



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 860**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02716567 .9**
96 Fecha de presentación : **26.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1372716**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Producción de células sanguíneas mediante la activación de CD163.**

30 Prioridad: **26.03.2001 US 278453 P**
21.12.2001 US 341793 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2009

73 Titular/es: **Therapure Biopharma Inc.**
2585 Meadowpine Blvd.
Mississauga ON L5N 8H9, CA

72 Inventor/es: **Mueller, Susan, G.;**
Bell, David y
Matthews, Kathryn, Emma

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 320 860 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

Producción de células sanguíneas mediante la activación de CD163.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a unos procedimientos y composiciones destinadas a la estimulación del crecimiento, proliferación, diferenciación y/o movilización de células madre que conducen a la producción de células sanguíneas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la proliferación de la hematopoyesis, incluyendo la estimulación de la eritropoyesis y la mielopoyesis, a través de la estimulación de las células madre, y de las células progenitoras eritroides y mieloides, respectivamente.

Antecedentes de la invención

Recientemente se ha identificado un receptor depurador de la hemoglobina en monocitos y macrófagos (Kristiansen, 2001). Este receptor depura la hemoglobina a través de la mediación de la endocitosis de complejos de haptoglobina-hemoglobina. Este receptor también se ha identificado como M130/CD163, una proteína transmembrana de fase regulada aguda sobre la que se ha informado que se expresa exclusivamente en monocitos y macrófagos. El CD163 pertenece a la superfamilia del receptor depurador del grupo B rico en cisterna, una familia de receptores que incluye el CD5, CD6 y WC1 que están presentes en los linfocitos B, T y T CD4⁺8⁺γδ, respectivamente. Los complejos de hemoglobina y haptoglobina multimérica presentan una afinidad funcional más elevada para el CD163 que los complejos de hemoglobina y haptoglobina dimérica.

Los estudios previos sobre el entrecruzamiento mediado por el anticuerpo del CD163 en cultivos de monocitos han demostrado que la ligación del CD163 de superficie induce unas señales dependientes de tirosina quinasa que da como resultado la movilización del calcio intracelular, la producción de inositol trifosfato y el incremento de la secreción de citoquinas antiinflamatorias, incluyendo la interleucina 6 (IL-6) y el factor de estimulación de la colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF) (van den Heuvel *et al.*, 1999).

La hematopoyesis se define como la producción y el desarrollo de las células madre, incluyendo los eritrocitos, granulocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, megacariocitos, linfocitos B y linfocitos T (Wintrobe, 1999). La hematopoyesis ocurre como resultado de la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas son células pluripotentes que pueden dar origen a las múltiples líneas celulares que se encuentran en la sangre. Las células madre hematopoyéticas se encuentran en la médula ósea y su crecimiento, proliferación y diferenciación se ven influidos tanto por factores de crecimiento hematopoyético como por las células estromales en el interior de la médula ósea. Se cree que las células madre se encuentran normalmente en un estado quiescente de no división hasta que son estimuladas por factores específicos de crecimiento después de lo cual se dividen y dan origen a células progenitoras altamente proliferativas que se dedican a la producción de células sanguíneas de una o más líneas, tales como líneas eritroide, mieloides o linfoides.

Algunos trastornos clínicos, denominados citopenias, se caracterizan por el nivel disminuido de un tipo específico de célula en la sangre circulante. Por ejemplo, la neutropenia es un trastorno en el que existe un nivel reducido de neutrófilos circulantes. Este trastorno se puede tratar con el GM-CSF o el G-CSF, dos factores de crecimiento hematopoyético distintos. Sin embargo, la administración de estos factores de crecimiento se asocia a menudo con una elevada incidencia de efectos secundarios adversos. Por ejemplo, la administración de G-CSF después de un trasplante alógeno de médula ósea puede dar como resultado una disnea, dolor torácico, náuseas, hipoxia, diaforesis, anafilaxis, síncope y enrojecimiento. (Khoury *et al.*, 2000).

La neutropenia también se asocia al SIDA y actualmente se trata con factores de crecimiento (Dubreuil-Lemaire *et al.*, 2000). Asimismo, existen formas de neutropenia congénita severa (Dale *et al.*, 2000) en el que un pequeño porcentaje de los pacientes son resistentes a la administración de factores de crecimiento.

La anemia es la consecuencia patológica de la insuficiencia de hemoglobina para satisfacer los requerimientos de transporte de oxígeno del cuerpo. Históricamente, algunas anemias se han tratado con transfusiones de sangre o de hematíes. La existencia de varias complicaciones asociadas a las transfusiones hace que este tratamiento no sea deseable, incluyendo reacciones hemolíticas, febriles o alérgicas, junto con el riesgo potencial de la transmisión de enfermedades. Para el tratamiento de la anemia, es deseable la estimulación del crecimiento y el desarrollo de las células eritroides (eritropoyesis). Existen varias causas que provocan la anemia, que incluyen la pérdida excesiva de sangre, el aumento de destrucción de glóbulos rojos, disminución de la síntesis de glóbulos rojos y una producción anormal de hemoglobina. La disminución de la producción de glóbulos rojos puede ser debida a una deficiencia de hierro (en la dieta, absorción deficiente del tracto gastrointestinal, transporte o utilización ineficaz del hierro para desarrollar glóbulos rojos), a una producción insuficiente de eritropoyetinas (Epo) (insuficiencia renal) o colapso de la médula ósea. Como la actividad eritropoyética de la médula ósea está a salvo de anemias dependientes de hierro y Epo, estas anemias son susceptibles de ser tratadas con terapias de hierro y Epo, respectivamente.

La anemia debida a las deficiencias de hierro se trata normalmente mediante la administración oral o intravenosa de hierro. Los pacientes con insuficiencia renal crónica padecen generalmente anemias dependientes de Epo debido a la incapacidad de los riñones de producir Epo. Estos pacientes se someten a diálisis y el 90% son clínicamente

anémicos. El tratamiento tradicional para la anemia en pacientes sometidos a diálisis que consiste en múltiples transfusiones de sangre se ha sustituido ampliamente por la administración de Epo. De hecho, ~ 88% de todos los pacientes sometidos a diálisis son tratados con Epo. Un tercio de los pacientes tratados con Epo desarrollan hipertensión, que se puede corregir generalmente con fármacos de antihipertensivos. La Epo estimula a las progenitoras eritroides para diferenciarlas en glóbulos rojos maduros y sintetizar la hemoglobina, la proteína principal de los glóbulos rojos.

El principal factor limitante de la terapia con Epo es el coste de un tratamiento de larga duración. La dosis típica de Epo para los pacientes con insuficiencia renal crónica es de 225 unidades/kg/semana administrada en tres dosis. El reembolso del sistema sanitario para el tratamiento con Epo en EE.UU es de 10,00 dólares por 1.000 unidades, por consiguiente, el coste habitual para un paciente de 70 kg de peso será de \$8.000 anualmente. En 1995, 175.000 pacientes norteamericanos se sometieron a diálisis dando como resultado un valor de mercado por encima de ~\$883 millones sólo para esta indicación. Se estima que el coste de esta terapia será de ~\$1,1 miles de millones en 1996. Por consiguiente, sería beneficioso para el paciente y para el sistema de asistencia sanitaria encontrar nuevas terapias que reduzcan la necesidad de la Epo para el tratamiento de la anemia. El descubrimiento de otros agentes capaces de reducir los requerimientos de Epo para el tratamiento de anemias dependientes de Epo sería ventajoso.

