



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 222**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/02** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C07D 207/00** (2006.01)  
**C07D 209/00** (2006.01)  
**C07D 295/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08010501 .8**  
96 Fecha de presentación : **07.12.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1975243**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **BODIPY aminoacetaldehído dietil acetal.**

30 Prioridad: **07.12.1998 US 111195 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.07.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.07.2010**

73 Titular/es: **DUKE UNIVERSITY**  
**230 North Building, Research Drive**  
**Box 90083**  
**Durham, North Carolina 27708-0083, US**

72 Inventor/es: **Smith, Clayton A;**  
**Colvin, Michael;**  
**Storms, Robert W. y**  
**Ludeman, Susan M.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 343 222 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

BODIPY aminoacetaldehído dietil acetal.

5 **Ámbito técnico**

La presente invención se refiere en general a las células madre, y en particular a un método de aislamiento de células madre y a reactivos adecuados para ser usados en tal método.

10 **Antecedentes**

Las células madre hematopoyéticas (HSC) más primitivas reconstituirán todos los linajes hematopoyéticos para toda una vida. Estas células madre hematopoyéticas pluripotentes (PHSC) son las células trasplantables que finalmente son las dianas para el aporte de genes en las terapias génicas basadas en las células madre. Una característica definitoria de las PHSC es la de que estas células sobrevivirán a la mayoría de los regímenes de acondicionamiento citoablativo. Los mecanismos de su resistencia a estos agentes tóxicos sugieren potenciales estrategias mediante las cuales estas células puedan ser seleccionadas *in vitro*. Un mecanismo de la resistencia a los fármacos radica en la capacidad de efluir las sustancias tóxicas fuera de la célula por medio de la bomba de multiresistencia a fármacos (MDR). Sustratos fluorescentes para la bomba de MDR han permitido el aislamiento de PHSC tomando como base su alta capacidad de eflujo de colorante en una variedad de sistemas de ensayo. Las resistencias a los fármacos pueden también ser conferidas por mecanismos más específicos. Por ejemplo, una aldehído deshidrogenasa (ALDH) citosólica media la resistencia a la ciclofosfamida (CPA), que es un agente alquilante que se usa en regímenes citorreductores en preparación para el trasplante de médula ósea. Así, la expresión de ALDH puede ser considerada como un marcador seleccionable para las auténticas PHSC.

La eficacia terapéutica de la CPA ha sido atribuida en gran medida a la capacidad de las PHSC y de las células de las criptas intestinales para sobrevivir al régimen farmacológico. Las progenitoras hematopoyéticas humanas expresan una ALDH citosólica, y HSC primitivas humanas derivadas de células madre de la sangre periférica movilizada pueden ser seleccionadas al ser puestas en cultivo con ciclofosfamida por espacio de 7 días. Jones *et al.* han demostrado que pueden aislarse PHSC murinas reconstitutivas a largo plazo previendo un sustrato fluorescente membrano-permeable para la ALDH y seleccionando entonces las células con los más altos niveles de actividad de ALDH (Jones, Blood 85:2742 (1995); Jones *et al.*, Blood 88:487 (1996)). En estos estudios se usó dansilo aminoacetaldehído (DAAA) para colorear células de médula ósea murina preparadas mediante elutriación en contracorriente.

Los estudios preliminares realizados usando DAAA indican que este reactivo es inutilizable con preparaciones de células hematopoyéticas humanas porque la intensidad de señal del reactivo es demasiado alta como para resolver poblaciones celulares discretas por citometría de flujo. La presente invención aporta un sustrato fluorescente para ALDH que está exento de los problemas que van asociados al DAAA y que puede ser usado en la purificación de células hematopoyéticas primitivas humanas.

40 **Breve exposición de la invención**

La presente invención proporciona el compuesto de la reivindicación 1. En la presente invención se describe un nuevo reactivo y método para aislar células madre entre las que se incluyen las células madre humanas. El reactivo es un sustrato fluorescente para ALDH. El método comprende el paso de colorear una población celular que incluye células madre primitivas con el sustrato en presencia de un inhibidor de la actividad de MDR. La ALDH que está presente en las células convierte el sustrato en un producto que es atrapado dentro de las células. Puesto que las células madre primitivas tienen unos niveles de actividad de ALDH que son más altos que los de otros tipos de células, estas células se colorean con mayor luminosidad que otros tipos de células. La presencia del inhibidor de la MDR reduce el eflujo del sustrato desde las células madre.

Los objetos y ventajas de la presente invención quedarán claramente de manifiesto a la luz de la descripción siguiente.

55 **Breve descripción de los dibujos**

Figuras 1A-1D. La coloración con BAAA identifica las células con altos niveles de actividad de ALDH. La L1210/cpa es una derivada de la línea celular leucémica L1210 que sobreexpresa ALDH. (Las Figs. 1A y 1B representan células L1210, más DEAB y menos DEAB, respectivamente; y las Figs. 1C y 1D representan células L1210/cpa, más y menos DEAB, respectivamente).

Figuras 2A-2D. El BAAA es efluído por una bomba de MDR desde células hematopoyéticas, y en particular desde células CD34<sup>+</sup> primitivas, como pone de manifiesto la diferencia entre las células CD34<sup>+</sup> que tienen luminosidad de BODIPY (BODIPY<sup>br</sup>) (Fig. 2B) en presencia y en ausencia de verapamilo como inhibidor de la MDR (las Figs. 2A y 2B son para t=0, menos y más verapamilo, respectivamente; y las Figs. 2C y 2D son para t=30', más y menos verapamilo, respectivamente).

## ES 2 343 222 T3

Figuras 3A-3D. Células ALDH<sup>br</sup> (es decir, células con propiedades de baja SSC (SSC = dispersión lateral de la luz) que se colorean con luminosidad con BAAA en presencia de un inhibidor de la MDR) están enriquecidas en células con el inmunofenotipo CD34<sup>+</sup>CD38<sup>lo/-</sup> primitivo que va tradicionalmente asociado a las células madre primitivas.

5 Figuras 4A y 4B. La intensidad de coloración con BAAA está en correlación inversa con la expresión de CD38 (Fig. 4A) y de CD71 (Fig. 4B) en las células CD34<sup>+</sup>.

10 Figuras 5A-5C. Células ALDH<sup>br</sup> están enriquecidas en progenitoras iniciales equivalentes a células CD34<sup>+</sup> y están más enriquecidas en progenitoras muy primitivas que las células CD34<sup>+</sup>. (Fig. 5A = progenitoras (HPCA), Fig. 5B = progenitoras iniciales (a las 5 semanas de LTC (LTC = cultivo a largo plazo) y Fig. 5C = progenitoras primitivas (a las 8 semanas de LTC)).

