 950 cGy antes del trasplante. Cada ratón se trasplantó con toda la población de esplenocitos de un ratón ACK2 tratado 9 días antes, 200.000 células de médula ósea no fraccionada de un ratón ACK2 tratado 9 días antes, o 100 HSC donante<sup>+</sup> KLS CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup> de un ratón trasplantado primario (ACK2 acondicionado y trasplantado con 5.000 donantes de HSC 39 semanas antes).

*Cultivo in vitro.* Se clonaron exactamente 10 HSC (KLS CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>) en el BD-Aria en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se cultivaron en presencia de 50 ng/ml de SCF (R&D Systems) o 50 ng/ml de TPO (R&D Systems) en medio de Dulbecco modificado por Iscove (Invitrogen) con suero fetal de ternera al 10 % (Omega), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen), 100  $\mu$ M de aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las HSC

tratadas con anticuerpo recibieron 10 µg/ml de ACK2 o 2B8. Las células viables se contaron al microscopio todos los días.

5 *Análisis del ciclo celular.* Las células de médula ósea se enriquecieron en c-kit como antes y se tiñeron con anti-CD34 FITC, anti-kit (2B8) PE-Cy7, anti-CD150 Alexa 647, anti-Sca-1 Alexa 680 y anti-linaje PECy5. Las células se fijaron a continuación con paraformaldehído al 2 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS/saponina al 0,2 % + 2 µg/ml de 4',6- diamidino-2-fenilindol (DAPI).

10 *Histología.* Los ratones se trataron con 500 µg de ACK2 y a los 2 días y 9 días después del tratamiento, se extrajo el húmero y se colocó en fijador de Bouin durante > 1 día. Los huesos fueron descalcificados en ácido fórmico, embebidos en parafina, cortados, teñidos con hematoxilina y eosina y montados utilizando medios a base de xileno.

15 *Análisis de la sangre periférica.* Se recogió sangre periférica de la vena de la cola y se depositó directamente en tubos revestidos con heparina. El análisis fue realizado por el Laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Medicina Comparativa de la Universidad de Stanford.

### Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia)

#### Linfoextracción mediada por anticuerpos y trasplante de HSC para el tratamiento de la agammaglobulinemia.

20 Se trató de determinar si el empobrecimiento transitorio de linfocitos T CD4 + de ratones que normalmente rechazan un trasplante alogénico de HSC permitiría una aceptación del injerto de HSC con incompatibilidad en el complejo de histocompatibilidad menor. Se trataron ratones Cµ<sup>-/-</sup>, que son un modelo de agammaglobulinemia y son resistentes a la aceptación mantenida del injerto de HSC del donante en ausencia de irradiación, con anticuerpo anti-CD4 (clon  
25 GK1.5), que empobrece más del 95 % de los linfocitos T CD4+ *in vivo*, antes del trasplante con HSC de ratones transgénicos GFP. Se observó la aceptación del injerto a corto plazo y la reconstitución de linfocitos B en todos los animales tratados con anticuerpos anti-CD4, pero nunca se observó en ninguno de los animales no tratados (Figura 11). Este quimerismo, sin embargo, se perdió entre 8-12 semanas después del trasplante ya que los recuentos de linfocitos T CD4+ volvieron a la normalidad. Por lo tanto, en este sistema, la tolerancia al trasplante permanente no  
30 se generó por ~0,1-0,2 % de quimerismo de HSC.

Anticuerpos que empobrecen específicamente HSC humanas candidatas. Se adquirieron anticuerpos candidatos  
35 específicos de marcadores expresados por HSC humanas, incluyendo c-kit (clon BA7.3C.9, IgG2a), CD133 (clon AC133.1, IgG1) y c-mpl (clon BAH-1, IgG1) en forma de hibridomas de la American Type Culture Collection o como soluciones purificadas de otros proveedores. Aproximadamente 100-500 µg de estos anticuerpos se inyectan en ratones NOD-SCID/yc<sup>-/-</sup> que se han trasplantado 4 a 6 semanas antes con ~10.000 HSC de sangre de cordón humano. El quimerismo mieloide de la sangre periférica se mide a los 2, 4 y 6 días después del tratamiento con anticuerpos. A los 7 días después del tratamiento, se sacrifican los ratones y se cuantifica el número de HSC  
40 humanas fenotípicas en la médula de ratones tratados y no tratados. Los anticuerpos que tienen un efecto de empobrecimiento específico producen una reducción drástica del quimerismo mieloide y en el número de HSC humanas injertadas. Las versiones recombinantes de la región variable pueden combinarse con una región constante Cγ2b de ratón, puesto que los anticuerpos de clase IgG2b son el isotipo más eficaz en el complemento de unión y también son activos en cuanto a la ADCC y la opsonización. El isotipo del Mab ACK2 de ratón es IgG2b. Estos anticuerpos recombinantes se ensayan *in vitro* por tinción y posteriormente incubación de sangre de cordón  
45 humano o médula ósea con complemento de ratón purificado. El empobrecimiento específico de las HSC humanas se verifica mediante citometría de flujo.

Los anticuerpos candidatos capaces de empobrecer las HSC humanas se someten a prueba para empobrecimiento  
50 que crea un espacio de nicho adicional para las HSC humanas recién trasplantados. Aproximadamente 7 días después del tratamiento con anticuerpos de ratones xenoquiméricos, estos ratones y los ratones xenoquiméricos de control que no han sido tratados con el anticuerpo empobrecedor se trasplantan de nuevo con ~10.000 HSC de sangre de cordón distinguibles por HLA. Si se ha creado espacio de nicho adicional mediante la eliminación de las HSC del primer trasplante, el quimerismo que surge del segundo trasplante debería ser considerablemente mayor en los ratones tratados con anticuerpos.

### Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia)

#### El injerto de células madre hematopoyéticas purificadas de nichos raros corrige deficiencias linfoideas graves sin acondicionamiento del hospedador

60 En ausencia de irradiación u otro acondicionamiento citorreductor, se cree que las células madre hematopoyéticas endógenas (HSC) llenan los nichos únicos dentro de la médula ósea que permiten el mantenimiento del potencial hematopoyético completo y de este modo impiden el injerto productivo de HSC trasplantadas de donantes. Mediante el trasplante de HSC exógenas purificadas en líneas de ratones histocompatibles congénicos, no acondicionados, se  
65 demuestra que ~ 0,1-1,0 % de estos nichos de HSC están disponibles para el injerto en cualquier punto dado y no se

han encontrado ninguna prueba que demuestre que las HSC endógenas puedan ser desplazadas de los nichos que ocupan. Demostramos que el injerto productivo de HSC dentro de estos nichos vacíos es inhibido por linfocitos T CD4+ del hospedador que reconocen diferencias en el complejo de histocompatibilidad menor muy sutiles. Sorprendentemente, el trasplante de HSC purificadas en un panel de ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) conduce a un rescate rápido y completo de las deficiencias linfoides mediante el injerto de estos nichos muy raros y la expansión de progenitores linfoides del donante. Demostramos además que la empobrecimiento mediada por anticuerpos transitoria de linfocitos T CD4+ permite el injerto de HSC a corto plazo y la regeneración de linfocitos B en un modelo de ratón no SCID B(-). Estos experimentos proporcionan un mecanismo general mediante el cual las HSC trasplantadas pueden corregir las deficiencias hematopoyéticas sin ningún acondicionamiento del hospedador o con solo una linfoextracción altamente específica y transitoria.

*El seguimiento de la función inmunitaria evita el injerto de HSC con una incompatibilidad sutil.* Se trasplantaron HSC en 4.000 células ckit<sup>+</sup> Thy1.1<sup>bajo</sup> linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> Flk2<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> de ratones CD45.1 por vía intravenosa en cinco ratones CD45.1 x CD45.2 (F1) no irradiados y en cinco ratones CD45.2 congénicos no irradiados. Cada 4 semanas tras el trasplante, se analizó la sangre periférica para determinar el quimerismo de granulocitos, linfocitos B y linfocitos T. El quimerismo de los granulocitos del donante, que refleja con exactitud el quimerismo de las HSC, solo se observó en los receptores F1 genéticamente no reactivos en todos los puntos temporales analizados con una mediana del quimerismo a las 16 semanas de ~ 0,1 %. Estos datos demuestran que las sutiles diferencias antigénicas que existen entre estas cepas congénicas de CD45 de ratones son suficientes para evitar el injerto cruzado de HSC productivas.

*Rápida corrección mediada por las HSC de las deficiencias linfoides en ratones SCID.* Para medir la potencial importancia clínica de estos ricos nichos disponibles, hemos trasplantado repetidamente HSC de ratones transgénicos GFP en ratones deficientes en RAG2 y en la cadena  $\gamma$  común del receptor de IL-2 (RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup>), los cuales carecen de linfocitos B, T y NK. Se observaron cantidades enormes de linfocitos B y T derivadas del donante en todos los puntos temporales, lo que condujo a un quimerismo global del donante de ~50 % hasta al menos 30 semanas después del trasplante final. También se detectaron linfocitos NK del donante en todos los animales trasplantados. Además, todos los ratones RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup> mostraron quimerismo mielóide derivado del donante persistente (que varía de 0,5 a 2,0 % de granulocitos derivados del donante).