Además, existen varios tipos de anemias que no responden a la terapia con Epo. Ejemplos de estos tipos de anemia incluyen la anemia inducida por la quimioterapia y la anemia por enfermedad crónica, incluyendo las malignas. Los pacientes con inmunodeficiencia adquirida también pueden padecer anemia, como ocurre con pacientes con SIDA que son tratados con AZT. Estos tipos de anemia pueden ser debidos a una eritropoyesis ineficaz como resultado o bien de una supresión de la producción de Epo, o bien de una disminución de la respuesta de la médula ósea a la Epo. El tratamiento de estos tipos de anemia implica el tratamiento del trastorno primario; sin embargo, si el trastorno primario no se puede tratar fácilmente, entonces la terapia para la anemia puede incluir transfusiones de glóbulos rojos. Los efectos secundarios adversos de la transfusiones reacciones hemolíticas agudas y retardadas y el riesgo potencial de enfermedades transmisibles de las transfusiones.

En vista de lo expuesto anteriormente, existe la necesidad en la técnica de desarrollar procedimientos mejorados para aumentar el número de glóbulos rojos en un paciente a través de la estimulación de la hematopoyesis.

Sumario de la invención

Los inventores de la presente invención han determinado que la activación del receptor depurador de la hemoglobina CD163, puede estimular el crecimiento, proliferación y diferenciación de los progenitores tanto eritroides como mieloides, conduciendo a un incremento de la producción de glóbulos rojos. Los inventores también han demostrado que el CD163 se expresa por las células madre hematopoyéticas CD34⁺.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la estimulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre capaz de expresar el receptor CD163, o de responder a la vía de transducción de señal estimulada por el receptor, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una sustancia que puede activar el CD163 en la célula madre, de una célula o de un animal que lo necesite.

La presente invención proporciona asimismo un procedimiento para la estimulación de la hematopoyesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 de una célula o de un animal que lo necesite.

La presente invención proporciona asimismo un procedimiento para la estimulación de la eritropoyesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 de una célula o de un animal que lo necesite.

La presente invención proporciona asimismo un procedimiento para la estimulación de la mielopoyesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 de una célula o de un animal que lo necesite.

La presente invención asimismo incluye unas composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 mezclado con un diluyente o un vehículo adecuado.

La presente invención proporciona asimismo un aditivo para el cultivo de células útil para potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células madre y/o progenitoras que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163.

La presente invención proporciona asimismo un procedimiento para la selección de células madre o progenitoras en una muestra que comprende (a) el contacto de la muestra con un anticuerpo que puede unir el CD163 y (b) la selección de células que están unidas a la sustancia.

Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indican formas preferidas de realización de la invención se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

Breve descripción de la figuras

A continuación, se describirá la invención en relación con las figuras en las que:

La Figura 1 es un análisis Western blot de la células CD34+ utilizando un anticuerpo anti-CD163.

La Figura 2 muestra el efecto de un anticuerpo en el CD163 en ensayos de formación de colonias hematopoyéticas.

La Figura 3 muestra que la inmunoreactividad del CD163 es detectable en las células lisadas preparadas a partir de las colonias BFU-E.

Descripción detallada de la invención*I. Procedimientos de la Invención*

Tal como se ha mencionado anteriormente, los inventores presentes han demostrado que las células madre CD34⁺ expresan el receptor depurador de la hemoglobina CD163. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la estimulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 en la célula madre para una célula o un animal que lo necesite. La presente invención también proporciona una utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 para estimular el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre. La presente invención proporciona además una utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 para preparar un medicamento que estimula el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre.

La expresión “anticuerpo que puede activar el CD163” tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los anticuerpos que se pueden unir, entrecruzar o ligar al receptor CD163 depurador de la hemoglobina o un receptor relacionado con el CD163 en las células y que da como resultado la estimulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de la célula.

La expresión “estimular el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre” tal como se utiliza en la presente memoria significa que el anticuerpo puede estimular o aumentar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre en comparación con el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre en ausencia del anticuerpo.

La expresión “cantidad eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria significa una cantidad eficaz y en dosis y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado (por ejemplo, la estimulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células madre, de células progenitoras eritroides y/o mieloides y/o la estimulación de la hematopoyesis, la eritropoyesis o la mielopoyesis).

El término “animal” tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal y es preferentemente un humano. La administración de una sustancia a un animal incluye tanto las administraciones *in vivo* como *ex vivo*.

La expresión “una célula” tal como se utiliza en la presente memoria incluye una sola célula así como varias o una población de células. La administración de una sustancia a una célula incluye tanto las administraciones *in vivo* como *ex vivo*.

La expresión “célula madre” tal como se utiliza en la presente memoria significa que una célula que es capaz de diferenciarse en cualquier célula en un animal incluyendo las células hematopoyéticas. La célula madre expresará o será capaz de expresar el receptor CD163 o de responder a la vía de transducción de señal estimulada por el receptor.

Preferentemente, la célula madre es una célula madre CD34⁺. Las células CD34⁺ se consideran tradicionalmente células “madre” en el sentido de que son capaces tanto de autorenovarse como de autorepoblarse en un individuo con células de todas las líneas hematopoyéticas. Las células CD34⁺ se definen más tarde en subpoblaciones mediante la coexpresión de otros marcadores, tales como el CD38, y la capacidad de estas subpoblaciones de reinjertarse y volver a repoblar el sistema hematopoyético (por ejemplo, Henon *et. al.*, 2001).

La estimulación de las células madre puede facilitar la movilización de las células de los sitios extravasculares de la médula para hacer circular la sangre que se requiere para los protocolos que utilizan donantes de sangre periférica para trasplantes autólogos o heterólogos. El recombinante humano G-CSF se utiliza ampliamente para movilizar las células madre CD34⁺ (para revisión, véase Korbling, 1998). Tal como los inventores han demostrado, la expresión del CD163 por parte de las células CD34⁺, es posible que la estimulación de la vía del CD163 en dichas células da como resultado su crecimiento y su proliferación y la posible movilización en la sangre periférica. La utilización de los estimuladores del CD163 (por ejemplo, un anticuerpo de entrecruzamiento) en lugar de, o conjuntamente con unas cantidades reducidas de, G-CSF puede dar como resultado la movilización de células madre transplantables sin los efectos secundarios que se asociarán con la administración de citoquina.

Los inventores han demostrado que la activación de la vía del CD163 puede ser útil para la estimulación de la hematopoyesis de múltiples líneas al mostrar que las células progenitoras tanto eritroides como mieloides se pueden estimular mediante la activación del CD163. La estimulación de la hematopoyesis es útil para generar tanto células sanguíneas como células del sistema inmunológico incluyendo los eritrocitos y las células mieloides (tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos y megacariocitos) y las células linfoides (células B, células T y células NK), así como las células dendríticas de origen tanto mieloides como linfoides.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la estimulación de la hematopoyesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de una sustancia que puede activar el CD163 en una célula o en un animal que lo necesite. La presente invención también proporciona la utilización de una cantidad eficaz de una sustancia que puede activar el CD163 para estimular la hematopoyesis. Además, la presente invención proporciona la utilización de una cantidad eficaz de una sustancia que puede activar el CD163 para preparar un medicamento para estimular la hematopoyesis.