15 Figura 6. Preparación de BAAA. Usando un vial de ámbar, una solución de aminoacetaldehído dietilacetal (0,019 mmoles, Aldrich Chemical Co.) en tetrahidrofurano seco (THF, 0,5 ml) fue añadida gota a gota a una solución de BODIPY FL, SE (0,013 mmoles, Molecular Probes) en THF seco (0,5 ml). Una vez concluida la adición, el vial fue tapado y la mezcla de reacción fue agitada por espacio de 30 min. El THF fue evaporado y el residuo fue disuelto en cloruro de metileno mínimo y fue luego cromatografiado en gel de sílice usando acetato de etilo-hexano (1:1) como eluyente. El producto, BODIPY-aminoacetaldehído dietilacetal, fue recuperado en rendimiento cuantitativo e  
20 identificado mediante NMR (NMR = resonancia magnética nuclear) protónica.

### Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe un método de aislamiento de células madre y a un reactivo adecuado para ser usado en tal método. El método comprende poner a una población de células que comprende células madre en contacto  
25 con un sustrato detectable para aldehído deshidrogenasa (ALDH), siendo dicho sustrato convertido en un producto detectable por la ALDH, siendo ese producto retenido en las células. El sustrato es BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA) y el flujo de BAAA desde las células, y en particular desde las células madre que están presentes en la población, es inhibida por el concurrente uso de un inhibidor de la MDR.

30 Las fuentes de poblaciones celulares que son adecuadas para ser usadas incluyen la sangre del cordón umbilical, la médula ósea, la sangre periférica y el hígado fetal. Puede usarse cualquier población celular que incluya células madre, independientemente del origen tisular (como p. ej. el intestino, la piel, los músculos, los nervios, etc.). Si bien puede ser de esperar que el método sea aplicable a una variedad de poblaciones celulares de mamíferos no humanos, el mismo es particularmente útil para aislar células madre humanas de fuentes que incluyan las mencionadas anteriormente.

35 Los sustratos que son adecuados para ser usados incluyen sustratos para ALDH, y en particular sustratos específicos para ALDH que son detectables o llevan una etiqueta detectable y que son convertidos por la acción de la ALDH en productos que son detectables o llevan la etiqueta detectable, siendo dichos productos retenidos en las células, y en particular en las células madre. En una realización preferida, el sustrato es un sustrato fluorescente que tiene un perfil de emisión de fluorescencia discreta que es idéntico al del FITC (FITC = isotiocianato de fluoresceína). Dicho sustrato es el BAAA.

40 La cantidad óptima de sustrato a añadir a la población celular puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia (véase el Ejemplo). En el caso del BAAA las concentraciones pueden variar, pudiendo usarse por ejemplo concentraciones de aproximadamente 1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M.

Una solución concentrada del sustrato puede ser añadida directamente a medio que comprenda las células a colorear, o bien células recolectadas pueden ser puestas en suspensión en un medio con contenido de sustrato.

50 A fin de inhibir el flujo del sustrato desde las células, se emplea el uso concurrente de un inhibidor de la MDR. Pueden usarse cualesquiera de los de una variedad de inhibidores de la MDR, incluyendo el verapamilo. El inhibidor puede ser añadido a las células simultáneamente al sustrato o antes de la adición del sustrato. La cantidad óptima de inhibidor de la MDR a usar puede ser determinada fácilmente (p. ej. supervisando la pérdida de coloración). En el caso del verapamilo las concentraciones pueden variar, pudiendo por ejemplo usarse una concentración de  
55 aproximadamente 50  $\mu$ M.

Tras la exposición de la población celular al sustrato (y al inhibidor de la MDR) (p. ej. aproximadamente 30 minutos después), las células que contienen concentraciones más altas de producto etiquetado pueden ser separadas de las que contienen concentraciones más bajas. En el caso del uso de una etiqueta fluorescente, pueden usarse técnicas  
60 de separación celular activada por fluorescencia. Las células madre pueden ser purificadas de entre las otras células de la población de partida sobre la base de la baja dispersión ortogonal de la luz en un citómetro de flujo (identifica las pequeñas células, como los linfocitos) y/o de la luminosidad de fluorescencia. Como se muestra en el Ejemplo que se da más adelante, seleccionando el 1% más luminoso de las células se obtuvo un enriquecimiento de casi 40 veces para células que inician cultivos a largo plazo. Las preparaciones celulares que fueron recuperadas fueron en hasta un 65% células CD34<sup>+</sup>, la mayoría de las cuales eran CD38<sup>-dim</sup> CD71<sup>-dim</sup>. La invención incluye dentro de su alcance  
65 preparaciones celulares que son en más de un 50% células CD34<sup>+</sup>, preferiblemente en más de un 75% células CD34<sup>+</sup>, y más preferiblemente en más de un 90% células CD34<sup>+</sup>.

## ES 2 343 222 T3

Las células madre aisladas tienen aplicación en una variedad de terapias y regímenes diagnósticos. Dichas células madre son adecuadas a efectos tanto de trasplante como de terapia génica. Por ejemplo, el aislamiento de células madre a partir de médula ósea o sangre periférica de pacientes con cáncer puede servir para separar las células madre de las células cancerosas. En los pacientes que se someten a trasplante autólogo, tal separación puede ser usada para reducir la probabilidad de que sean devueltas al paciente células cancerosas. Las células madre autólogas purificadas pueden ser expandidas *ex vivo* para acelerar el injerto de neutrófilos, eritroides y plaquetas tras el trasplante autólogo. La expansión *ex vivo* puede efectuarse mediante crecimiento en citoquinas definidas, sobre capas estromales y/o en biorreactores (Emerson *et al.*, Blood 87:3082 (1996)). Adicionalmente puede ser reducida la incidencia de fracaso del injerto. Esto es beneficioso para los pacientes de cáncer que se someten a trasplante autólogo, para los pacientes que padecen de trastornos autoinmunes, y para los pacientes que se someten a terapia génica.

Los enfoques de terapia génica que implican a las presentes células pueden suponer el aislamiento de células madre autólogas, la exposición de las células aisladas a un vector de aporte de genes y la reinfusión de las células modificadas al interior del paciente (Smith. J. Hematother. 1:155 (1992)). Este enfoque puede suponer el cultivo *ex vivo* o el uso de vectores capaces de transferir genes a células que no se dividen, haciendo con ello innecesario el cultivo *ex vivo*. La terapia génica puede ser útil para tratar por ejemplo enfermedades congénitas tales como la anemia de las células falciformes, en cuyo caso el gen de  $\beta$ -globina mutante es sustituido o suplementado con el gen de globina tipo salvaje o un gen de globina anti-siclaje. En el tratamiento del cáncer pueden introducirse genes de resistencia a fármacos en las células madre para conferir resistencia a fármacos citotóxicos. Esto puede reducir la incidencia y severidad de mielosupresión. Para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo la del HIV, pueden introducirse genes antivirales en las células madre para hacerlas resistentes al virus (Gilboa y Smith. Trends in Genetics 10:139 (1994)).

El aislamiento de células madre redundante en la eliminación de células T que ocasionan la GvHD (GvHD = enfermedad de injerto contra huésped). Puede ser de esperar que esta eliminación reduzca la incidencia y severidad de GvHD en los receptores de trasplantes alogénicos.