Para confirmar que las frecuencias de los granulocitos del donante reflejaban con exactitud el quimerismo de las HSC de la médula ósea, se sacrificaron a los animales a las 30 semanas tras el trasplante y se analizó la médula ósea. Las células del donante comprendían ~0,8 % de las reservas de HSC a largo plazo (LT) totales. Este quimerismo fue esencialmente el mismo en las células madre que se reconstruyen a corto plazo (ckit<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Flk2<sup>-</sup>) y en los progenitores multipotentes (ckit<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Flk2<sup>+</sup>). No se pudo detectar ninguna célula con estos fenotipos de superficie en el bazo, un órgano principal asociado con la hematopoyesis extramedular. Estos datos confirmaron que en estos animales, las frecuencias de granulocitos periféricos del donante reflejan mucho más exactamente el quimerismo de las HSC que la contribución general del donante en la sangre. Los datos también demuestran que un pequeño número de HSC trasplantadas de médula ósea puede corregir graves deficiencias linfoides sin acondicionamiento citorreductor previo. El quimerismo de las HSC en los ratones RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup> era comparable al quimerismo observado en los ratones F1 de tipo silvestre genéticamente no reactivos, lo que demuestra que no hay un número evidentemente mayor de nichos de HSC disponibles en estos animales.

Para confirmar que se habían injertado HSC funcionales, aislamos médula ósea a las 31 semanas después del trasplante de ratones RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup> no irradiados que habían recibido trasplantes de HSC GFP<sup>+</sup> y se realizaron trasplantes secundarios usando médula no fraccionada o enriquecida en c-kit, lo que aumenta la frecuencia de las HSC por ~ 10 veces, en ratones de tipo silvestre irradiados letalmente, tal como ~ 6-20 HSC GFP<sup>+</sup> junto con 1.000 de HSC RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup> se transfirieron a cada receptor secundario. Se observaron células GFP<sup>+</sup> derivadas del donante en todos los receptores secundarios hasta al menos 25 semanas después del trasplante y 6 de 13 receptores secundarios mantuvieron niveles detectables de quimerismo de los granulocitos. Estos datos confirmaron que las HSC GFP<sup>+</sup> raras dentro de la médula ósea de los receptores RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup> se habían injertado productivamente. Por el contrario, el trasplante de un gran número de esplenocitos en receptores secundarios no condujo a una reconstitución sostenida de las células madre multilínea.

*Expansión oportunista de progenitores linfoides del donante.* Para determinar la etapa de desarrollo en la que los linfocitos B del donante superan a los linfocitos B del donante en receptores RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup>, analizamos las frecuencias de los donantes en las células progenitoras mieloides y linfoides en la médula ósea. Los progenitores mieloides comunes (CMP) y los progenitores linfoides comunes (CLP) mostraron un quimerismo del donante que era comparable al quimerismo de las HSC, lo que indica que las células derivadas de donantes no tienen una ventaja proliferativa competitiva en estas primeras etapas del desarrollo. El quimerismo de los donantes en las etapas de desarrollo de los progenitores de macrófagos y granulocitos (GMP) y de los progenitores de eritrocitos y megacariocitos (MEP) también fue similar al quimerismo de las HSC. De acuerdo con estos resultados, las frecuencias de HSC, CLP, CMP, GMP y MPE endógenas dentro de la médula ósea son similares entre ratones no trasplantados de tipo silvestre y RAG2<sup>-</sup> $\gamma$ C<sup>-</sup>. El análisis de las fracciones celulares pro-B-A y pro-B-B, sin embargo,

mostró un quimerismo del donante que era drásticamente mayor que el de los de los CLP precedentes. En la etapa de células pro-B-B y en todas las etapas subsiguientes de los linfocitos B, las células procedían exclusivamente de donantes. Aunque el receptor de IL-7, que utiliza la  $\gamma c$  para la señalización adecuada, se expresa en la etapa de CLP, estos resultados sugieren que la señalización de IL-7 no es una vía necesaria para el desarrollo o expansión de los CLP, de acuerdo con observaciones anteriores.

*Respuestas inmunitarias normales en ratones SCID reconstituidos con HSC.* Para verificar que el sistema inmunitario de los ratones  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  reconstituidos con HSC había sido restaurado y era capaz de crear respuestas inmunitarias apropiadas, se inmunizaron receptores reconstituidos con 4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo (NP) precipitado con aluminio, conjugado con  $\gamma$ -globulina de pollo, que provoca una respuesta humoral dependiente de Th2. Los niveles séricos de anticuerpos específicos de NP fueron similares 1 semana después de la inmunización entre los ratones  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  trasplantados con HSC y los ratones de tipo silvestre, lo que demuestra la inmunocompetencia de los receptores  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  trasplantados.

*Los linfocitos T CD4+ del hospedador son esenciales para el rechazo de HSC con una incompatibilidad sutil.* Para investigar si la ausencia de  $\gamma c$  era crítica para la aceptación del injerto de HSC en huéspedes no acondicionados, tal vez al impartir una desventaja competitiva a las HSC en animales  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ , trasplantamos HSC GFP+ en ratones  $RAG2^{-/-}$ , los cuales tienen una expresión de  $\gamma c$  normal, así como en ratones  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ .

Se observaron niveles similares de contribución de granulocitos del donante en ratones  $RAG2^{-/-}$  y  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ , excluyendo probablemente un papel directo para  $\gamma c$  en el mantenimiento de las HSC del hospedador en sus nichos. Sin embargo, se ha observado la expresión de  $\gamma c$  en HSC normales, lo que sugiere que puede haber una ligera ventaja competitiva para las HSC con expresión adecuada de  $\gamma c$ . Los datos también sugieren que los linfocitos NK, que están presentes en números normales en ratones  $RAG2^{-/-}$  pero ausentes en ratones  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ , no están mediando el rechazo de las HSC en este sistema H2 idéntico. La eliminación de los linfocitos NK del hospedador es necesaria para la aceptación del injerto de HSC que llevan uno o más haplotipos H2 no compartidos. Curiosamente, las frecuencias de los linfocitos derivados de donantes se redujeron significativamente en los receptores  $RAG2^{-/-}$  en los puntos temporales iniciales (Fig. 7B), tal vez como resultado de la ocupación de los entornos estromales específicos de la etapa linfóide por los progenitores linfoides  $RAG2^{-/-}$ . El número de linfocitos B derivados del donante en receptores  $RAG2^{-/-}$  se redujo más de 10 veces con respecto a los receptores  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  a las 4 semanas tras el trasplante y los linfocitos T periféricos no se observaron hasta las 8 semanas después del trasplante. Sin embargo, a las 16 semanas tras el trasplante, el número de linfocitos B y T en los receptores  $RAG2^{-/-}$  alcanzó los niveles observados en sus homólogos  $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ .

Dado que los ratones  $RAG2^{-/-}$  carecen de linfocitos B y T maduros, se intentó determinar cuál de estos tipos de células era el principal responsable de mediar el rechazo de los injertos de HSC de donantes trasplantados. Por lo tanto, se trasplantaron HSC purificadas de ratones donantes GFP en ratones  $TCR^{\alpha/-}\beta^{-/-}$  y  $C\mu^{-/-}$  no irradiados. En estos experimentos, existen diferencias antigénicas conocidas entre las HSC del donante y los ratones receptores en los loci GFP, CD45 y Thy1. Se observó aceptación del injerto multilinaje en ratones deficientes en linfocitos T, pero no en ratones deficientes en linfocitos B. Estos experimentos demuestran que se requieren linfocitos T  $\alpha\beta$  del hospedador para el rechazo de injertos de HSC con esta incompatibilidad en el complejo de histocompatibilidad menor. Para determinar qué clase de linfocitos T es esencial para esta inmunovigilancia, trasplantamos HSC en ratones  $IA^{-/-}$  no acondicionados, los cuales carecen de linfocitos T CD4+ restringidos por el MHC II y ratones microglobulina  $\beta 2^{-/-}$  ( $\beta 2m^{-/-}$ ), que son deficientes en linfocitos T CD8+ restringidos por el MHC I. Los ratones  $IA^{-/-}$  trasplantados con HSC mostraron quimerismo sostenido hasta al menos 16 semanas, mientras que los ratones receptores  $\beta 2m^{-/-}$  no mostraron quimerismo en ningún punto temporal, lo que demuestra que los linfocitos T CD4+ son esenciales para el rechazo de injertos de HSC con incompatibilidad en el complejo de histocompatibilidad menor en nuestro sistema. Las LT-HSC expresan MHC II y la molécula coestimuladora CD86, lo que sugiere que los linfocitos T CD4+ del hospedador pueden reconocer directamente las HSC con ligeras desigualdades antigénicas. Aunque parece que los linfocitos T CD8+ no son necesarios para este rechazo, no podemos excluir la posibilidad de que linfocitos T restringidos por MHC I hiperreactivos residuales pudieran contribuir también al rechazo del injerto de las HSC en ratones  $\beta 2m^{-/-}$ . De acuerdo con el papel de los linfocitos T CD8 en la mediación del rechazo del injerto de médula ósea, Xu et al. han demostrado que la deficiencia de CD8 en el hospedador, mejora la aceptación del injerto.