La estimulación de la hematopoyesis es útil para el tratamiento de una amplia variedad de afecciones, incluyendo las citopenias así como para estimular el desarrollo de células sanguíneas para su utilización en trasplantes o para estimular las células del sistema inmunitario para su utilización en tratamientos de inmunodeficiencias.

La frase “estimular la hematopoyesis” tal como se utiliza en la presente memoria significa que la sustancia puede estimular o potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética (como una progenitora eritroide, mieloides o linfoides) en comparación con el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora en ausencia de la sustancia.

Un experto en la materia puede determinar si la sustancia que puede activar el CD163 puede estimular la hematopoyesis o no. Por ejemplo, el ensayo de formación de colonias es un procedimiento para cuantificar las células madre hematopoyéticas y progenitoras (McCulloch, 1984). En el ensayo de formación de colonias, las células se siembran en un medio semisólido como metilcelulosa en presencia de varias citoquinas que favorecen el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las células hematopoyéticas progenitoras. Los tipos de colonias hematopoyéticas que se forman incluyen: unidad formadora de estallido de la serie eritroide (BFU-E), unidades formadoras de colonias -eritroide (CFU-E), unidades formadoras de colonias de granulocitos y de macrófagos (CFU-GM), unidad formadora de colonias de macrófagos (CFU-M), unidades formadoras de colonias de megacariocito (CFU-Meg) y colonias de granulocito, monocito y megacariocito (GEMM). En los ensayos semisólidos, las células madre o progenitoras responden a varias citoquinas y varias combinaciones de estas citoquinas se han optimizado para el crecimiento y diferenciación de los progenitores eritroides (por ejemplo, IL-3 en combinación con EPO) o colonias granulopoyéticas/monocito (por ejemplo, IL-1 β , IL-6 y SCF). Se necesitan algunas combinaciones para enumerar tanto las colonias mieloides como las eritroides independientemente, además de la enumeración de colonias “mezcladas” más primitivas (por ejemplo, aquellas que incluyen o bien G-SCF y GM-CSF, para la revisión ver Messner, 1991, 7: 18-22). Cada célula madre o célula progenitora prolifera y se diferencia para formar una colonia morfológicamente diferente. Los dos tipos de progenitores eritroides funcionalmente diferentes (BFU-E y CFU-E) se identifican en base a sus capacidades de formar colonias morfológicamente reconocibles cuando se hacen crecer en un medio semisólido. La BFU-E representa el progenitor eritroide más primitivo y forma unas colonias con varios grupos, hemoglobinizados. La CFU-E es un progenitor eritroide más diferenciado que forma unas colonias más pequeñas, hemoglobinizadas. La BFU-E es el progenitor más tempranamente identificable completamente implicado en la eritropoyesis y presenta mayor capacidad para la auto-renovación que la CFU-E más madura. Para desarrollarse, las colonias progenitoras eritroides generalmente requieren la presencia de eritropoyetina (Epo) en el medio. Sin embargo, los progenitores eritroides primitivos proliferan de un modo Epo-independiente.

Al mismo tiempo que proporcionan un medio para cuantificar las células madre hematopoyéticas y progenitoras, el ensayo de formación de colonias proporciona asimismo un medio para obtener información acerca de los factores que afectan la proliferación y diferenciación de la progenie de células madre y células progenitoras. Por ejemplo, las colonias progenitoras eritroides surgen de una célula progenitora única que se divide y se diferencia de modo que la colonia madura está compuesta predominantemente de eritroblastos hemoglobinizados. Morfológicamente, el tamaño de una colonia eritroide puede proporcionar información acerca de la velocidad o la extensión de la proliferación de la progenie del progenitor eritroide. También, una colonia eritroide más roja puede sugerir un contenido mayor de hemoglobina, y un grado posiblemente mayor de diferenciación de los eritroblastos.

Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han mostrado que la activación de CD163 incrementa la proliferación y diferenciación de las células eritroides. Por consiguiente, en otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la estimulación de la eritropoyesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de una sustancia que puede activar CD163 en una célula o un animal que lo necesita. La presente invención proporciona también la utilización de una cantidad eficaz que puede activar CD163 para estimular la eritropoyesis. La presente invención proporciona también la utilización de una cantidad eficaz de una sustancia que puede activar CD163 para preparar un medicamento que estimula la eritropoyesis.

La frase “estimula la eritropoyesis” como se utiliza en la presente memoria significa que el anticuerpo puede estimular o potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula eritroide o una célula progenitora eritroide o célula madre cuando se compara al crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la

movilización de una célula eritroide o una célula progenitora eritroide o célula madre en ausencia del anticuerpo. Un experto en la materia puede determinar si el anticuerpo que puede activar CD163 puede estimular o no la eritropoyesis. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo de formación de colonias descrito anteriormente y en los ejemplos.

5 La estimulación de la eritropoyesis resulta útil para el tratamiento de la anemia. Por consiguiente, en una forma de realización específica, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de la anemia que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 en una célula o animal que lo necesitan. La presente invención puede proporcionar además la utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 para tratar la anemia. La presente invención puede proporcionar además la utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 para preparar un medicamento para tratar la anemia.

Los inventores han mostrado asimismo que la activación de CD163 incrementa la proliferación de las células mieloides. Por consiguiente, en otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la estimulación de la mielopoyesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 en una célula o animal que lo necesita. La presente invención proporciona también una utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 para estimular mielopoyesis. La presente invención proporciona asimismo la utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 para preparar un medicamento que estimula la mielopoyesis.

20 La frase “estimula la mielopoyesis” como se utiliza en la presente memoria significa que el anticuerpo puede estimular o potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula mielóide o una célula progenitora mielóide o célula madre cuando se compara al crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de una célula mielóide o una célula progenitora mielóide o célula madre en ausencia del anticuerpo. Un experto en la materia puede determinar si el anticuerpo que puede activar CD163 puede estimular o no la eritropoyesis. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo de formación de colonias descrito anteriormente y en los ejemplos.

La estimulación del crecimiento, de la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de las células mieloides se puede utilizar para tratar las neutropenias. La estimulación de las células mieloides mediante la activación de CD163 del patrón de CD163 puede sustituir/aumentar la efectividad de los factores de crecimiento en la superación de las neutropenias asociadas a los trasplantes de médula ósea con el beneficio añadido de unos efectos secundarios más leves. El procedimiento se puede utilizar adicionalmente para tratar las neutropenias asociadas al SIDA o las neutropenias congénitas severas. Por consiguiente, en una forma de realización específica, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de la neutropenia que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 en una célula o un animal que lo necesita. La presente invención proporciona también la utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 para tratar la neutropenia. La presente invención proporciona asimismo la utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163 para preparar un medicamento para tratar la neutropenia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, y como se entiende bien en la técnica, “tratar” o “tratamiento” es un enfoque para obtener unos resultados beneficiosos o deseados, que incluye los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o manifestaciones, disminución de la extensión de la enfermedad, un estado estabilizado (es decir no empeoramiento) de la enfermedad, la prevención de la diseminación de la enfermedad, retraso o enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de una enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” puede significar también una supervivencia prolongada cuando se compara con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento.