Las células madre alogénicas purificadas pueden ser expandidas *ex vivo* para acelerar el injerto de neutrófilos, eritroides y plaquetas tras el trasplante alogénico. Adicionalmente, puede ser reducida la incidencia de fracaso de implante. Esto es probable que sea particularmente importante para los receptores de trasplantes de sangre de cordón umbilical, donde las pequeñas dosis celulares limitan el éxito del trasplante.

También puede ser de esperar que el exitoso injerto con células madre induzca tolerancia. Tal cosa mejoraría claramente el trasplante de órganos sólidos.

Se entenderá que las células pueden ser usadas como fuentes de nuevos genes (p. ej. para citoquinas y receptores de citoquinas), incluyendo a genes que son importantes en el crecimiento y el desarrollo.

Además de su aplicación en estrategias de tratamiento y diagnosis, las células madre pueden ser usadas en protocolos de selección para identificar agentes que puedan ser usados, por ejemplo, para promover la diferenciación o el crecimiento y/o el injerto de células hematopoyéticas. En un protocolo de este tipo se pone a células madre en contacto con un compuesto de ensayo del que se sospeche que induce diferenciación, y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para efectuar diferenciación (usando, por ejemplo, examen microscópico y por citometría de flujo). En otro protocolo de selección, células madre son puestas en contacto con un compuesto de ensayo del que se sospeche que induce proliferación y/o injerto, y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para efectuar proliferación y/o injerto usando ensayos de colonias a largo plazo *in vitro* o modelos de ratones inmunodeficientes *in vivo* (como p. ej. ratones SCID NOD). (Véase Peault *et al.* Leukemia 7:s98-101 (1993)).

Además de lo expuesto anteriormente, el sustrato puede ser usado para identificar tumores que puedan ser resistentes a la ciclofosfamida por medio de la regulación hacia arriba de la actividad de ALDH. De acuerdo con esto, se pueden poner en contacto células del tumor con el sustrato detectable, como p. ej. BAAA, y con inhibidor de la MDR bajo condiciones tales que el sustrato entre en las células y sea convertido ahí en el producto detectable. Las células que se colorean con luminosidad (p. ej. con BAAA) puede ser de esperar que sean resistentes a la ciclofosfamida.

También se describen en la presente invención kits que se pueden utilizar para preparar células. Los kits pueden comprender reactivos (como p. ej. sustrato para ALDH) que puedan ser usados para efectuar el aislamiento de las células madre. El kit puede incluir BAAA dispuesto dentro de unos medios contenedores. El kit puede incluir también, dispuesto dentro de unos medios contenedores, un inhibidor de la MDR, tal como verapamilo.

Se describen más detalladamente en los Experimentos no limitativos que se dan a continuación ciertos aspectos de la presente invención.

## Experimento 1

*Procedimientos Experimentales*5 *Preparación de BODIPY aminoacetaldehído*

El sustrato para aldehído deshidrogenasa es preparado como BODIPY aminoacetal y liofilizado en partes alícuotas de 0,5 micromoles. Estas preparaciones son estables indefinidamente al estar en almacenamiento a -20°C. El acetal es entonces solubilizado en DMSO (DMSO = sulfóxido de dimetilo) hasta una concentración final de 5 mM. Se ha comprobado que esta solución es estable a 4°C por espacio de un periodo de tiempo de hasta 1 semana. Para convertir el acetal en un acetaldehído, partes alícuotas de esta solución son llevadas a una concentración final de HCl 1N. Bajo estas condiciones el acetal tiene una vida media de 15 minutos. Tras 2 horas en HCl 1N, la gran mayoría del BODIPY aminoacetal se ha convertido en BODIPY aminoacetaldehído (BAAA), y es entonces disuelta hasta 200-250 mM en salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco. Este material es añadido directamente a células preparadas en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) con un 2% de FCS (FCS = suero fetal bovino) a concentraciones que van de 1 a 5  $\mu$ M. (Véase también la Fig. 6).

*Reactivos anticuerpos*

Fueron usados anticuerpos fluorescentes directamente conjugados dirigidos contra CD2 (Leu; FITC), CD3 (Leu4; PerCP), CD5 (Leu1; PE), CD7 (Leu9; FITC), CD10 (CALLA; FITC), CD11b (Leu15; PE), CD14 (Leu M3; PE), CD19 (Leu12; FITC), CD33 (LeuM9; PE) CD34 (HPCA2; FITC y PE), CD38 (Leu17; PE), CD56 (Leu19; PE) y HLA-DR (FITC) de la Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS; San Jose, CA). Los Anti-CD7 (3A1; PE) y anti-CD45 (KC56; PE) fueron adquiridos a la Coulter Corporation (Hialeah, FL); anti-CD3 (UCHT1; PE), anti-CD16 (3G8; PE), anti-CD19 (J4.119; PE) así como los anticuerpos anti-CD34 combinados (QBEnd10, Immu-133, Immu-134; PE) de Immunotech, Inc. (Westbrook, ME); anti-CD3 (B-B11; FITC) y CD38 (B-A6; FITC) de la BioSource International (Camarillo, CA); anti-CD45RA (F8-11-13; PE) de la Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL); y anti-CDw90 (5E10; PE) de la PharMingen, Inc. (San Diego, CA).

30 *Líneas celulares*

Células K562, L1210 y L1210/cpa (de la ATCC) fueron mantenidas en suspensión en medios RPMI 1640 suplementados con un 10% de Suero Fetal Bovino (FCS) y  $\beta$ -mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$ M.

35 *Preparación de la Sangre de Cordón Umbilical Humano*

Sangre de cordón umbilical (UCB) humano destinada a la eliminación fue recogida en botellas estériles que contenían tampón de citrato anticoagulante. Las UCB que se usaron en estos estudios fueron procesadas dentro de un periodo de tiempo de 24 horas a partir del momento de haber sido recolectadas. Las células blancas fueron enriquecidas por medio de una aglutinación de células rojas preliminar donde la UCB fue diluida 1:2 con salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco a temperatura ambiente. Estas células fueron entonces llevadas a una concentración final de un 1% de Hespan (DuPont Pharma, Wilmington, DE) y fueron dejadas en reposo por espacio de 1 hora. Las células blancas de la sangre no aglutinadas fueron recolectadas y las células rojas residuales fueron hemolizadas a 37°C en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,17M que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, y EDTA 200 mM. Las células recuperadas fueron lavadas en IMDM que contenía un 2% de FCS, y las células mononucleares son entonces purificadas usando Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml). Al guardarlas durante la noche, las células fueron mantenidas sobre hielo en un recinto refrigerado a 4°C en IMDM con un 20% de FCS.