Curiosamente, el quimerismo de granulocitos en los receptores  $RAG2^{-/-}$  fue indistinguible del observado en experimentos previos en los cuales se trasplantaron 3.000 HSC en lugar de 1.000. Por el contrario, aunque el trasplante de 20 HSC llevó a la detección de la producción de linfocitos B y T en estos ratones inmunodeficientes, el quimerismo de los granulocitos apenas era detectable. Por lo tanto, nuestros experimentos sugieren que la aceptación del injerto de HSC y el quimerismo se acercan asintóticamente a un máximo de ~ 0,5 % en una manera dependiente de la dosis de las células. Los datos muestran que a diferencia de las especulaciones anteriores, las HSC endógenas no pueden desplazarse de los nichos que ocupan al aumentar los números de HSC trasplantadas por encima de un nivel umbral. Sin embargo, en ratones repetidamente trasplantados, hemos observado pequeños aumentos en el quimerismo de los granulocitos respecto al de los ratones que fueron trasplantados con HSC solo una vez con dosis por encima de este umbral. Esto proporciona evidencia de que el trasplante de un exceso de HSC no impide que los nichos adicionales queden vacantes en el futuro.

Para determinar si la eliminación transitoria de linfocitos T CD4+ permitiría el acceso de HSC trasplantadas a nichos adecuados, tratamos ratones  $C\mu^{-/-}$  con un anticuerpo empobrecedor de CD4 que condujo a ~ 95 % de empobrecimiento de linfocitos T CD4+ de la sangre periférica. Los ratones con empobrecimiento de CD4 se trasplantaron a continuación con 800 HSC y se analizó en diversos puntos temporales el quimerismo del donante. Todos los ratones que recibieron tratamiento anti-CD4 mostraron quimerismo de los granulocitos del donante, mientras que ninguno de los ratones no tratados mostraron células detectables del donante a las 8 semanas después del trasplante. Se observaron números significativos de linfocitos B del donante en los ratones tratados a las 6-8 semanas tras el trasplante, lo que nuevamente demuestra la capacidad de un pequeño número de HSC injertadas productivamente para restaurar el número de linfocitos en ratones inmunodeficientes. Dado que se observó que los niveles de linfocitos T CD4+ del hospedador se recuperaban después del inmunoempobrecimiento, estos experimentos demuestran que el empobrecimiento transitorio de estas células antes del trasplante es suficiente para permitir un injerto productivo a corto plazo de las células madre sin necesidad de los fármacos citorreductores tóxicos habituales utilizados para los pacientes sin SCID B(-)antes del trasplante de médula ósea. Sin embargo, a las 12 semanas tras el trasplante de HSC, se perdió el quimerismo de los linfocitos B, los linfocitos T y el quimerismo mielóide en todos los ratones receptores. Estos datos sugieren que el empobrecimiento mediado por  $\alpha$ -CD4 de los linfocitos T maduros era incompleto, o que no se generaron suficientes números de células dendríticas derivadas de donantes para mediar la tolerancia duradera a través de la selección negativa en el timo.

*Reconstitución a corto plazo en receptores de edad avanzada sin acondicionamiento.* Los individuos envejecidos muestran reducciones notables en el tamaño del timo y en la función de los linfocitos T. Para determinar si la función linfóide reducida en ratones envejecidos permitiría la aceptación de trasplantes sin acondicionamiento, se trasplantaron repetidamente HSC de ratones transgénicos GFP en receptores de edad avanzada (22 meses) y jóvenes (2 meses). Se observó quimerismo mielóide a corto plazo a corto plazo en todos los receptores de edad avanzada en comparación con los receptores jóvenes donde no se observó aceptación del injerto. Sin embargo, con el tiempo, las células derivadas del donante disminuyeron hasta niveles indetectables en todos menos en uno de los receptores, lo que sugiere que se produjo rechazo de los trasplantes, pero con una cinética significativamente reducida en relación con los animales más jóvenes. El nivel de quimerismo de los granulocitos en este experimento fue similar a los bajos niveles observados en los trasplantes de ratones jóvenes, genéticamente no reactivos o inmunodeficientes, lo que sugiere que las HSC más antiguas no pueden ser desplazadas de sus nichos endógenos. Esto contrasta con los estudios previos realizados con trasplantes de médula ósea no fraccionada y sugiere que la reducción de la capacidad inmunitaria es responsable de la aceptación del injerto a corto plazo de las HSC de los donantes.

La notable capacidad de las HSC para sostener la hematopoyesis multilineal durante la vida de un individuo constituye la base para su uso rutinario en varias aplicaciones clínicas, incluyendo el tratamiento de inmunodeficiencias primarias, tumores malignos, como acondicionadores para la tolerancia a trasplantes de injertos de tejidos u órganos de donantes y como un método para revertir algunos tipos de autoinmunidad. El éxito de estas terapias se basa en la capacidad de las HSC para albergar nichos únicos que conducen a una hematopoyesis sostenida de multilineaje.

Los estudios presentados aquí han cuantificado el número de estos nichos de HSC que están disponibles para el injerto en cualquier punto dado en animales no acondicionados como ~ 0,1-1,0 % de todos los nichos de HSC. Suponiendo una celularidad de médula ósea de murino adulto total de  $5 \times 10^8$  y una frecuencia de HSC endógenas de 0,01 %, el número de nichos de HSC abiertos puede estimarse en 50-500. Esto es sorprendentemente similar al número estimado de HSC que están en la circulación en cualquier punto dado. Los datos sugieren que las HSC que circulan normalmente han salido y han dejado vacante su nicho previo de HSC. Por lo tanto, puede estar ocurriendo un intercambio constante entre HSC endógenas en circunstancias normales, tal vez para mantener el equilibrio hematopoyético entre y dentro de cada compartimiento de la médula ósea.

Como apoyo de esto, hemos encontrado poca diferencia en las tasas de quimerismo de los granulocitos entre experimentos cuando se realiza un único trasplante de HSC en dosis que van de 800 a 4.000 células. Aunque los trabajos anteriores han sugerido que las dosis celulares de la médula ósea trasplantada se correlacionan con el quimerismo total de forma lineal, estos datos muestran a lo sumo la sustitución de médula ósea y células maduras en masa y no reflejan la sustitución de HSC, lo que representa solo 0,01 % de médula no fraccionada. Sin embargo, cuando las HSC son repetidamente trasplantadas, hemos observado aumentos en el quimerismo de los granulocitos. Por lo tanto, la ocupación de nichos HSC disponibles después del trasplante de un exceso de HSC exógenas, que permanecen en la circulación durante ~ 1 - 5 min después del trasplante, no impide que posteriormente queden disponibles nichos adicionales. Cabe pensar que la transfusión continua de un número bajo de HSC sería superior a los bolos administrados individualmente, ya que la velocidad de vaciado y llenado del nicho es alta. Debido a que no parece haber un aumento evidente en el quimerismo de granulocitos con el tiempo o dosis de células por encima de un nivel umbral, los datos también sugieren que las HSC trasplantadas deben encontrar su camino rápidamente a un nicho adecuado y no pueden recircular indefinidamente en busca de nichos vacíos sin la pérdida del potencial hematopoyético.

65

La capacidad de las HSC trasplantadas para auto-renovarse durante toda la vida del organismo asegura una producción constante de células linfoides normales a través de cada etapa del desarrollo. En los mutantes genéticos utilizados en nuestro trabajo, el desarrollo de linfocitos en el hospedador está bloqueado o alterado en etapas definidas del desarrollo. En cada etapa del desarrollo o después, las células donantes de tipo silvestre tienen una ventaja competitiva y pueden expandirse o acumularse oportunamente para dar lugar en última instancia a un gran número de linfocitos maduros normales. Varios factores han sido implicados en la expansión de los primeros linajes de linfocitos B y timocitos, incluyendo IL-7, factor de células madre, ligando Flt3 y, recientemente, varias vías Wnt/Frizzled. En el caso de los animales  $\gamma c^{-/-}$ , la población pro-B-B parece tener defectos en la expansión dependiente de IL-7, proporcionando una ventaja proliferativa a las células donantes de tipo silvestre en estas etapas. Los ratones RAG2<sup>-/-</sup> probablemente se reconstituyen más lentamente debido a que sus linfocitos pueden desarrollarse normalmente a través de las etapas de células pro-B, así como de los timocitos DN3 y ocupan los microambientes estromales apropiados. Sin embargo, debido a que los linfocitos RAG2<sup>-/-</sup> no pueden avanzar más allá de estas etapas, un número pequeño de células derivadas de donantes en desarrollo puede expandirse y acumularse sin competencia en los estadios de células pre-B, así como timocitos DN4 y todas las etapas de desarrollo posteriores. No hemos observado ninguna disminución significativa en el quimerismo de granulocitos o linfocitos en ningún momento hasta 30 semanas tras el trasplante de los receptores primarios.