II. Anticuerpos que activan CD163

50 La presente invención incluye la utilización de unos anticuerpos antiCD163.

(a) Anticuerpos

Los anticuerpos frente CD163 pueden proceder de fuentes comerciales fácilmente disponibles de Serotec Inc, o Maine Biotechnology Services. Además, un experto en la materia puede preparar fácilmente unoa anticuerpos frente a CD163 utilizando unos procedimientos conocidos en la técnica como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 1975, 256:495 y en las patentes US nº RE 32.011; nº 4.902.614; nº 4.543.439 y nº 4.411.993, que se incorporan a la presente memoria como referencia. (ver también Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, y Bechtol (eds.), 1980 y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, que también se incorpora a la presente memoria como referencia).

Por ejemplo, mediante la utilización de CD163, los antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales se puede preparar utilizando los procedimientos estándar. Un mamífero (por ejemplo, un ratón, un hámster o un conejo) se pueden inmunizar con una forma inmunogénica del péptido que obtiene una respuesta del anticuerpo en el mamífero. Las técnicas que confieren inmunogenicidad en un péptido incluyen la conjugación a vehículos u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteína o péptido se pueden administrar en presencia de un adyuvante. El progreso de la inmunización se puede monitorizar mediante la detección de los títulos de los anticuerpos plasmáticos o

séricos. Los procedimientos de ELISA estándar u otros de inmunoensayo se pueden utilizar con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Después de la inmunización, se puede obtener el antisuero y, si se desea, los anticuerpos se aíslan del suero.

Para producir los anticuerpos monoclonales, las células que producen anticuerpos (linfocitos) se pueden extraer de un animal inmunizado y se fusionan con unas células de mieloma mediante los procedimientos de la fusión de células somáticas estándares inmortalizando de este modo estas células y produciendo las células de hibridoma. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica, (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originariamente por Kohler y Milstein (Nature 256, 495-497 (1975)) así como otras técnicas como el procedimiento de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, Immunol. Today 4, 72 (1983)), la técnica EBV-hibridona para producir los anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., páginas 77-96), y el cribado de las bibliotecas de anticuerpos combinatorios (Huse *et al.*, Science 246, 1275 (1989)). Las células de hibridoma se puede cribar inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con el péptido y se pueden aislar los anticuerpos monoclonales.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir sus fragmentos que también reaccionan específicamente con CD163, o su péptido. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando las técnicas convencionales y los fragmentos se criban para la utilidad del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden generar mediante el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir los fragmentos Fab'.

Los derivados de anticuerpo quimérico, es decir, las moléculas de anticuerpo que combinan una región variable animal no humana y una región humana constante que también están contempladas en el alcance de la invención. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, el dominio de unión de antígeno a partir de un anticuerpo de un ratón, una rata u otras especies con unas regiones humanas constantes. Se pueden utilizar los procedimientos convencionales para preparar los anticuerpos quiméricos que contienen una región de inmunoglobulina variable que reconoce los antígenos CD163. (Ver, por ejemplo, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81.6851 (1985); Takeda *et al.*, Nature 314, 352 (1985), Cabilly *et al.*, patente US n° 4.816.567; Boss *et al.*, patente US n° 4.816.397; Tanaguchi *et al.*, solicitud de patente europea EP 1 714 96; publicación de patente europea 0173494, patente británica GB 2177096B). Se espera que los anticuerpos quiméricos pueden resultar menos inmunogénicos en un sujeto humano que el anticuerpo no quimérico correspondiente.

Los anticuerpos monoclonales o quiméricos específicamente reactivos con una proteína de la invención como se describe en la presente memoria se pueden humanizar asimismo mediante la producción de unas regiones quimera humanas constantes, en cuyas partes de las regiones variables, particularmente las regiones marco conservadas del dominio de unión de antígeno, son de origen humano y son las regiones hipervariables tienen un origen no humano. Dichas moléculas de inmunoglobulina se preparan mediante técnicas conocidas en la técnica, (por ejemplo, Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson *et al.*, Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982) y publicación PCT WO92/06193 o EP 0 239 400). Los anticuerpos humanizados también se pueden producir comercialmente (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña).

Los anticuerpos específicos, o los fragmentos de los anticuerpos, reaccionan frente a CD163 se pueden generar también mediante el cribado de las bibliotecas de expresión de los genes que codifican para las inmunoglobulinas, o sus porciones, expresadas en bacterias con unos péptidos producidos a partir de las moléculas de ácidos nucleicos que codifica para CD163 o sus partes. Por ejemplo, los fragmentos Fab completos, las regiones VH y las regiones FV se pueden expresar en bacterias que utilizan las bibliotecas de expresión de fagos (Ver por ejemplo Ward *et al.*, Nature 341, 544-546: (1989); Huse *et al.*, Science 246, 1275-1281 (1989), y McCafferty *et al.*, Nature 348, 552-554 (1990)). Alternativamente, un ratón SCID-hu, por ejemplo el modelo desarrollado por Genpharm Inc, se puede utilizar para producir anticuerpos o sus fragmentos.

Los anticuerpos de la invención incluyen también unos anticuerpos bifuncionales que comprende un anticuerpo específico para CD163 unido directamente a otro anticuerpo específico para otro antígeno en la superficie de la célula madre. Los anticuerpos bifuncionales se pueden preparar mediante acoplamiento químico de un anticuerpo a otro, por ejemplo mediante la utilización de N-succinimidil-3-(2-piridiltio) propionato (SPDP). Los anticuerpos de la invención incluyen también unos anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos contienen una región variable de un anticuerpo específico para CD163 y una región específica variable para por lo menos un antígeno en la superficie de las células madre que se van a marcar. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar mediante la formación de hibridomas híbridos. Los hibridomas híbridos se pueden preparar utilizando unos procedimientos conocidos en la técnica como los que se describen en Staerz & Bevan, (1986, PNAS (USA) 83: 1453) y Staerz & Bevan (1986, Immunology Today, 7:241). Los anticuerpos biespecíficos también se puede construir por unos medios químicos que utilizan unos procedimientos como los que se han descrito en Staerz *et al.*, (1985, Nature, 314:628) y Perez *et al.*, (1985 Nature 316:354), o mediante la expresión de los constructos de gen de inmunoglobulina recombinante.

También se pueden identificar las otras sustancias que pueden activar CD163. Por ejemplo, las sustancias que se pueden unir a CD163 en las células madre o las células progenitoras se puede identificar mediante la reacción de CD163 con una sustancia que se une potencialmente a CD163, y después se detecta si se han formado los complejos entre CD163 y la sustancia.

ES 2 320 860 T3

Un procedimiento para la identificación de sustancias que se pueden unir a CD163 que comprende las etapas siguientes:

- a) reacción CD163 y una sustancia de prueba, en unas condiciones que permite la formación de un complejo entre CD163 y la sustancia control, y
- b) ensayo de los complejos de CD163 y la sustancia de prueba, para la sustancia libre o para CD163 no acoplado, en el que la presencia de complejo indica que la sustancia de prueba es capaz de unirse a CD163.

Las condiciones que permiten la formación de los complejos de una sustancia y CD163 se deben seleccionar teniendo en cuenta los factores así como la naturaleza y las cantidades de la sustancia y la proteína.

El complejo sustancia-CD163, la sustancia libre y las proteínas no acopladas se pueden aislar mediante unos procedimientos de aislamiento convencionales, por ejemplo, salting out, cromatografía, electroforesis, filtración en gel, fraccionamiento, absorción, electroforesis en gel de poliacrilamida, aglutinación o sus combinaciones. Para facilitar el ensayo de los componentes, se puede utilizar un anticuerpo frente a CD163 o la sustancia, o CD163 marcado, o una sustancia marcada. Los anticuerpos CD163, o las sustancias se pueden aislar con una sustancia detectable.