*Coloración celular y separación celular activada por fluorescencia*

Las células mononucleares de UCB fueron puestas de nuevo en suspensión a razón de  $10^6$  células/ml en IMDM que contenía un 2% de FCS y fueron etiquetadas con BAAA 1  $\mu$ M por espacio de 30 min. Cuando fue usado, el verapamilo fue incluido a una concentración de 50 mM. Tras la coloración, las células fueron lavadas con medios colorantes helados y fueron mantenidas sobre hielo hasta su análisis y clasificación. Las células fueron luego puestas de nuevo en suspensión en medios colorantes con 10 mg/ml de 7-aminoactinomicina D (7AAD) (Molecular Probes; Eugene, OR). Para que la coloración con anticuerpos permitiese análisis de múltiples parámetros, las células fueron puestas de nuevo en suspensión en medios colorantes (100  $\mu$ l) y fueron añadidos directamente anticuerpos a las suspensiones celulares. Las células fueron incubadas sobre hielo por espacio de 20 min. y fueron luego lavadas de nuevo en medios colorantes helados. Las células fueron entonces analizadas o clasificadas en un clasificador de células FACStar Plus (BDIS) equipado con láseres Coherent I-90 duales + un láser de argón-colorante. El BAAA fue excitado a 488 nm y las emisiones fueron detectadas usando filtro 515 DF20 en FL1. Las células muertas y moribundas fueron excluidas sobre la base de su alta emisión en la longitud de onda del rojo lejano debido a su absorción de 7AAD.

Para los análisis de los antígenos de superficie celular en las células anteriormente clasificadas sobre la base de la coloración con BAAA, las células fueron pelletizadas y puestas de nuevo en suspensión en IMDM con un 2% de FCS. Las células fueron entonces mantenidas a 37°C por espacio de 1-2 horas para permitir el flujo. Las células fueron entonces pelletizadas y fueron añadidos directamente a las células anticuerpos conjugados con fluorescencia. A continuación de las incubaciones por espacio de 20 minutos, las células fueron lavadas con PBS/2% de FCS y

fueron fijadas en formaldehído al 1% en PBS/FCS al 2%. En todos los análisis de los marcadores superficiales no se observaron diferencias entre los análisis con células coloreadas simultáneamente con BAAA y con anticuerpos y los análisis llevados a cabo en células clasificadas mediante FACS® que fueron posteriormente coloreadas con anticuerpos.

#### 5 *Ensayos con colonias de progenitoras hematopoyéticas y cultivos a largo plazo*

Células ALDH<sup>br</sup> fueron aisladas directamente a partir de células mononucleares de UCB que habían sido coloreadas con BAAA. Para estos ensayos, la ALDH<sup>br</sup> fue definida como el 1% de la puerta de análisis de linfocitos de la UCB.

10 Los ensayos con colonias de progenitoras hematopoyéticas fueron llevados a cabo poniendo en placas de cultivo 100-200 células en MethoCult H4431 que contenía medio agar acondicionado con leucocitos y eritropoyetina humana recombinante (StemCell Technologies, Inc.). Las células fueron incubadas en una cámara humidificada a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las colonias hematopoyéticas (> 100 células) fueron entonces puntuadas a los 14 a 18 días tras haber  
15 iniciado los cultivos. Los cultivos a largo plazo fueron mantenidos sobre capas estromales de células MS-5 murinas (proporcionadas por el Dr. Tadashi Sudo del Kirin Pharmaceutical Research Laboratory, de Gunma, Japón) (Issaad, Blood 81:2916 (1993)). Las células estromales MS-5 fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) a razón de 5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en DMEM suplementado con un 10% de FCS, y fueron cultivadas a 37°C. Cuando las monocapas se aproximaron al 80% de confluencia, las mismas fueron irradiadas con radiación y desde una fuente de cesio (40 Gy). Tras la irradiación se aportó a los cultivos medio nuevo. Para las células MS-5, el medio de cultivo fue sustituido enteramente por MEM $\alpha$  suplementado con un 10% de FCS, un 10% de suero equino,  $\beta$ -mercaptoetanol y piruvato. Los cultivos a largo plazo fueron iniciados con 400-2000 células progenitoras hematopoyéticas/pocillo y fueron mantenidos a 33°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. A intervalos semanales se retiraba la mitad del medio de cada pocillo para poder rellenar el pocillo con medio. Las células adherentes y no adherentes fueron  
20 recolectadas tras 5 u 8 semanas y cultivadas en placas en ensayos con HPC (HPC = células progenitoras hematopoyéticas) como los descritos anteriormente. Como se muestra en el Ejemplo siguiente, escogiendo el 1% con la mayor luminosidad de las células se obtiene un enriquecimiento de casi 40 veces en células que inician cultivos a largo plazo. Las preparaciones celulares que fueron recuperadas fueron en hasta un 65% células CD34<sup>+</sup>, la mayoría de las cuales eran células CD34<sup>+</sup> que en su mayoría eran CD38<sup>-dim</sup> CD71<sup>-dim</sup>.

#### 30 *Resultados*

##### *Síntesis de BODIPY acetal*

35 Debido a la inestabilidad inherente de los aldehídos en solución acuosa, el reactivo se prepara y se almacena en forma de acetal. Inmediatamente antes de su uso, el acetal es convertido en un aldehído en HCl 1N. El aldehído es libremente soluble en PBS y puede ser añadido directamente a las células preparadas en IMDM con un 2% de suero fetal bovino a razón de 10<sup>6</sup> células por ml. Como aminoacetaldehído, el reactivo es membrano-permeable; si bien en presencia de la aldehído deshidrogenasa (ALDH), la mitad aldehído es convertida en un ácido carboxílico que es  
40 retenido en la célula. La fluorescencia intracelular puede ser usada para seleccionar las células.

##### *El BAAA es un Sustrato Específico para ALDH*

45 Para analizar si el BAAA permitiría la selección específica de células ALDH<sup>+</sup>, los estudios determinaron inicialmente una dosis de respuesta óptima para el reactivo BAAA en una línea celular murina previamente seleccionada por la resistencia a la ciclofosfamida, la L1210/cpa, de la que se sabe que es ALDH<sup>+</sup> (Fig. 1). La línea celular parental, L1210 (Figs. 1A y 1B), es sensible a la ciclofosfamida y ALDH<sup>-</sup>. Esta línea celular presentaba en esencia ausencia de respuesta al BAAA. Adicionalmente se usó un potente inhibidor de la ALDH, que era el dietilbenzaldehído (DEAB), para demostrar la especificidad de la señal de BAAA. Un exceso molar de 10 veces de DEAB bloqueó totalmente  
50 la respuesta fluorescente (Fig. 1C). Por consiguiente, el BAAA fue capaz de detectar las células ALDH<sup>+</sup>. En estos estudios, el BAAA pudo ser usado a una concentración final tan baja como la de 5  $\mu$ M. Esta concentración molar es 10 veces más baja que la usada con el reactivo dansilado.

55 Existe una pluralidad de distintas isoenzimas ALDH, y las mismas pueden presentar distintas capacidades para convertir el BAAA. Se ha sugerido que la resistencia a la ciclofosfamida es primariamente mediada por una isoenzima ALDH específica, que es la ALDH1. Por consiguiente, fue sometida a ensayo con este nuevo reactivo una línea celular humana que es la K562, de la que se sabe que expresa ALDH1. Las células K562 convertían el BAAA y eran positivas para ALDH en estos ensayos. Esta respuesta era enteramente inhibida por el DEAB. Así, el BAAA puede servir de sustrato específico para la ALDH1 humana y puede ser usado para identificar células humanas primarias que  
60 demuestren tener resistencia a la ciclofosfamida.