También se demuestra de manera concluyente que la aceptación del injerto estable dentro de estos nichos raros por HSC con incompatibilidades en el complejo menor de histocompatibilidad está estrechamente regulada por los linfocitos TCD4<sup>+</sup> del hospedador. Las HSC de ratones CD45.1 no pueden injertar productivamente ratones CD45.2 congénicos no irradiados, sin embargo, rutinariamente se injertan la F1 (CD45.1 x CD45.2) genéticamente no reactiva. Hasta donde sabemos, la única diferencia antigénica entre estas líneas es el alelo CD45, que normalmente se considera un marcador congénico relativamente inocuo. De manera similar, las HSC aisladas de ratones GFP transgénicos retrocruzados para la constitución genética de C57BL/Ka no pueden injertar productivamente ratones C57BL/Ka de tipo silvestre. La única diferencia antigénica entre estas líneas es según entendemos el producto génico de GFP.

Sin embargo, afortunadamente, la eliminación de la función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> permite el injerto funcional y sostenido de HSC con incompatibilidades en el complejo menor de histocompatibilidad en nuestro sistema. Demostramos que solo el empobrecimiento transitorio de linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediado por anticuerpos, es suficiente para permitir la aceptación del injerto a corto plazo de HSC de donantes de tipo silvestre y la restauración de linfocitos B en un modelo de ratón no SCID. Un empobrecimiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> más completo y/o mejores métodos para aumentar la contribución de las células dendríticas tímicas derivadas de los donantes podrían permitir una hematopoyesis duradera del donante.

Incluso en ausencia de mutaciones genéticas heredadas, tanto los ratones como los seres humanos desarrollan una disminución de la capacidad inmunitaria con la edad. Esta pérdida progresiva de la función inmunitaria se ha atribuido recientemente a defectos intrínsecos de las HSC en la diferenciación a los progenitores comprometidos al linaje linfóide. Dado que hemos demostrado que un número muy pequeño de HSC que funcionan adecuadamente pueden enmascarar los defectos en un grupo mucho más grande de HSC, es tentador especular que los defectos inmunológicos relacionados con la edad no se hacen evidentes hasta que casi todos las HSC totalmente "jóvenes" se empobrecen. La reintroducción de HSC completamente multipotentes, tal vez obtenida como una muestra autóloga en una etapa previa de la vida, podría retrasar significativamente el declive inmunitario relacionado con la edad.

El mecanismo mediante el cual las HSC trasplantadas corrigen las deficiencias hematopoyéticas en nuestros receptores no acondicionados es aplicable a la corrección de muchos tipos de inmunodeficiencias tanto SCID como no SCID, pero estos estudios demuestran al mismo tiempo claramente que diferencias sutiles en el complejo de histocompatibilidad menor pueden mediar en el rechazo de injertos de HSC cuando hay linfocitos T del hospedador presentes. Nuestros datos sugieren que el trasplante de HSC purificadas, en combinación, dado el caso, con tratamientos linfoblátivos altamente específicos, puede corregir las deficiencias linfoides en pacientes inmunodeficientes sin los efectos secundarios indeseados, como el acondicionamiento tóxico y la GVHD, frecuentemente asociados con los regímenes actuales de acondicionamiento y trasplante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Animales.* Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Internacional de Cuidado y Uso de Animales. Las líneas C57BL/Ka-Thy1.1 CD45.2<sup>+</sup> (HZ) y C57BL/Ka-Thy1.1 CD45.1 (BA) fueron derivadas y mantenidas en nuestro laboratorio. Los ratones transgénicos eGFP usados en estos estudios fueron retrocruzados al menos 20 generaciones a la línea BA o HZ. Los ratones C57Bl6/Harland utilizados para los estudios de envejecimiento se obtuvieron del Instituto Nacional del Envejecimiento. Los ratones RAG2<sup>-/-</sup>, RAG2<sup>-/-</sup> $\gamma c^{-/-}$ , I-A<sup>-/-</sup> y  $\beta 2m^{-/-}$  se han descrito anteriormente y se han cruzado al menos 20 generaciones para las constituciones C57BL/Ka-Thy1.2 CD45.1<sup>+</sup>, C57BL/Ka-Thy1.2 CD45.2<sup>+</sup> y C57BL/Ka-Thy1.1 CD45.2. Los ratones TCR $\alpha^{-/-}$  $\beta^{-/-}$  fueron proporcionados por J. Campbell y M. Davis (Universidad de Stanford, Stanford, CA). Los ratones C $\mu^{-/-}$  fueron proporcionados por J. Tung y L. Herzenberg (Universidad de Stanford). Se tomaron muestras de sangre periférica de

la vena de la cola y todos los trasplantes de HSC se realizaron por inyección en el seno retroorbital de ratones anestesiados con isoflurano. Para los trasplantes repetidos, se trasplantaron entre 1.750 y 4.000 HSC semanalmente durante 6 semanas. Los ratones donantes tenían 4-6 semanas de edad, y los ratones receptores oscilaban tenían de 4-12 semanas de edad, a menos que se indique lo contrario.

5 *Anticuerpos.* Los siguientes anticuerpos monoclonales fueron purificados y conjugados usando hibridomas mantenidos en nuestro laboratorio: 19XE5 (anti-Thy1.1), 2C11 (anti-CD3), GK1.5 (anti-CD4), 53-7.3 (anti-CD5), 53-6.7 (anti-CD8), 6B2 (anti-B220), 8C5 (anti-Gr-1), M1/70 (anti-Mac-1), TER119 (anti-Ter119), A20.1.7 (anti-CD45.1), AL1-4A2 (anti-CD45.2), 2B8 (anti-c-kit), E13-161-7 (anti-Sca-1), anti-CD16/CD32 (2.4G2) y A7R34 (anti-receptor  $\alpha$  de IL-7). Los anticuerpos se conjugaron con biotina, PE, alofocianina (APC), Alexa 405, Alexa 430 o Alexa 488 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los siguientes fueron adquiridos en eBiosciences: anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, B220, Mac-1, Ter119 y Gr-1 conjugado con PE-Cy5; anti-c-kit y anti-Mac-1 conjugado con PE-Cy7; anti-Sca-1 conjugado con PE-Cy5.5; anti-CD45.1 y anti-CD45.2 (104) conjugado con APC-Cy5.5; anti-B220 conjugado con APC-Cy7; anti-Flk2 (A2F10) conjugado con PE o biotina y estreptavidina conjugada con APC. Anti-CD34 (RAM34) conjugado con FITC o biotina, anti-TCR $\beta$  (H57-597) conjugado con APC, anti-CD43 (1B11) conjugado con PE, anti-I-A/I-E (M5.114.15.2) conjugado con PE y anti-Ly51 (6C3) conjugated con biotina fueron adquiridos en BD Biosciences. La estreptavidina conjugada con APC-Cy7 fue adquirida en Caltag.

20 *FACS y análisis.* Todas las células se clasificaron en un FACSVantage o un FACS Aria (Becton Dickinson). Todos los análisis de sangre periférica se realizaron en un LSR-Scan (Becton Dickinson). Se obtuvo sangre periférica a partir de la vena de la cola, los eritrocitos se sedimentaron con dextrano al 2 % y los eritrocitos restantes se lisaron con una solución de cloruro de amonio. Los leucocitos restantes se tiñeron con anti-CD45.2-Alexa 488, anti-CD45.1-PE, anti-Ter119-PE-Cy5, anti-Mac-1-PE-Cy7, anti-TCR $\beta$ -APC y Anti-B220-APC-Cy7. Cuando se analizó la sangre periférica que contenía células eGFP+, se omitió anti-CD45.1-Alexa-488 y se utilizó anti-Gr-1-PE en lugar de anti-CD45.2-PE si estaba justificado por el experimento. Para el aislamiento de HSC, la médula ósea fue primero enriquecida usando perlas anti-c-kit y la selección inmunomagnética se realizó en un instrumento AutoMACS (Miltenyi Biotec). Las células enriquecidas se tiñeron con anti-CD34-FITC, anti-Flk2-PE, anti-linaje (CD3, CD4, CD8, B220, Ter119, Mac-1, Gr-1)-PE-Cy5, anti-Sca-1-PE-Cy5.5 y anti-c-kit-PE-Cy7 y las células se clasificaron dos veces antes del trasplante. Para el análisis del quimerismo de las HSC, se incluyó CD45.1-APC-Cy5.5 y la tinción de CD34 tinción se logró con anti-CD34-biotina seguido de estreptavidina-APC. Para el aislamiento de las HSC de ratones transgénicos eGFP, las células se tiñeron con anti-linaje-Cy5-PE, anti-Sca-1-PE-Cy5.5, anti-c-kit-PE-Cy7, anti-Flk2-PE y anti-CD34-biotina seguido de estreptavidina-APC. Para el análisis del quimerismo de HSC eGFP, se incluyó anti-CD45.1-APC-Cy5.5.