El CD163 o la sustancia de prueba utilizada en el procedimiento se puede insolubilizar. Por ejemplo, el CD163 o sustancia se puede unir a un vehículo adecuado. Los ejemplos de vehículos adecuados son agarosa, celulosa, dextrano, sefared, sefared, carboximetilcelulosa, poliestireno, papel de filtro, resina intercambiadora de iones, película de plástico, tubo de plástico, perlas de cristal, sílice, copolímero de poliamino metil viniléter ácido maléico, copolímero de ácido amino, copolímero de etileno-ácido maléico, nylon, seda, etc. El vehículo se puede presentar en forma de, por ejemplo, tubo, placa de ensayo, perlas, disco, esfera, etc.

El CD163 o sustancia insolubilizada se puede preparar mediante la reacción del material con un vehículo insoluble adecuado utilizando procedimientos químicos o físicos, por ejemplo, acoplamiento de bromuro cianógeno.

El CD163 o sustancia de prueba también se puede expresar en la superficie de una célula en el ensayo anterior.

III. Composiciones

La presente invención asimismo también unas composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos que activan CD163 para la utilización en la estimulación de la hematopoyesis, la estimulación de la eritropoyesis, la estimulación de la mielopoyesis o para la estimulación del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de las células madre y/o células progenitoras. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la estimulación la hematopoyesis que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 mezclado con un vehículo o diluyente adecuado. La presente invención proporciona también una composición farmacéutica para la estimulación de la eritropoyesis que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 mezclado con un vehículo o diluyente adecuado. La presente invención proporciona también una composición farmacéutica para la estimulación de la mielopoyesis que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 mezclado con un vehículo o diluyente adecuado. La presente invención proporciona además una composición farmacéutica para la estimulación el crecimiento de las células madre, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 mezclado con un vehículo o diluyente adecuado. La presente invención proporciona además una composición farmacéutica para la estimulación del crecimiento de las células eritroides y/o mieloides, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar CD163 mezclado con un vehículo o diluyente adecuado.

Para la estimulación de la eritropoyesis, la composición farmacéutica puede contener además uno o más factores hematopoyéticos de crecimiento tales como la eritropoyetina. Para la estimulación de la mielopoyesis, la composición farmacéutica puede incluir además uno o más factores hematopoyéticos de crecimiento tales como G-CSF, GM-CSF, IL-3, etc.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser para una utilización intralesional, intravenosa, tópica, rectal, parenteral, local, inhalada o subcutánea, intradérmica, intramuscular, intratecal, transperitoneal, oral e intracerebral. Las composiciones se pueden presentar en forma líquida, sólida o semisólida, por ejemplo, píldoras, pastillas, cremas, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios, cápsulas de gelatina blanda, geles, membranas, comprimidos, soluciones o suspensiones.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden concebir para su administración en humanos o en animales. Las dosis que se deben administrar dependen de las necesidades de cada individuo, del efecto deseado y de la vía de administración seleccionada.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a pacientes, y de modo que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ve-

hículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985).

Sobre esta base, la composición farmacéutica incluye, aunque no exclusivamente, el compuesto o la sustancia reactiva asociada con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenida en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isosmótico con los fluidos fisiológicos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener además otros agentes que pueden estimular la hematopoyesis, la eritropoyesis o la mielopoyesis, o que pueden estimular el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células madre y/o células progenitoras.

IV. Aditivos para cultivos

Los anticuerpos que activan el CD163 se pueden utilizar como aditivos en medios de cultivo para potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células progenitoras y/o madre de mamíferos o para estimular la hematopoyesis, la eritropoyesis o la mielopoyesis. Por consiguiente, la presente invención proporciona un aditivo para cultivo de células útil para potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células progenitoras y/o madre que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo que puede activar el CD163. Los anticuerpos que activan el CD163 se pueden añadir a un medio sin suero que se utiliza tradicionalmente para la expresión de células madre hematopoyéticas. Por ejemplo, un medio sin suero con la adición de factores de crecimiento tales como el factor de células madre (SCF), interleuquina 3 (IL-3), GM-CSF, ligando Flt (FL), trombopoyetina (TPO) y el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) (tal como se describe en Kobari *et. al.*, 2000) se puede complementar con un anticuerpo, que puede activar el CD163.

V. Enriquecimiento Celular o Detección

Tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, los inventores han demostrado la presencia del receptor del CD163 en las células CD34+ derivadas de la sangre del cordón umbilical o de la médula ósea adulta o de sangre periférica. La presencia del CD163 en estas células puede proporcionar un importante herramienta de investigación y clínica ya que la subpoblación de CD34+/CD163+ de las células se puede examinar más para su habilidad de reinjertar y repoblar los diversos compartimientos del sistema hematopoyético. Además, las células "madre" derivadas de varias fuentes (médula ósea, sangre periférica movilizada o sangre del cordón umbilical) se pueden enriquecer, o clasificar para, la expresión del CD163.

La sustancia es un anticuerpo que se puede unir al CD163 y las células se seleccionan utilizando técnicas inmunológicas. Por ejemplo, las células madre que expresan el receptor del CD163 se pueden "clasificar" o seleccionar mediante la utilización de un anticuerpo anti-CD163, mediante la formación de complejos de este anticuerpo con un soporte sólido, extrayendo las células CD163 positivas de las otras células en la muestra y extrayendo posteriormente las células CD163 positivas del soporte sólido. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD163 pueden formar complejos en perlas magnéticas. Las células CD163 positivas se pueden unir al anticuerpo y se pueden extraer las células CD163 positivas de otras células en la muestra con una fuente magnética. En la separación de las células no CD163 positivas, las células CD163 positivas se pueden despegar de las perlas magnéticas. Alternativamente, la expresión de las células CD163 en células madre se puede utilizar para clasificar estas células a través de la clasificación celular por activación fluorescente (FACS) utilizando un anti-CD163 marcado fluorescentemente. Muchos otros procedimientos para purificar las células CD163 positivas serán obvios para los expertos en la materia. El procedimiento se puede utilizar para seleccionar células capaces de formar colonias de líneas tanto eritroides como mieloides. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar las células capaces de formar colonias de líneas tanto eritroides como mieloides que comprende (a) el contacto de la muestra con un anticuerpo que se puede unir al CD163 y (b) la selección de células que están unidas a la sustancia, en la que las células unidas son capaces de formar colonias de líneas tanto eritroides como mieloides. La presente invención también proporciona un procedimiento para seleccionar las células que son potencialmente capaces de repoblar organismos con células de líneas tanto eritroides como mieloides que comprende (a) el contacto de la muestra con un anticuerpo que se puede unir al CD163 y (b) la selección de células que están unidas a la sustancia, en la que las células unidas son potencialmente capaces de formar colonias de línea tanto eritroides como mieloides.

La invención también incluye la utilización de un anticuerpo que se une al CD163 en un protocolo de selección negativa para extraer las células progenitoras o madre de una muestra. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la extracción de células hematopoyéticas de una muestra que comprende (a) el contacto de la muestra con un anticuerpo que se puede unir al CD163 y (b) la extracción de las células que se unen a la sustancia de la muestra.