##### *Las preparaciones de células primarias de UCB contienen subconjuntos de células ALDH<sup>br</sup>*

65 Habiendo demostrado la eficacia de este reactivo en líneas celulares continuas, el BAAA fue sometido a ensayo con células humanas primarias. Fue elegida la Sangre del Cordon Umbilical (UCB) por su creciente promesa como fuente de células madre hematopoyéticas trasplantables. Para estos estudios, la UCB estaba no fraccionada, excepto por haber sido preparada para células mononucleares con Ficoll-Hypaque. Esta separación es significativa por cuanto que son retirados dos tipos de células ALDH<sup>+</sup> maduras, que son los eritrocitos y los megacariocitos. El BAAA fue

sometido a ensayo con células de UCB preparadas en IMDM con un 2% de FCS a razón de  $10^6$  células/ml (Fig. 2). Las células de UCB eran muy respondedoras al reactivo BODIPY, y parecían ser mucho más sensibles de lo que habían sido las líneas celulares continuas. El BAAA fue por consiguiente titrado hasta una concentración óptima de  $1 \mu\text{M}$ . Esta era la mejor concentración para resolver las subpoblaciones ALDH<sup>br</sup>. La respuesta era inhibida en presencia de un exceso de DEAB, y era por consiguiente específica para ALDH. Esta concentración molar es 50 veces más baja que la concentración de dansilo aminoacetaldehído que había sido anteriormente usada para detectar células madre hematopoyéticas pluripotentes murinas.

La emisión de fluorescencia desde células de UCB coloreadas con BAAA presentó una respuesta bimodal. El pico más brillante de emisión de fluorescencia fue atribuido a los monocitos maduros, sugiriendo que los monocitos expresan un nivel uniforme de ALDH. Las células madre hematopoyéticas son células pequeñas no complejas. Efectivamente, las PHSC ALDH<sup>+</sup> murinas fueron primeramente enriquecidas usando elutriación en contracorriente. Por consiguiente, la señal de BODIPY fue examinada solamente en células no complejas que presentaban una baja dispersión ortogonal inherente de la luz (SSC<sup>lo</sup>) (Fig. 3A). La mayoría de las células de UCB SSC<sup>lo</sup> eran ALDH<sup>neg/dim</sup> (Fig. 1B). Esto no era inesperado puesto que las células de SSC<sup>lo</sup> son predominantemente linfocitos, y la mayoría de los linfocitos no expresan ALDH. Sin embargo, una pequeña subpoblación claramente definida de las células de UCB SSC<sup>lo</sup> era ALDH<sup>br</sup> (Fig. 3A).

#### *El BODIPY aminoacetato es un sustrato para la Bomba de eflujo de MDR*

Además de expresar ALDH, las PHSC deberían también expresar altos niveles de la P-glicoproteína o bomba de eflujo de multirresistencia a fármacos (MDR). Puesto que este reactivo nunca había sido anteriormente caracterizado, fue sometida a ensayo la susceptibilidad del BAAA al eflujo de MDR. A pesar de que el BODIPY aminoacetaldehído pasa a través de la membrana celular sin transporte activo, el producto de la conversión con ALDH (BODIPY aminoacetato) bien podría ser un sustrato para la bomba de MDR. Para investigar esta posibilidad, células de UCB fueron coloreadas con BAAA en presencia de verapamilo  $50 \mu\text{M}$ , que es un inhibidor competitivo de la bomba de eflujo de MDR. Las células tratadas con verapamilo presentaron una fluorescencia coherentemente más alta en comparación con las células coloreadas con BAAA que no habían sido tratadas simultáneamente con verapamilo (Fig. 2). Una población sustancial de células ALDH<sup>dim</sup> fue afectada por el tratamiento con verapamilo. Lo más importante era que el porcentaje de células ALDH<sup>br</sup> aumentaba en 1,8 veces en presencia de verapamilo. En las células tratadas con verapamilo, la subpoblación ALDH<sup>br</sup> era equivalente a un  $0,8 \pm \%$  de las células de SSC<sup>lo</sup>. En contraste con ello, en las preparaciones celulares que no recibieron verapamilo la misma intensidad de fluorescencia representaba solamente un  $0,46 \pm \%$  de las células de SSC<sup>lo</sup>. Esto indicaba que las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> retienen el BAAA convertido más eficazmente si es inhibida la actividad de eflujo de la bomba de MDR.

#### *Las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> son altamente enriquecidas en células CD34<sup>+</sup> primitivas*

Con tratamiento con verapamilo, las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> contenían casi un 90% de células CD34<sup>+</sup>, lo que indicaba que están presentes al menos algunas progenitoras hematopoyéticas (Fig. 3D). Sin embargo, el CD34 es expresado por una amplia gama de progenitoras hematopoyéticas que incluye células comprometidas al linaje, así como progenitoras pluripotentes. Por consiguiente, fue analizado el potencial de desarrollo de las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup>. Inicialmente fue más cuidadosamente definido el inmunofenotipo de estas células. El inmunofenotipo no sería en modo alguno concluyente; si bien el primitivismo de la población celular podía inferirse examinando dos marcadores de activación que van típicamente asociados a la diferenciación de células primitivas a células hematopoyéticas más comprometidas al linaje, como son las CD38 y CD71. Los subconjuntos más primitivos de células CD34<sup>+</sup> tienen de poca a ninguna expresión de los antígenos de activación CD38 o CD71. En las preparaciones de células de UCB con BAAA y con anticuerpos específicos para CD34 y CD38, las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> proporcionaron un enriquecimiento en un solo paso en células CD34<sup>br</sup> CD38<sup>dim</sup> esencialmente purificadas. Además, cuando las células de UCB CD34<sup>+</sup> fueron examinadas independientemente, la expresión de ALDH era inversamente proporcional a la expresión tanto de CD38 como de CD71 (Fig. 4A y 4B). Así, las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> parecen contener las células CD34 primitivas como las definidas por el inmunofenotipo.

Para someter a ensayo el potencial de desarrollo de las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup>, estas células fueron aisladas y puestas en ensayos tanto a corto plazo como a largo plazo para progenitoras mieloeritroides. El ensayo a corto plazo que se usó, que era el ensayo de colonias de progenitoras hematopoyéticas (HPCA), cuantifica las células comprometidas al linaje en el punto en el tiempo del aislamiento inicial. Fueron también sometidas a ensayo progenitoras más primitivas manteniendo las células de UCB SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> sobre estroma por espacio de 5 u 8 semanas antes de llevar a cabo el HPCA (Fig. 5).

#### *Resultados*

HPCA-ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> esencialmente equivalente a las células CD34<sup>+</sup>.

LTC-5 sem-ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> esencialmente equivalente a las células CD34<sup>+</sup>.

LTC-8 sem-ALDH<sup>br</sup> SSC<sup>lo</sup> sobrepasa el rendimiento de células CD34<sup>+</sup>.