35 *Inmunizaciones.* Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 100  $\mu$ g de NP conjugado a  $\gamma$ -globulina de pollo (Biosearch Technologies) precipitado en sulfato de potasio y aluminio al 10 % (Sigma-Aldrich). Se realizaron ensayos de inmunoabsorción enzimática ligada a NP específicos con suero obtenido 1 semana después de la inmunización en placas de 96 pocillos de alta unión a proteínas con 5  $\mu$ g de NP-BSA (Biosearch Technologies). Los pocillos se desarrollaron con anti-IgG de ratón-peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology Associates, Inc.) seguido de 1 mg/ml de reactivo ABTS (Sigma-Aldrich) y las reacciones se detuvieron mediante la adición de azida sódica al 0,1 % (Sigma-Aldrich). La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405 nm.

45 *Empobrecimiento in vivo de linfocitos T CD4+.* Los ratones se trataron consecutivamente durante 3 d con 500  $\mu$ g de anticuerpo anti-CD4 purificado inyectado por vía intravenosa (GK1.5). Se analizó la sangre periférica para la expresión de TCR $\beta$  y CD8 para evaluar cuantitativamente el empobrecimiento de linfocitos T CD4+ en relación con los animales no tratados. A continuación se trasplantó a estos ratones 800 HSC GFP+ 1 d después de la tercera inyección. A los ratones se les administraron a continuación inyecciones semanales de anti-CD4 durante las primeras 3 semanas después del trasplante de HSC y no se trataron después.

#### 50 **Ejemplo 4**

Empobrecimiento del nicho de HSC con imatinib

Los animales se ensayan inicialmente por administración intravenosa de una dosis única de 10-200 mg/kg de imatinib a ratones inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> y el suero se ensaya cada dos días para detectar la presencia de imatinib. El punto en el que no se detecta imatinib en el suero se utiliza como punto de partida para la infusión de HSC *in vivo*. Para determinar si la administración de imatinib empobrece las HSC *in vivo*, los números de HSC y las frecuencias en la médula ósea de ratones tratados se cuantifican en el momento de la eliminación de imatinib. Las HSC identificables fenotípicamente se identifican como células KLS CD135<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>. Las HSC de la médula ósea también se identifican utilizando la expresión de Sca-1 y CD150, junto con la falta de expresión de CD34, CD135, CD244, CD48 y CD41 y otros antígenos asociados con el compromiso de linaje.

Se acondicionan ratones RAG2<sup>-/-</sup> (CD45.1) con 100 mg/kg de imatinib y en el momento de la eliminación del fármaco, se introducen 5000 - 10.000 HSC c-kit<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> (KLS) CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup> purificadas de CD45.2 de tipo silvestre en los receptores acondicionados con imatinib. Se obtiene sangre periférica de los receptores cada cuatro

semanas después del trasplante y se cuantifica el quimerismo de granulocitos y linfocitos.

Con el fin de determinar los efectos de la dosis celular en este sistema, se acondicionan ratones receptores RAG2<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup> (CD45.2) con 100 mg/kg de imatinib como antes y se trasplantan con dosis variables de LT-HSC de CD45.1  
5 doblemente clasificados. La sangre periférica se ensaya cada cuatro semanas para determinar el quimerismo de los granulocitos del donante hasta 24 semanas después del trasplante.

*Ratones.* Los ratones receptores son ratones deficientes en el gen de activación de la recombinasa 2 (RAG2<sup>-/-</sup>), deficientes en la cadena gamma común de la interleucina 2 RAG2<sup>-/-</sup> (RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>) o ratones μMT de 4-8 semanas de  
10 edad. Los ratones donantes son ratones transgénicos GFP de 8-12 semanas que expresan GFP del promotor de β-actina de pollo, o ratones C57Bl/Ka CD45.1 o CD45.2 congénicamente distinguibles.

*Trasplante de HSC.* Se cosechó médula ósea de ratones donantes triturando huesos, lisando eritrocitos con tampón de lisis de ACK (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHCO<sub>3</sub> 1 mM y EDTA 0,1 mM) y la eliminación de residuos en gradiente de densidad utilizando Histopaque 1119 (Sigma, St. Louis, MO). La médula ósea se enriquece en c-kit<sup>+</sup> usando  
15 microesferas CD117<sup>+</sup> (AutoMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las células se tiñeron con anticuerpos descritos a continuación y se aislaron HSC mediante FACS simple o doble basándose en la reactividad definida previamente para marcadores de superficie celular particulares (c-kit<sup>+</sup> linaje Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) en el BD FACS-Aria (BD Biosciences, San José, CA). Las células fueron trasplantadas por inyección retro-orbital.

*Análisis de la aceptación del injerto.* La sangre se obtiene de la vena de la cola de ratones trasplantados en varios puntos temporales. Se separó usando dextrano al 2 % a 37 °C durante 30 min y posteriormente se lisó usando tampón de lisis de ACK (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHCO<sub>3</sub> 1 mM y EDTA 0,1 mM) durante 5 minutos. Las células se tiñen con los anticuerpos descritos anteriormente y se analizan en el BD FACS-Aria. El quimerismo de los granulocitos de los  
20 donantes se determina analizando el porcentaje de células Ter119<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>Mac1<sup>allo</sup>dispersión lateral<sup>allo</sup> que son también donante<sup>+</sup>.

Se establece un modelo animal SCID-hu para la médula ósea humana. Las HSC humanas se ensayan acondicionando con imatinib para el empobrecimiento del nicho como se ha descrito anteriormente y para el  
30 quimerismo después del trasplante.

*Modelo de médula ósea Scid-hu.* Fémures y tibias fetales humanos (1-2 cm) de 17-22 semanas gestacional (g.w.), que se sabe que son activos en la hematopoyesis, se cortan a lo largo de un eje longitudinal de modo que quede expuesta la corteza ósea, así como las regiones intramedulares. Estos fragmentos son a continuación implantados quirúrgicamente por vía subcutánea en ratones SCID. Se cruzan ratones homocigotos CB-17 scid/scid, se tratan con  
35 antibióticos como se describe (McCune et al., Science (1988) 241:1632) y se utilizan cuando tienen 6-8 semanas de edad. Se aplica anestesia con metoxiflurano durante todos los procedimientos quirúrgicos. Los cortes de tejidos teñidos con hematoxilina-eosina se preparan a partir de injertos óseos 2 semanas y 8 semanas después de la implantación. Los tejidos se fijan en formalina al 20 %, se descalcifican con EDTA (1,7 mM) en solución de HCl, se incluyen en parafina y se cortan en cortes con un grosor de 4 μm y se tiñen con hematoxilina y eosina. Los injertos se eliminan a intervalos variables después de la implantación y se analizan para detectar la presencia de actividad hematopoyética humana.

Las suspensiones celulares se preparan a partir de tejidos de médula ósea implantados o normales, se tratan con cloruro de amonio al 0,83 % durante 5-10 minutos a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos y se lavan con PBS. Las células se incuban con anticuerpos MEM-43 biotinilados, Ly5.1 biotinilados o anticuerpos de control biotinilados durante 45 minutos en hielo, se lavan a través de un cojín de suero bovino fetal (FBS) y luego se tiñen con avidina conjugada con fluoresceína (FITC-) (Caltag Laboratories Inc.) durante 45 min. Antes de la citometría de flujo, se añade yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 10 μg/ml para eliminar las células muertas. Los  
45 patrones de dispersión frontal y lateral de las células positivas para MEM-43 se obtienen mediante citometría de flujo de cuatro parámetros usando un único FACScan con láser (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

El origen humano de las células hematopoyéticas dentro de los injertos se confirma por citometría de flujo con MEM-43 (un anticuerpo específico de un antígeno común de células humanas) o Ly5.1 (reactivo con antígeno pan-leucocito de ratón). La sustitución de la médula ósea humana por células hematopoyéticas de ratón se observa en algunos de los injertos incubados *in vivo* durante más de 20 semanas.  
55

Las características de las poblaciones de células hematopoyéticas en la médula ósea se analizan mediante perfiles de dispersión de luz utilizando citometría de flujo. Cuatro grupos distintivos de células hematopoyéticas, es decir, las poblaciones linfoides (R1), blastoides (R2), mieloides (R3) y granulocitos maduros (R4) se revelan en la médula ósea fetal normal mediante distribuciones de dispersión frontal y lateral. Se llevan a cabo análisis similares con células humanas positivas para MEM-43 recuperadas de los implantes óseos en diferentes puntos temporales después de la implantación. Las células recuperadas 2 semanas después de la implantación no muestran formación clara de agrupamientos, lo que indica que estas células no son de origen hematopoyético, mientras que las células humanas de injertos incubados durante más de 4 semanas mostraron perfiles de dispersión similares a los de las células  
65

normales de médula ósea fetal. Por lo tanto, se observa que la cinética de la aparición de células hematopoyéticas humanas en el hueso implantado detectado por análisis de dispersión concuerda con las observaciones histológicas.