Los ejemplos no limitativos siguientes son ilustrativos de la presente invención:

Ejemplos**Ejemplo 1**5 *CD163 se expresa mediante células CD34+*

Las células CD34+ derivadas de médula ósea de adulto crioconservada (ABM) se permeabilizan utilizando una solución Cytofix/Cytoperm (Pharmingen TRansduction Laboratories, una división de BD BioSciences; Becton, Dickson and Company) durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, se lavan y después se incuban ya sea con un anticuerpo control isotípico marcado con fluorescente (IgG1-FITC) o un anticuerpo monoclonal CD163 anti-humano de ratón Mac-158 marcado fluorescentemente (MBS; Mac158-FITC). En experimentos paralelos, las células de las mismas muestras de la misma médula ósea se tiñen también extracelularmente con anti-CD34 marcado fluorescentemente (HPCA-2-PE) y anti-CD45 (H130-FITC). Las muestras que se analizan utilizando un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter, Inc) (Resultados presentados en la Tabla 1 indican que alrededor del 95% de las células de la médula ósea son CD34+/CD45+ y la mayoría de estas células se tiñen también con el anticuerpo anti-CD163.

TABLA 1

Análisis citométrico de flujo de las células de médula ósea CD34+

20

	% CD45+/CD34+	% IgG1 isotipo control	% CD163 ⁺
Células ABM CD34+	95	1,9	75,1

25 **Ejemplo 2***CD163 expresado por las células CD34+ es detectable por "Western blot"*

Los lisados de células se preparan a partir de las células CD34+ derivadas de médula ósea adulta mediante la resuspensión de las células en el tampón CHAPS (0,5% CHAPS, Tris 10 mM, MgCl₂ 1mM, EDTA 1 mM y glicerol al 10%) que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas. Las células resuspendidas se incuban en hielo durante 30 minutos. Los lisados se centrifugan y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo. Para el análisis Western blot, el sobrenadante se resuspende en una loción de carga de muestra en SDS no reductor. Las muestras se someten después a electroforesis a través de un gel de poliacrilamida al 8% y se transfieren a un filtro de nylon. Los filtros de nylon se bloquean con una solución que contiene leche desnatada y después se sonda primero con el anticuerpo CD-163 anti-humano Mac-158, seguido por un anticuerpo anti-ratón-cabra conjugado con peroxidasa de rábano (BIO-RAD Laboratories, Inc.) La unión del anticuerpo secundario se detecta utilizando un equipo de quimioluminiscencia mejorada de Amersham plc.

40 Tal como se demuestra en la Figura 1. La inmunoreactividad de CD163 resulta detectable en el lisado de células preparado a partir de las células CD34+.

Ejemplo 345 *Expresión superficial celular de las células CD163 en CD34+*

El nivel de expresión extracelular de CD163 por las células CD34+ se determina utilizando un análisis por citometría de flujo de las células CD34+ crioconservadas derivadas de la médula ósea de adulto y de las células mononucleares de baja densidad (LDMNC) de sangre de cordón umbilical (UCB). Las células se tiñen con anticuerpos anti-CD34 (HPCA-2-PE) y anti-CD163 (Mac158-FITC) marcado con fluorescente y después se analizan utilizando un citómetro de flujo EPICS XL. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Co-expresión de CD163 y CD34

55

Preparación	% CD163 ⁺	% CD34 ⁺	% CD34+/CD163 ⁺
Células CD34+ enriquecidas de ABM (n=4)	1,6	87,9	1,7
Células CD34+ enriquecidas de UCB (n=2)	2,8	25,5	3,8

60

n= número de muestras

65 La mayoría de las células CD163+ co-teñidas con el anticuerpo anti-CD34, que indica que CD163 es expresado por las células CD34+. El receptor CD163 humano se ha descrito anteriormente como un receptor expresado exclusivamente en células tipo monocito/macrófago. Estos datos demuestran que el CD163 se expresa también mediante una población de células madre hematopoyéticas humanas.

Ejemplo 4

Estimulación de los receptores CD163 da como resultado el crecimiento de células eritroides

El efecto de un anticuerpo monoclonal de ratón antihumano anti-CD163 (EDHu-1, Serotec) se ensaya en un ensayo de formación de colonias en condiciones que favorecen las colonias progenitoras eritroides (BFU-E). Estas colonias se forman mediante unas células progenitoras eritroides primitivas únicas en un medio semisólido y son relativamente grandes y multiagrupadas. Las células dentro de la colonia normalmente están hemoglobinizadas después de 12 a 16 días de cultivo. Las células CD34+, enriquecidas de la sangre de cordón umbilical (UCB), o células CD34+ derivadas de médula ósea de adulto (ABM) se sembraron en metilcelulosa con interleucina-3 10 ng/ml (IL-3) y eritropoyetina 2 U/ml (Epo), en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CD163 a una concentración 50 µg/ml. Se evaluó el efecto del anticuerpo en varios progenitores eritroides y los resultados se presentan en la Tabla 3:

TABLA 3

Células CD34+ de ABM o UCB estimuladas en CFA mediante anticuerpos anti-CD163 (Ab)

Número de células BFU-E / 1×10^3			
	+ Anti- CD 163 Ab	+ Anti- CD 163 Ab	RFI *
Fuente celular			
UCB CD34 ⁺	28	42	1,5x
ABM CD34 ⁺	22	29	1,3x

* aumento de pliegue relativo

El anticuerpo Anti-CD163, a una concentración 50 µg/ml, da como resultado un número mayor de BFU-E a los que corresponden a las placas control. Asimismo, se obtienen unos resultados similares utilizando un anticuerpo anti-CD163 diferente (Mac 158) para estimular CD163. La estimulación de las células CD34+ a través del receptor CD163 incrementa la proliferación de progenitoras eritroides presentes en la sangre de cordón umbilical o médula ósea adulta.

Ejemplo 5

La estimulación de CD163 incrementa la proliferación y diferenciación de las células eritroides

El efecto de la activación de un anticuerpo anti-CD163 se ensaya en el ensayo de formación de colonias en unas condiciones que facilitan la formación de colonias progenitoras eritroides. Las células CD34+, enriquecidas de sangre del cordón umbilical se siembran en metilcelulosa (1.000 células/ml) que contiene 10 ng/ml IL-3 y 2,0 U/ml Epo, en presencia de ya sea un anticuerpo isotipo control (50 µg/ml) o un anticuerpo anti-CD163 (EDHu-1; 50 µg/ml). Las placas de metilcelulosa se incuban en un incubador humidificador con 5% de CO₂, y se mantuvieron a 37°C. Las colonias (BFU-E) se enumeran y se evalúa su morfología después de 14 días. Además para aumentar el número de colonias eritroides, como se demuestra en el Ejemplo 4, el anticuerpo anti-CD163 incrementa también el tamaño y la rojez de las colonias progenitoras eritroides, cuando se compara con el control isotipo (Figura 2). También se obtienen unos resultados similares utilizando un anticuerpo anti-CD163 diferente (Mac158) para estimular CD163. También se obtienen unos resultados similares utilizando células CD34+ derivadas de médula ósea adulta. Estos datos sugieren que la estimulación de CD163 incrementa también la proliferación (tamaño de colonia mayor) y la diferenciación (producción de hemoglobina mayor y por ello, colonias más rojas) de las células eritroides presentes en las colonias BFU-E.