## ES 2 343 222 T3

### Experimento 2

Se ha demostrado que las células de UCB ALDH<sup>br</sup> son predominantemente CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-/lo</sup> y están altamente enriquecidas en progenitoras mieloides iniciales. El presente estudio fue llevado a cabo para determinar si las células de UCB CD34<sup>+</sup> ALDH<sup>br</sup> eran asimismo enriquecidas en progenitoras linfoides. En 3 experimentos se establecieron cultivos de células de UCB CD34<sup>+</sup> ALDH<sup>br</sup> sobre células estromales AFT024 en presencia de ligando Kit, ligando Flt3, IL-3 (sólo el 1<sup>er</sup> día), IL-2 e IL-7 en varias diluciones. Después de 7-8 semanas, los cultivos fueron analizados para determinar el crecimiento de linfocitos según determina la expresión de CD56, CD10, CD19 o CD20.

Tabla 1

células ALDH <sup>br</sup> /pocillo	total pocillos iniciados	pocillos con células viables	pocillos linfocito
1000	6	5	5
250	16	12	12
62	48	40	40
16	48	34	34
10	24	20	17

Los cultivos de AFT024 primariamente favorecieron el crecimiento de presuntas células NK, por lo que para someter más eficazmente a ensayo si las células de UCB CD34<sup>+</sup> ALDH<sup>br</sup> contenían progenitoras B-linfoides, las mismas fueron cultivadas sobre la línea celular estromal W20 suplementada con la misma combinación de citoquinas. De 12 cultivos establecidos con 100 células CD34<sup>+</sup> ALDH<sup>br</sup>, todos produjeron células CD56<sup>-</sup> y CD10<sup>-</sup> en proporciones casi equivalentes. 2 de los 12 pocillos también contenían células CD19<sup>+</sup>.

En resumen, la población de células de UCB CD34<sup>+</sup> ALDH<sup>br</sup> parece estar altamente enriquecida en progenitoras hematopoyéticas tanto mieloides como linfoides.

A la luz de la lectura de esta exposición un experto en la materia apreciará que pueden hacerse varios cambios en la forma y en el detalle.

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

### Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- JONES. *Blood*, 1995, vol. 85, 2742 [0003]
- JONES *et al.* *Blood*, 1996, vol. 88, 487 [0003]
- EMERSON *et al.* *Blood*, 1996, vol. 87, 3082 [0015]
- SMITH. J. *Hematother.*, 1992, vol. 1, 155 [0016]
- GILBOA; SMITH. *Trends in Genetics*, 1994, vol. 10, 139 [0016]
- PEAULT *et al.* *Leukemia*, 1993, vol. 7, 98-101 [0021]
- ISSAAD. *Blood*, 1993, vol. 81, 2916 [0032].

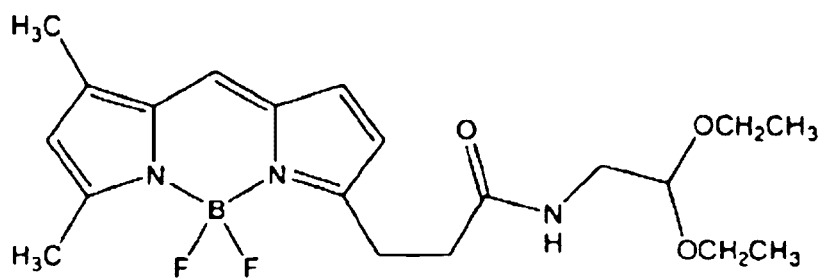
## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula

5

10

15



20

que es BODIPY aminoacetaldehído dietil acetal.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

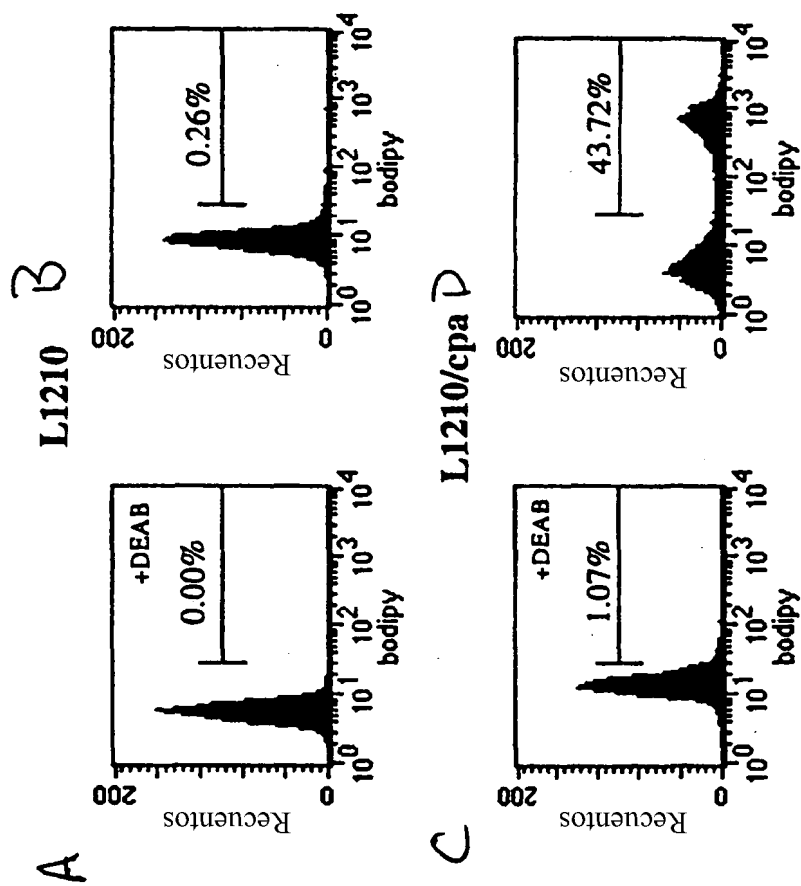


Figura 1. La coloración con BAAA identifica las células con altos niveles de actividad de ALDH. La L1210/cpa es una derivada de la línea celular leucémica L1210 que sobreexpresa ALDH.