5 La presencia de células humanas en la circulación periférica de ratones SCID-hu con injertos óseos se examina mediante análisis FACS, usando la combinación de anticuerpo FITC-HLe1 (el antígeno leucocitario humano común, CD45) y el anticuerpo PE-W6/32 (un determinante monomórfico del MHC-Clase I). Las células humanas se detectan a una frecuencia significativa en la sangre periférica de los ratones SCID-hu examinados después de 9 semanas de implantación.

10 Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos particulares descritos, que como tales pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, la cual estará limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas

15 Tal como se usa en este documento, las formas singulares “uno”, “una”, y “el”, “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de tales células y la referencia a “el cultivo” incluye referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, etc. Todos los términos técnicos y científicos usados en la  
20 presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la materia a los que pertenece esta invención a menos que se indique claramente lo contrario.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une selectivamente a c-kit y que se conjuga con una fracción citotóxica para su uso en un método de injerto de células madre hematopoyéticas en un paciente humano en donde el método comprende:
  - 5 poner en contacto a dicho paciente humano con dicho anticuerpo en una dosis eficaz para extraer selectivamente células madre hematopoyéticas endógenas en médula ósea; y
  - introducir células madre hematopoyéticas exógenas en dicho paciente humano después de un periodo de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente dicho anticuerpo de la circulación del paciente,
  - 10 en donde dicho periodo de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente dicho anticuerpo es tal que el anticuerpo está presente a una concentración de menos de 10 ng/ml en el torrente sanguíneo.
2. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la fracción citotóxica es cadena de difteria A, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, curcina, crotina, fenomicina, enomicina, o auristatina-E.
- 20 4. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la fracción citotóxica es auristatina-E.
5. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación, en donde la fracción citotóxica es cadena de exotoxina A.
- 25 6. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la fracción citotóxica es cadena de difteria A.
7. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichas células madre exógenas son células madre modificadas genéticamente.
- 30 8. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas células madre exógenas son células madre alogénicas o autólogas.
- 35 humano padece de un trastorno sanguíneo, opcionalmente un trastorno sanguíneo genético, como anemia aplásica (por ejemplo, anemia de Fanconi o síndrome de Blackfan-Diamond), anemia de células falciformes (por ejemplo, enfermedad de HbS, anemia drepanocítica, meniscocitosis o anemia hemolítica crónica), talasemia (por ejemplo,  $\alpha$ -talasemia o  $\beta$ -talasemia) o hemoglobinopatía (por ejemplo, enfermedad de hemoglobina C o enfermedad de hemoglobina E).
- 40 10. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho paciente humano tiene una inmunodeficiencia, opcionalmente en donde el paciente humano tiene inmunodeficiencia combinada, como inmunodeficiencia combinada grave, agammaglobulinemia Suiza, inmunodeficiencia combinada con deficiencia de adenosina desaminasa o de nucleósido fosforilasa, o inmunodeficiencia combinada con inmunoglobulinas (síndrome de Nezelof).
- 45 11. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho paciente humano tiene cáncer, opcionalmente leucemia linfocítica crónica o cáncer de mama.
- 50 12. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho anticuerpo que se une selectivamente a c-kit se administra sistémicamente.
13. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde del anticuerpo que se une selectivamente a c-kit se administra directamente al tejido objetivo.
- 55 14. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde se administra un agente de acondicionamiento, seleccionado de un anticuerpo específico para una o más de CD4, una especificidad por células NK, una especificidad por macrófagos y CD8 antes de la infusión de las células madre exógenas.
- 60 15. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las células madre exógenas se administran a una concentración de  $10^4$  a  $10^6$  células madre/kg de peso del paciente.
16. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la administración de un anticuerpo específico para c-kit lleva a una eliminación altamente eficiente de células madre hematopoyéticas (HSC) del huésped y a niveles altos de quimerismo de HSC donante después del trasplante.
- 65