Ejemplo 6

CD163 es expresado por las células eritroides

Las células CD34+ de médula ósea de adulto se siembran en metilcelulosa (1.000 células/ml) en presencia de 10 ng/ml IL-3 y 0,5 o bien 2,0 U/ml Epo. Las placas de metilcelulosa se incuban en un incubador humidificador con 5% de CO₂, y se mantuvieron a 37°C. Después de 14 días, las células de las colonias BFU-E se extraen de las placas, se lavan, se enumeran y recoge el pellet. Los pellets de las células se congelan a una temperatura de -80°C. Se preparan los lisados de las células a partir de un número equivalente de células y volumen igual de lisado por estado se someten a un análisis de Western blot como se describe en el Ejemplo 3.

Como muestra la Figura 3, la inmunoreactividad de CD163 es fácilmente detectable en los lisados de células preparados a partir de colonias BFU-E. Además, en unas condiciones de concentraciones Epo reducidas, el nivel de inmunoreactividad de CD163 está aumentado, lo que sugiere que Epo puede modular la expresión de CD163.

Ejemplo 7

La estimulación de CD163 se compensa para unas concentraciones de EPO sub-óptimas

El efecto de los anticuerpos CD163 también se probó en unos ensayos de formación de colonias sin suero. Las células mononucleares de baja densidad de sangre periférica adulta (APB LDMNC) se siembran (1×10^5 células/ml) en metilcelulosa que contiene BSA al 1%, insulina $10 \mu\text{g/ml}$, transferrina humana $200 \mu\text{g/ml}$, IL-3 10 ng/ml y EPO $2,0$ o bien $2,0 \text{ U/ml}$, con o sin dos anticuerpos anti-CD163 diferentes, EDHu-1 o Mac158. Las placas se incuban durante 14 días a una temperatura de 37°C a una concentración de CO_2 del 5%, después de la cual las colonias progenitoras eritroides se enumeran. Como se muestra en la Tabla 4, se detectan más colonias BFU-E cuando las células se tratan con los anticuerpos anti-CD163 cuando se compara con las células no tratadas. Además, las colonias que se forman en presencia de anticuerpos anti-CD163 son más grandes y más rojas que las formadas en ausencia del anticuerpo anti-CD163. De este modo, la activación de CD163 da como resultado una proliferación incrementada de los progenitores eritroides, y un aumento en la proliferación y diferenciación de las células eritroides dentro las colonias BFU-E en unos ensayos de formación de colonias con suero y sin suero. En estas condiciones de EPO reducidas, la estimulación de CD163 con EDHu-1 o bien Mac158 da como resultado un aumento en el número de colonias progenitores eritroides (Tabla 4). Estas colonias también son mayores y más rojas que las que están presentes en las placas control. Se obtienen resultados similares utilizando CD34+ aislado de médula ósea o sangre de cordón umbilical. También se obtienen resultados similares en unos ensayos de formación de colonias que contienen suero. En ausencia de Epo, se detectan unas colonias no eritroides en los ensayos de formación de colonias, ya sea en presencia o ausencia de anticuerpos anti CD163.

Estos datos sugieren que la estimulación de CD163 aumenta la proliferación de progenitores eritroides, así como, la proliferación y diferenciación de las células eritroides con unas concentraciones decreciente tanto de los ensayos que contienen suero y sin suero. Sin embargo, la estimulación de CD163 no sustituye EPO completamente en la formación de colonias eritroides.

TABLA 4

Estimulación de BFU-E en ausencia o presencia de anticuerpos Anti-CD163 (Ab) a unas concentraciones baja y elevada de EPO en CFA sin suero

Anticuerpo	[Epo], U/ml	Número de colonias BFU-E/placa		RFI+
		- Anti-CD163 Ab	+ Anti-CD163 Ab	
EDHu-1	0,2	29	38	1,3
	2,0	48	72	1,5
Mac158	0,2	33	41	1,3
	2,0	48	74	1,5

*aumento relativo

Ejemplo 8

La estimulación de CD163 incrementa la proliferación de progenitores CFU-GM

El efecto del entrecruzamiento del anticuerpo anti-CD163 (EDHu-1) se probó en unos ensayos de formación de colonias en unas condiciones óptimas para el crecimiento de las colonias progenitoras mieloides (CFU-GM) (50 ng/ml SCF, 4 pg/ml IL-1 β , $6,25 \text{ ng/ml}$ IL-6), CD34+ derivado de la sangre de cordón umbilical se sembraron a metilcelulosa a una concentración de 2×10^3 células/ml, con o sin anticuerpos anti-CD163 a $50 \mu\text{g/ml}$. El efecto del anti-cuerpo anti-CD163 sobre el número de CFU-GM se evaluó después de 14 días de cultivo a una temperatura de 37°C en la tabla 5.

TABLA 5

El anticuerpo anti-CD163 estimula la proliferación de CFU-GM

	CFU-GM por 2×10^3 células
Control	130
+ $50 \mu\text{g/ml}$ EDHu-1	219

A una concentración de $50 \mu\text{g/ml}$, el anticuerpo EDHu-1 da como resultado un aumento 1,7 veces de CFU-GM cuando se compara con la muestra control. Esto sugiere que los progenitores mieloides tempranos expresan el receptor CD163 y que la estimulación de este receptor incrementa la proliferación de estas células.

Ejemplo 9

CD163 es expresado por las células mieloides dentro de la colonia CFU-GM y su expresión no se limita a células CD14⁺

CD34⁺ derivadas de células de sangre de cordón umbilical se siembran en metilcelulosa a una concentración de 2×10^3 células/ml en unas condiciones óptimas para el crecimiento de las colonias progenitoras mieloides (CFU-GM) (50 ng/ml SCF, 4 pg/ml IL-1 β , 6,25 ng/ml IL-6) y se cultivan en un incubador humidificado a una temperatura de 37°C con CO₂ al 5%. Después de 14 días, las células de las colonias resultantes se extraen, se lavan, enumeran y se examinan por citometría de flujo para la expresión de CD14 y CD163 que utilizan los anticuerpos TUK4 y Mac158 marcados fluorescentemente, respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

TABLA 6

Expresión de CD163 y CD14 en células de las colonias CFU-GM

	Células CD163 ⁺	Células CD14 ⁺	CD163 ⁺ / CD14 ⁺
Células derivadas CFU/GM	10,6%	42,0 %	1,4%