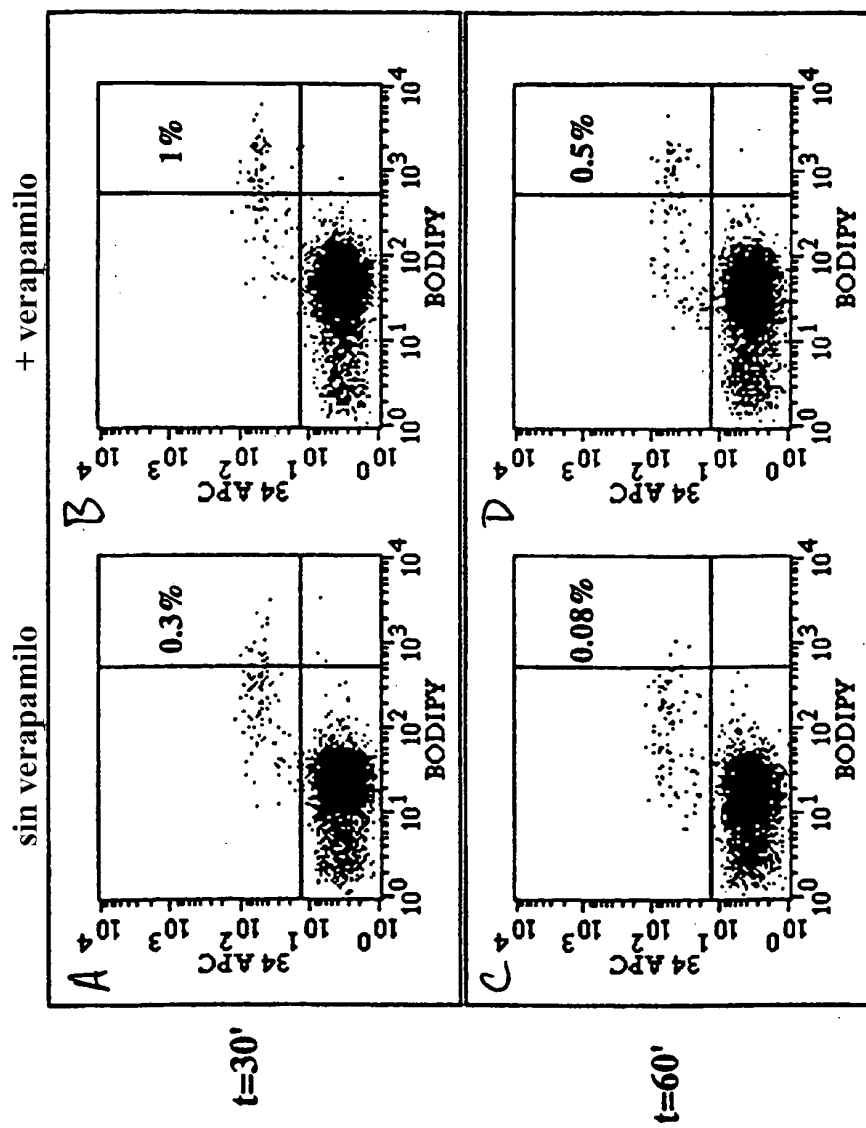


Figura 2. La evacuación de BAA es bloqueada por el verapamilo, que es un inhibidor de la MDR.

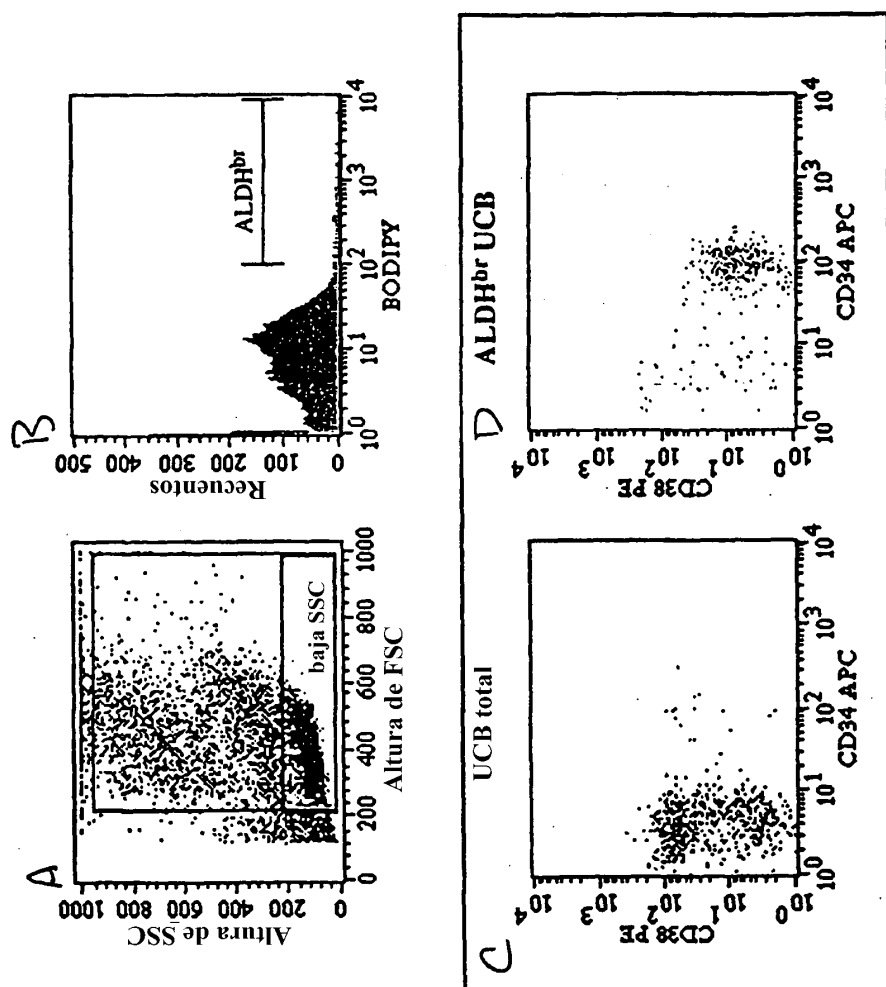


Figura 3. Las células ALDH<sup>br</sup> (es decir, las células con propiedades de baja dispersión lateral de luz (SSC) que se colorean con luminosidad con BAAA en presencia de un inhibidor de la MDR) son enriquecidas en células con el inmunofenotipo CD34+CD38lo/- primitivo.

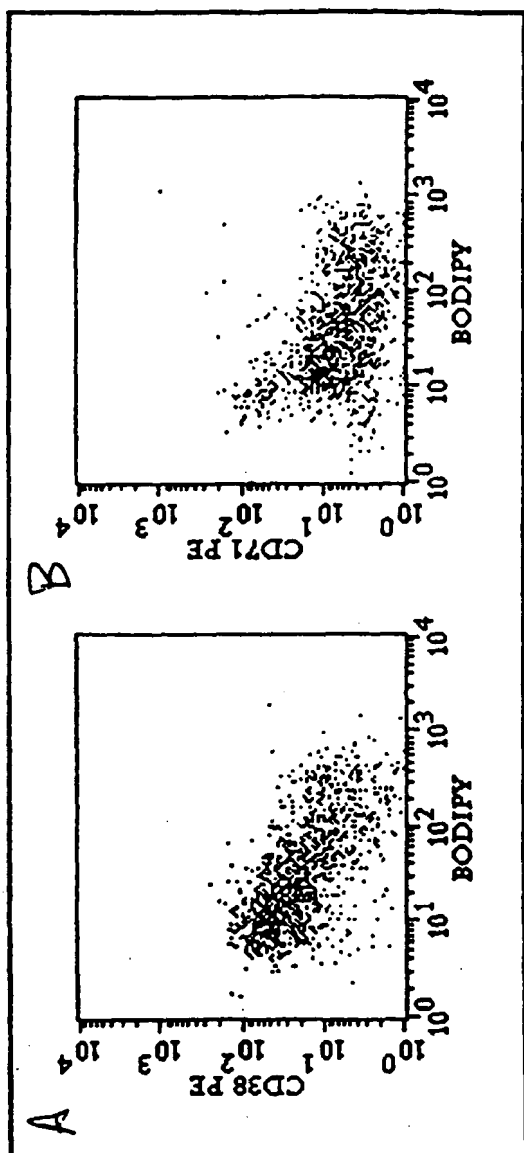


Figura 4. La intensidad de coloración con BAAA está en correlación inversa con la expresión de CD38 y CD71 en las células CD34+.