Figura 1

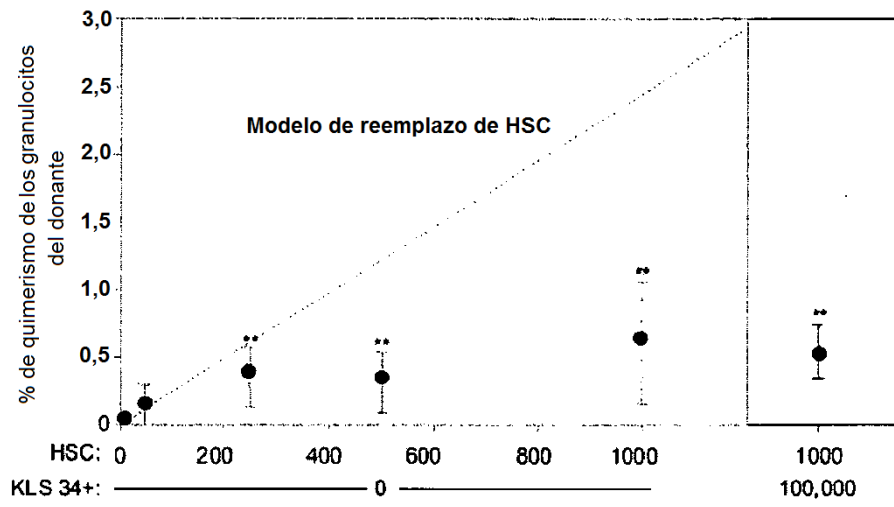


Figura 2

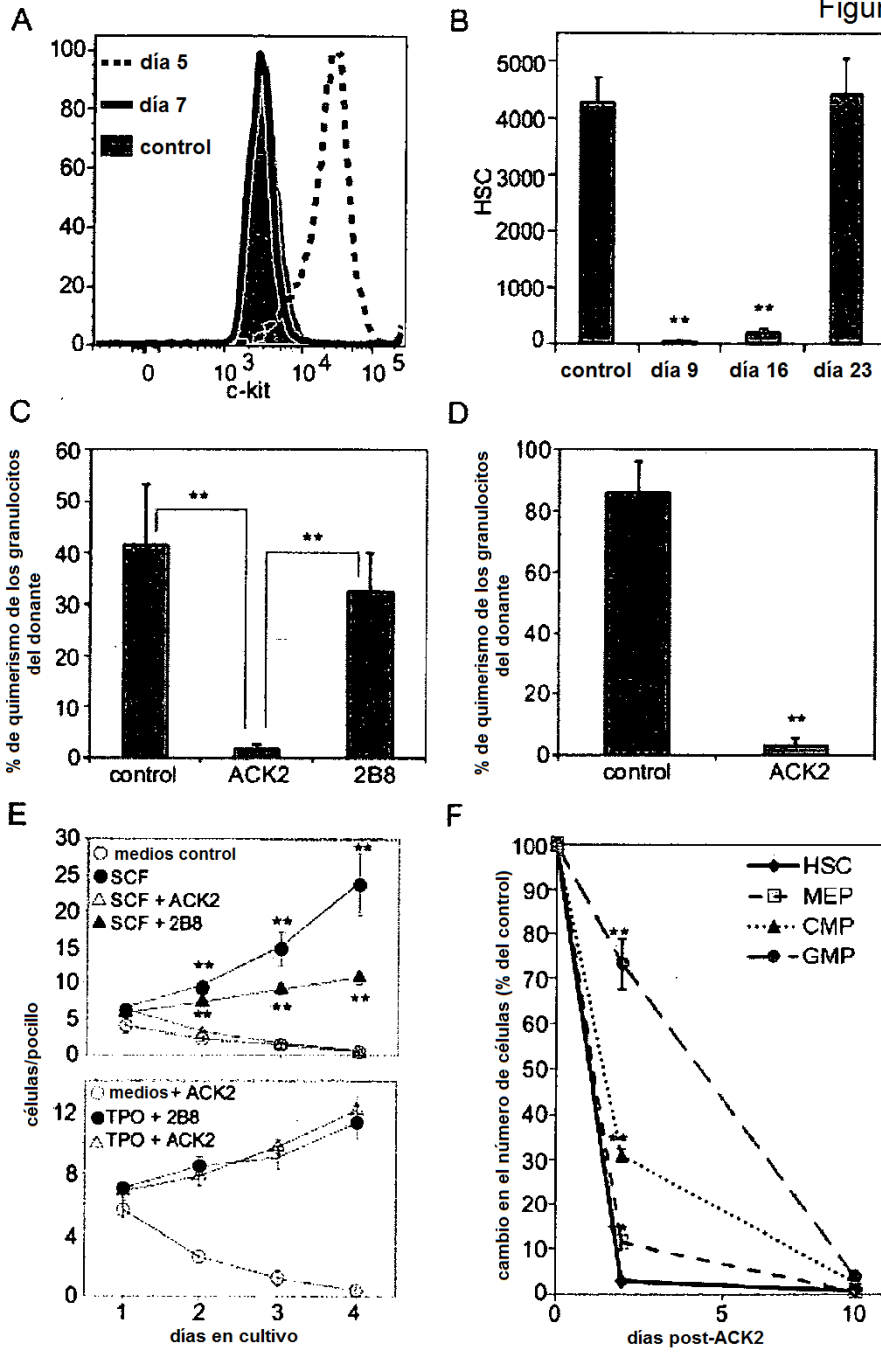


Figura 3

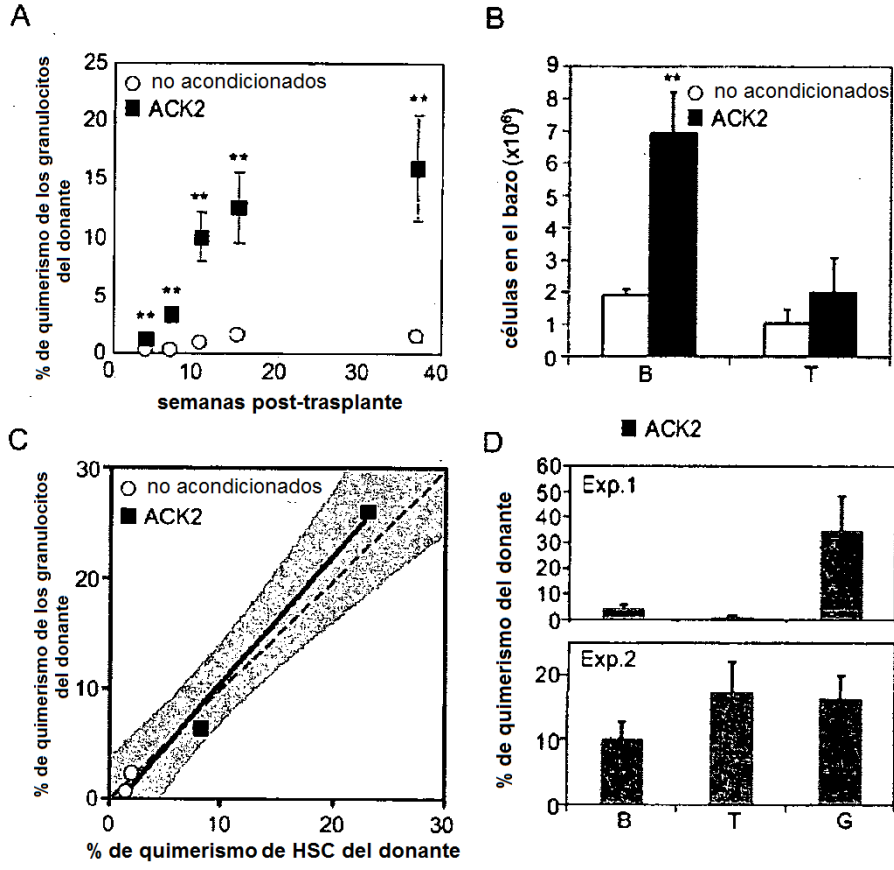


Figura 4

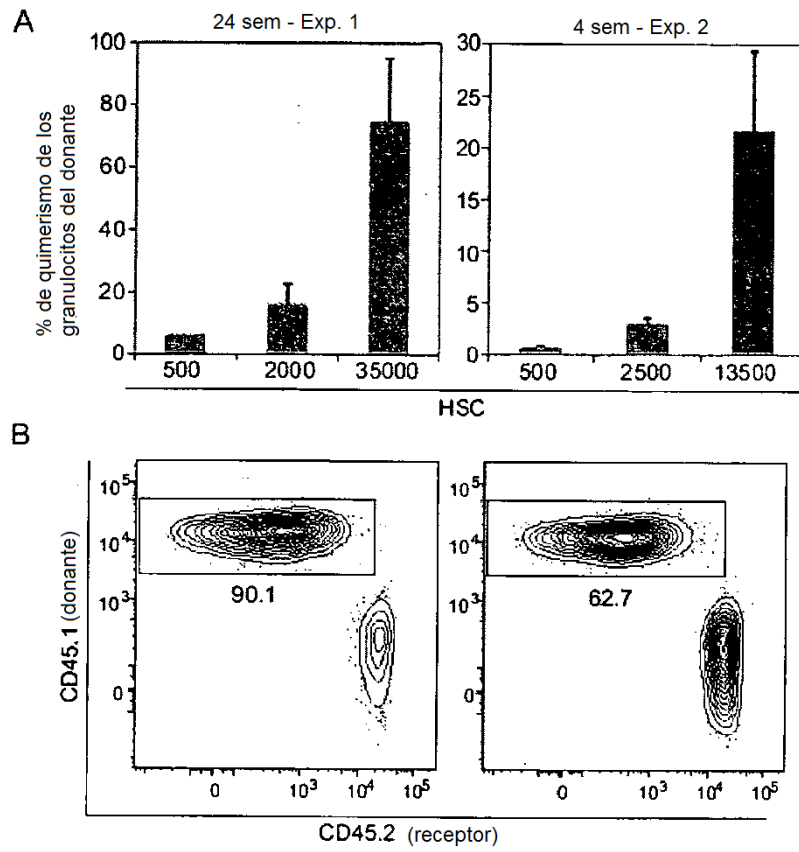


FIGURA 5

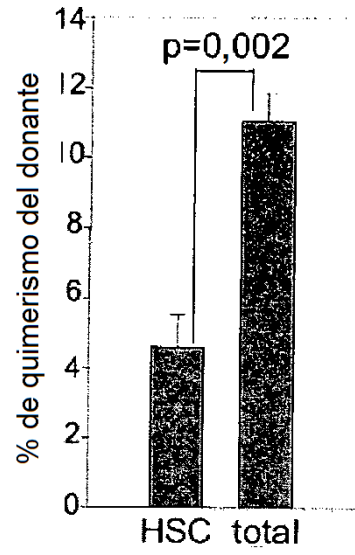


FIGURA 6