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a lo que se considera actualmente los ejemplos preferidos, se debe entender que la invención no se limita a los ejemplos adjuntos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD163 que puede activar el CD163 en la preparación de una composición para el tratamiento de la citopenia, la anemia o la neutropenia.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el CD163 se expresa mediante una célula madre CD34 positiva.
3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que si la afección es anemia a continuación se administran uno o
10 más factores de crecimiento hematopoyético.
4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el factor de crecimiento hematopoyético es eritropoyetina.
5. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que si la afección es neutropenia a continuación se administran
15 uno o más factores de crecimiento hematopoyético.
6. Utilización según la reivindicación 5, en la que el factor de crecimiento hematopoyético es G-CSF o GM-CSF.
7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 20 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo es un anticuerpo bifuncional.
9. Aditivo para el cultivo de células útil para potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la
movilización de células madre o células progenitoras *in vitro* que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo
25 anti-CD163 que puede activar el CD163.
10. Aditivo para el cultivo de células según la reivindicación 9 que no tiene suero.
11. Aditivo para el cultivo de células según la reivindicación 9 que contiene suero.
- 30 12. Aditivo para el cultivo de células según una de las reivindicaciones 9 a 11 para su utilización para aumentar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células progenitoras eritroides *in vitro*.
13. Aditivo para el cultivo de células según la reivindicación 12, que comprende asimismo eritropoyetina.
- 35 14. Aditivo para el cultivo de células según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para su utilización para potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células progenitoras mieloides *in vitro*.
- 40 15. Aditivo para el cultivo de células según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para su utilización para potenciar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y/o la movilización de células progenitoras o madre hematopoyéticas *in vitro*.
16. Procedimiento para seleccionar células madre o progenitoras en una muestra que comprende (a) el contacto de
45 la muestra con un anticuerpo anti-CD163 que se puede unir al CD163 y (b) la selección de células que están unidas a la sustancia.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que las células madre o progenitoras son células CD34 positivas.
- 50 18. Procedimiento para seleccionar células capaces de formar colonias de líneas tanto eritroides como mieloides que comprende (a) el contacto de la muestra con un anticuerpo anti-CD163 que se puede unir a CD163 y (b) la selección de células que están unidas a la sustancia.
19. Procedimiento para seleccionar células que son potencialmente capaces de repoblar organismos con células de
55 líneas tanto eritroides como mieloides que comprende (a) el contacto de la muestra con un anticuerpo anti-CD163 que se puede unir a CD163 y (b) la selección de células que están unidas a la sustancia.
20. Procedimiento para seleccionar células madre o progenitoras de una muestra que comprende (a) el contacto de
60 la muestra con un anticuerpo anti-CD163 que se puede unir a CD163 y (b) la extracción de células que se unen a la sustancia de la muestra.

FIGURA 1

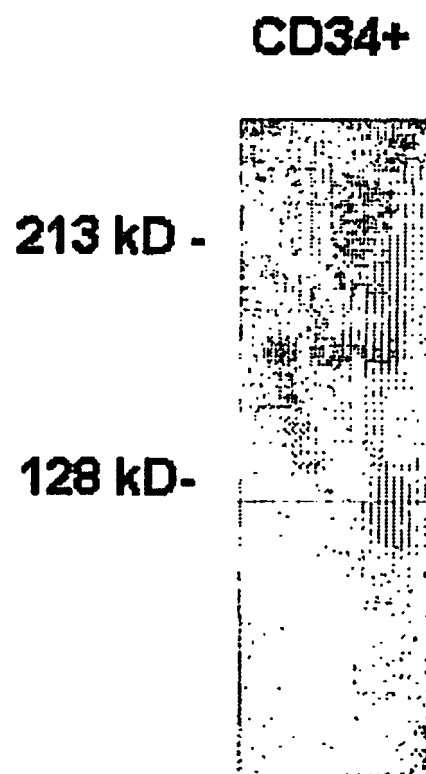
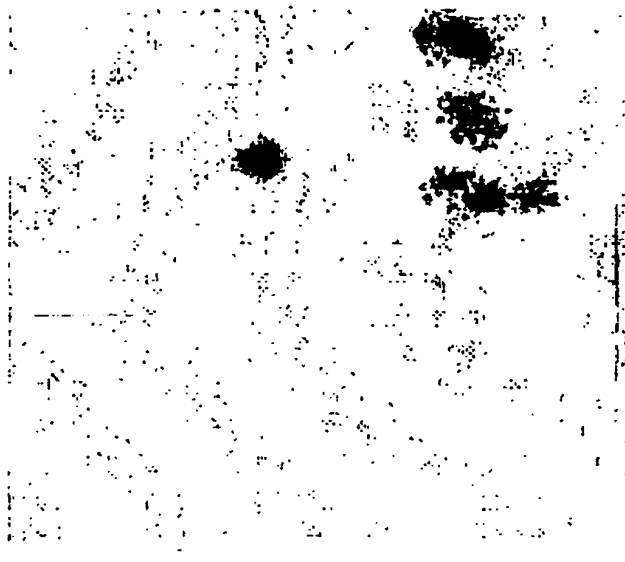


FIGURA 2

Ab CD163 en ensayos de formaciones de colonias

50 µg/ml de control isotipo Ab - 2,0 EPO



50 µg/ml de Ab CD163- 2,0 EPO

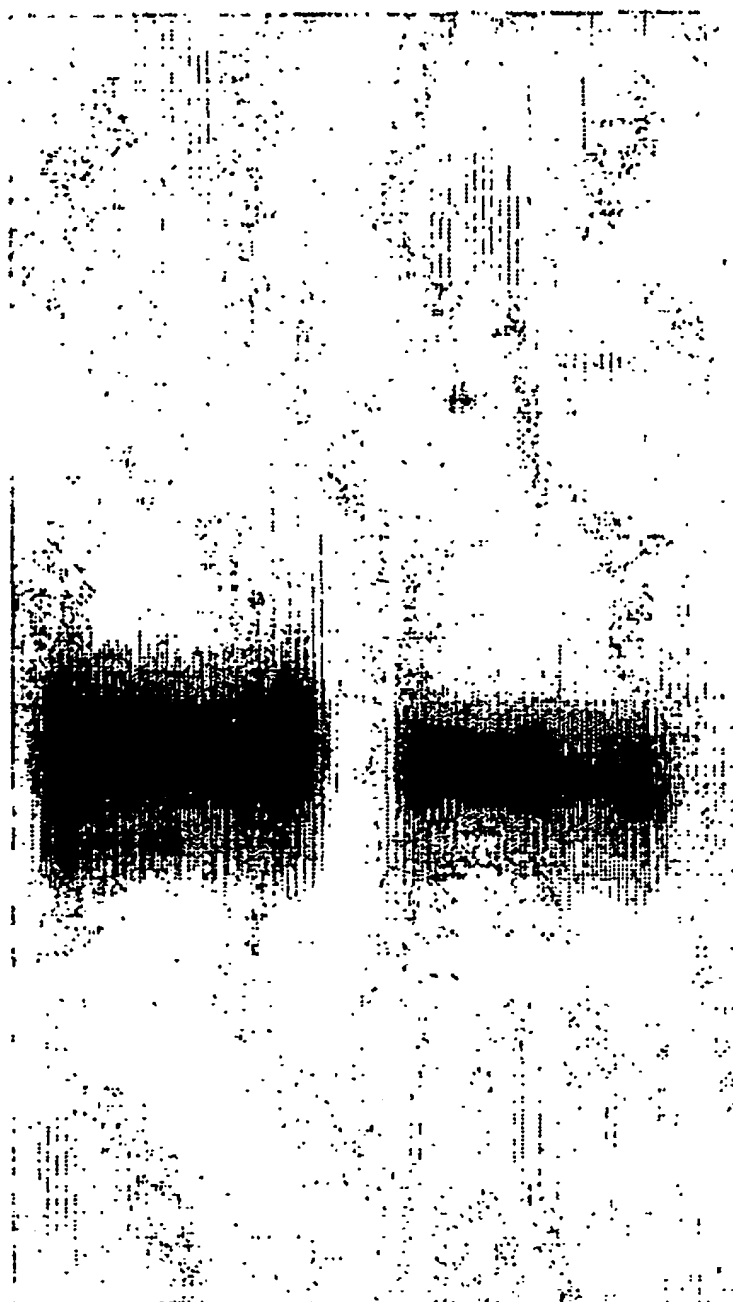


FIGURA 3

[Epo], U/mL

0,5

2,0



- 213 kD

- 128 kD