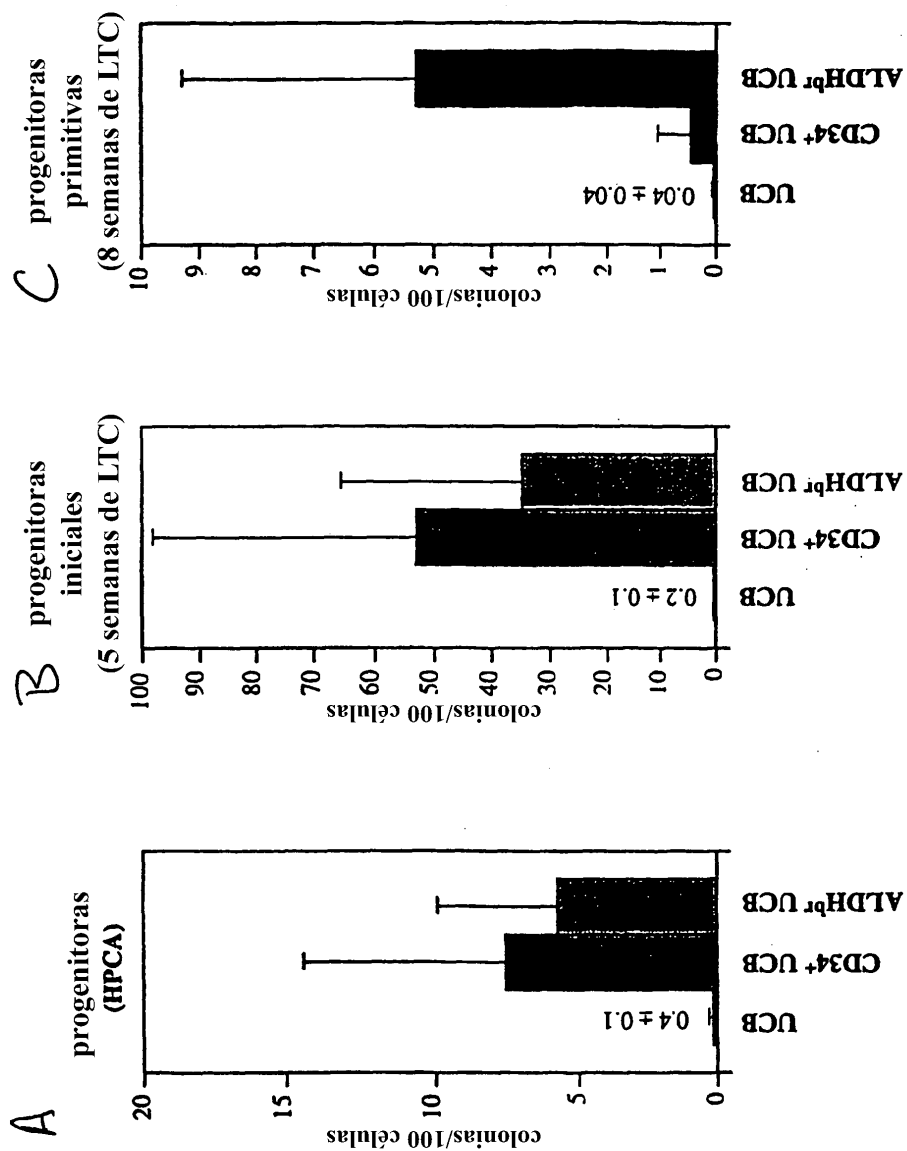
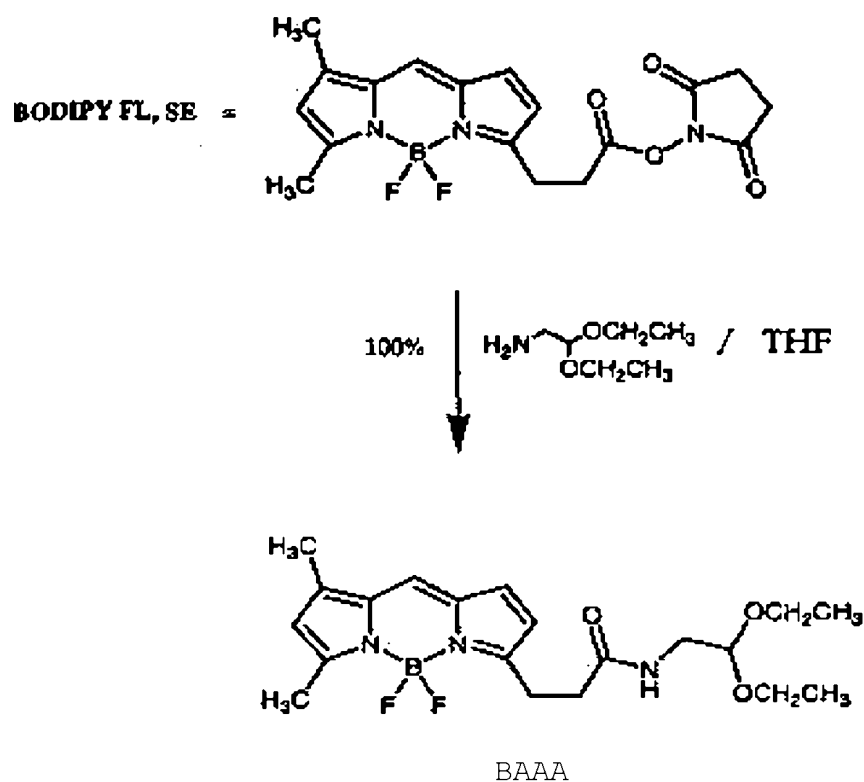


Figura 5. Las células ALDH<sup>br</sup> son enriquecidas en progenitoras iniciales equivalentes a células CD34<sup>+</sup> y son más enriquecidas en progenitoras muy primitivas que las células CD34<sup>+</sup>.



Usando un vial de ámbar, una solución de aminooctaldehído dietilacetal (0,019 mmoles, Aldrich Chemical Co.) en tetrahidrofurano seco (THF, 0,5 ml) fue añadida gota a gota a una solución de BODIPY FL, SE (0,013 mmoles, Molecular Probes) en THF seco (0,5 ml). Una vez concluida la adición, el vial fue tapado y la mezcla de reacción fue agitada por espacio de 30 min. El THF fue evaporado y el residuo fue disuelto en cloruro de metileno mínimo y fue luego cromatografiado en gel de sílice usando acetato de etilo - hexano (1:1) como eluyente. El producto, BODIPY-aminooctaldehído dietilacetal, fue recuperado en rendimiento cuantitativo e identificado mediante NMR protónica.

Fig. 6