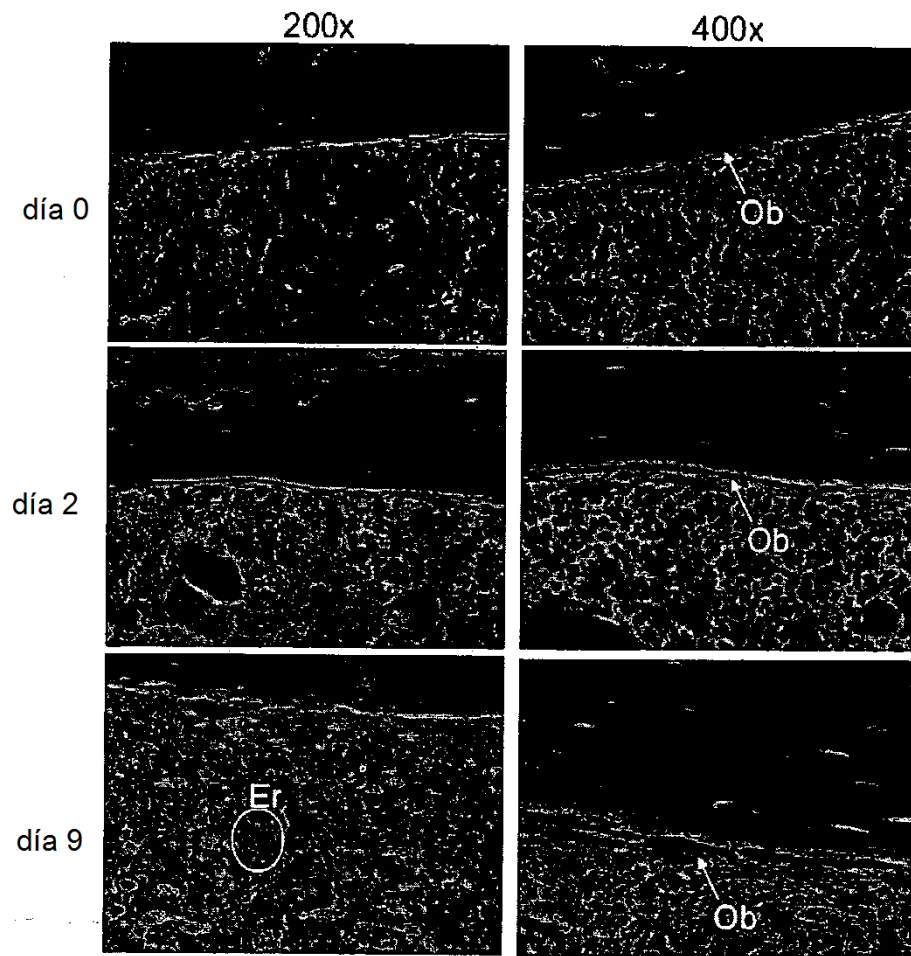


FIGURA 7

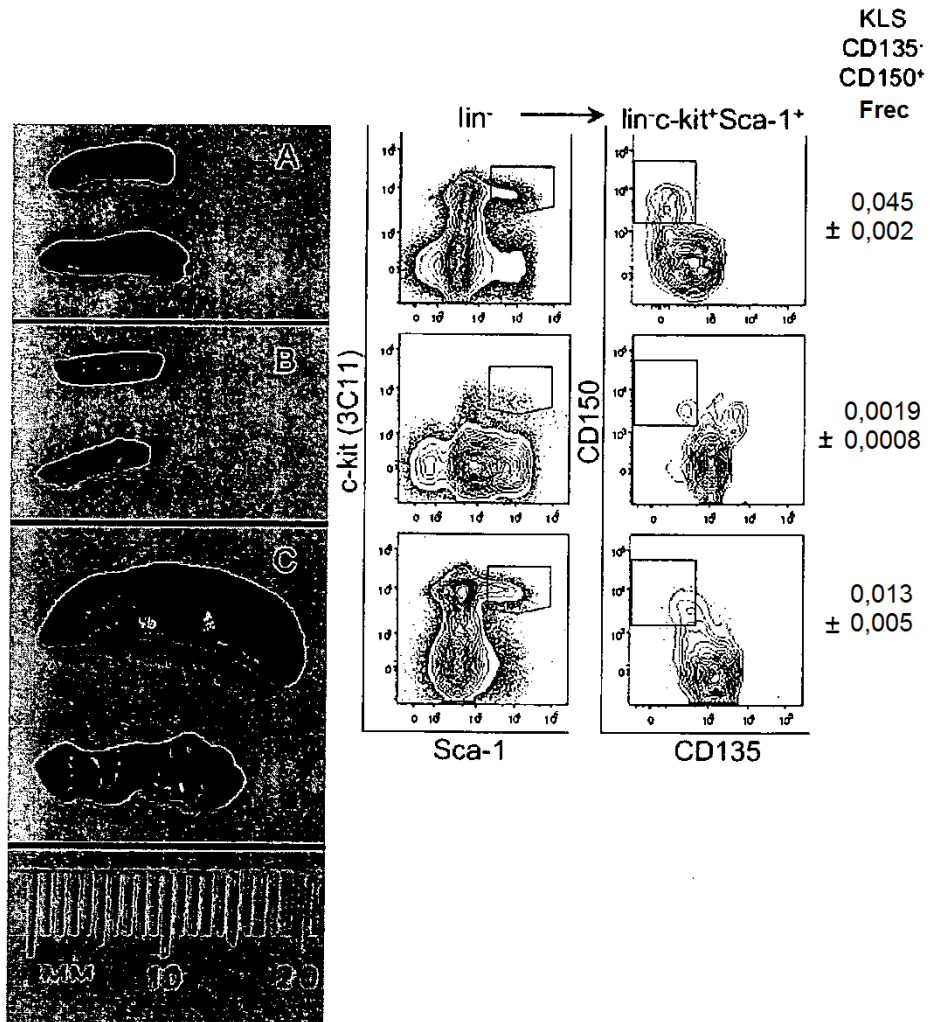


FIGURA 8

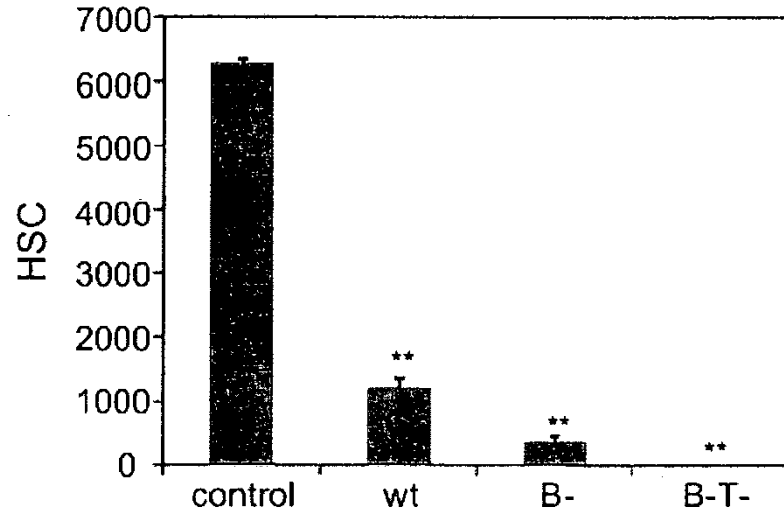


FIGURA 9

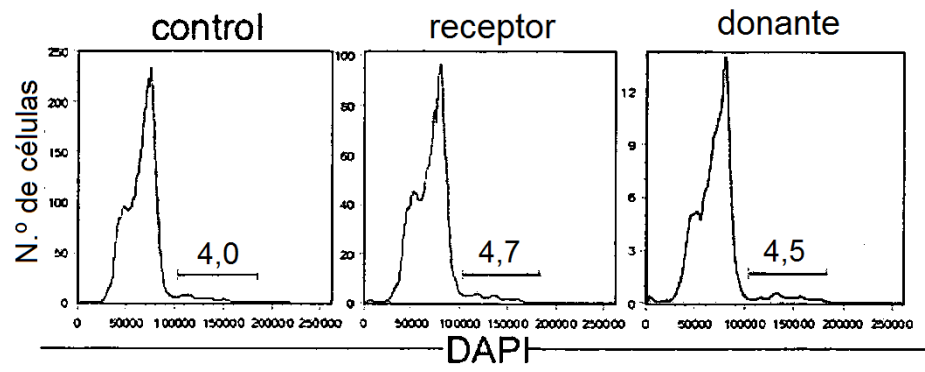
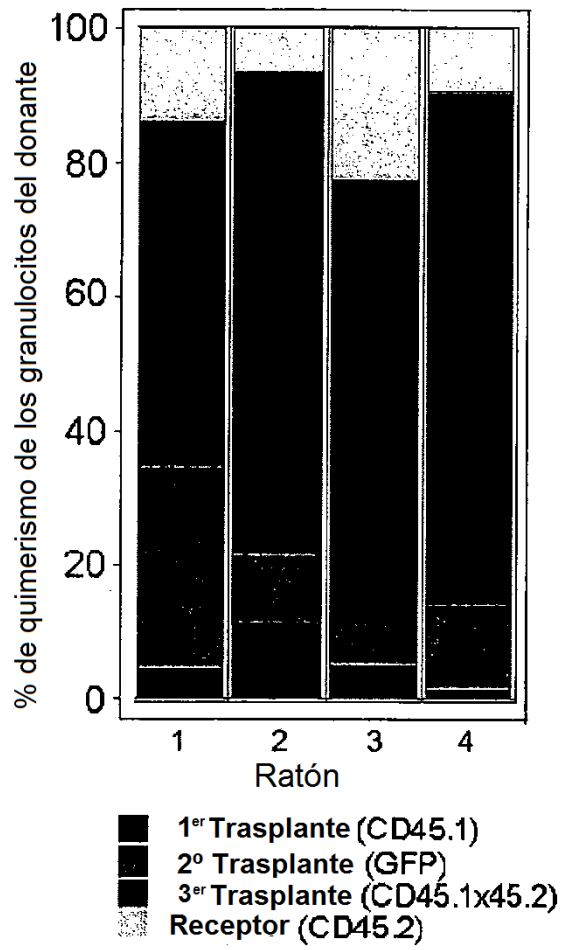


FIGURA 10



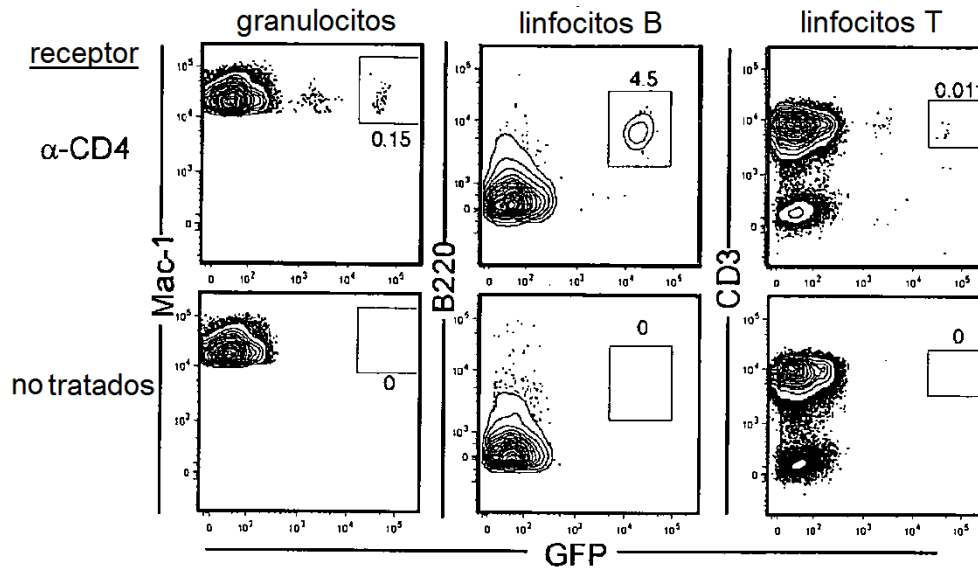


FIGURA 11