



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 293 912**

(51) Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00946928 .9**

(86) Fecha de presentación : **29.06.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1194035**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

(54) Título: **Subgrupos de células progenitoras mieloides de mamífero.**

(30) Prioridad: **29.06.1999 US 141421 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(73) Titular/es: **The Board of Trustees of the Leland
Stanford Junior University
900 Welch Road, Suite 350
Palo Alto, California 94304, US**

(72) Inventor/es: **Weissman, Irving, L.;
Traver, David, Jeffrey y
Akashi, Koichi**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 293 912 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

Subgrupos de células progenitoras mieloides de mamífero.

5 Estado de la técnica anterior a la invención

El sistema inmune de los mamíferos juega un papel vital en la protección frente a enfermedades, pero su eficiencia se basa en un frágil balance de poder. Las respuestas excesivas o inapropiadas dan como resultado una enfermedad autoinmune, mientras que el hecho de no responder da como resultado inmunodeficiencia. Cuando ocurren dichas enfermedades, puede requerirse una intervención terapéutica. Sin embargo, no es fácil manipular con éxito un sistema tan complejo.

Las células maduras del sistema inmune, las células T, las células B y las células asesinas naturales, se diferencian continuamente a partir de células madre hematopoyéticas, mediante una serie de divisiones celulares. Se cree que después de cada división celular, el desarrollo potencial de las células descendientes se mantiene o se restringe aún más respecto al progenitor, pero nunca se expande. Por tanto se observa que las células madre pluripotenciales dan lugar a células progenitoras destinadas a un linaje múltiple, las cuales dan lugar a linajes específicos y finalmente a células maduras. Los cambios coordinados de las propiedades celulares que conducen a la restricción irreversible del linaje destino pueden deberse a una activación o silenciado secuencial de varios genes.

Se ha descrito fenotipo de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales longevas. Sin embargo, la identificación de los progenitores bipotentes o oligopotentes intermedios ha sido difícil, dado que la evaluación del potencial diferenciador puede ser perturbado por el posible fallo, por parte de las células, a leer una diferenciación detectable hacia linajes particulares, lo cual puede deberse a un fallo en alcanzar microentornos adecuados *in vitro*, a una insuficiente expansión para la detección *in vitro* o la naturaleza estocástica del compromiso de linaje, como mínimo *in vitro*.

La utilización de células progenitoras pluripotenciales respecto al compromiso de linaje sortea muchos de los problemas que surgirían en la transferencia de células maduras. Sin embargo, dichas células progenitoras deben separarse de otras células hematopoyéticas. La separación requiere identificar la célula y caracterizar las diferencias fenotípicas que pueden utilizarse en un procedimiento de separación. Las células que son de manipulación genética se prefieren particularmente.

Literatura relevante

Se ha publicado una variedad de artículos de revisión que tratan el fenotipo de las células en los linajes hematopoyéticos. El desarrollo global del sistema hematólimfoide se discute en Orkin (1996) Curr. Opin. Genet. Dev. 6:597-602. El papel de los factores transcripcionales en la regulación de la diferenciación hematopoyética se discute en Georgopoulos *et al.* (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:155-176; and Singh (1996) Curr. Opin. Immunol. 8:160-165.

40 Referencias

Morrison, S.J. & Weissman, I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661-673 (1994).

Spangrude, G.J., Heimfeld, S. & Weissman, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62 (1988).

Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672 (1997).

Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I.L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89, 1033-1041 (1997).

Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853 (1993).

Heimfeld, S., Hudak, S., Weissman, I. & Rennick, D. The *in vitro* response of phenotypically defined mouse stem cells and myeloerythroid progenitors to single or multiple growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9902-9906 (1991).

Siminovitch, L., McCulloch, E. A., and Till, J. E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. cell comp. Physiol.* 62, 327-336 (1963).

Magli, M.C., Iscove, N.N. & Odartchenko, N. Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. *Nature* 295, 527-529 (1982).

Uchida, N., Aguila, H.L., Fleming, W.H., Jerabek, L. & Weissman, I.L. Rapid and sustained hematopoietic recovery in lethally irradiated mice transplanted with purified Thy-1.1lo Lin-Sca-1+ hematopoietic stem cells. *Blood* 83, 3758-3779 (1994).

Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A. & Orkin, S.H. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J* 16, 3965-3973 (1997).

- 5 **Pevny, L., et al.** Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260 (1991).

Zon, L.I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H.F. & Orkin, S.H. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10638-10641 (1991).

- 10 **Suda, J., Suda, T. & Ogawa, M.** Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors. *Blood* 64, 393-399 (1984).

Enver, T., Heyworth, C.M. & Dexter, T.M. Do stem cells play dice? *Blood* 92, 348-351; discussion 352 (1998).

- 15 **Metcalf, D.** Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* 92, 345-347; discussion 352 (1998).

Traver, D., Akashi, K., Weissman, I.L. & Lagasse, E. Mice defective in two apoptosis pathways in the myeloid lineage develop acute myeloblastic leukemia. *Immunity* 9, 47-57 (1998).

Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Akashi, K., Globerson, A. & Weissman, I.L. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2, 1011-1016 (1996).

- 25 **Miyamoto, T., et al.** Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 87, 4789-4796 (1996).

Resumen de la invención

30 Se proporciona una subpoblación de células hematopoyéticas sustancialmente enriquecida, la cual se caracteriza por una actividad celular progenitora de linajes mieloides, pero que carece del potencial de diferenciarse en linajes linfoides. Dicha población se denomina célula progenitora mieloide común (CMP). Se proporcionan procedimientos para aislar y cultivar dichas subpoblaciones. La población CMP da lugar a todos los linajes mieloides y puede dar lugar a dos poblaciones progenitoras adicionales que se destinan exclusivamente a los linajes eritroide/megacariocítico (MEP) o mielomonocítico (GMP). Ambos linajes MEP y GMP pueden enriquecerse sustancialmente, aislarse y cultivarse. Las tres poblaciones progenitoras son útiles en trasplantes, para la evaluación experimental y como fuente de linaje y de productos celulares específicos, incluyendo especies de ARNm útiles en la identificación de genes que se expresan específicamente en dichas células, y como diana para el descubrimiento de factores o moléculas que pueden afectarles.

40 Descripción resumida de los dibujos

Figura 1. Identificación de progenitores mieloides en médula espinal de ratón. (A) Se recogieron células vivas del linaje IL-7R- y se visualizó la expresión de los marcadores de superficie c-Kit y Sca-1. (B) La fracción Lin- IL-7R- Sca-1- c-Kit+ se subdividió en poblaciones FcγR^{lo} CD34+ (a), FcγR^{lo} CD34- (b), y FcγR^{hi} CD34+ (c). La expresión de G-CSFR, M-CSFR y bc se observó exclusivamente en la población FcγR^{hi} CD34+. (C) Reanálisis de las poblaciones seleccionadas FcγR^{lo} CD34+, FcγR^{lo} CD34- y FcγR^{hi} CD34+. Todas las poblaciones se seleccionaron doblemente para ensayos *in vitro* e *in vitro*.

Figura 2. Lectura de colonia mieloide clonogénica en metilcelulosa. (A) 288 pozos, cada uno de los cuales recibió una sola célula, se examinaron para cada población progenitora seleccionada. Las células FcγR^{lo} CD34+ así como HSC formaron diversas colonias mieloides, incluyendo CFU-GEMM, mientras que las poblaciones FcγR^{lo} CD34- y FcγR^{lo} CD34+ sólo dieron lugar a colonias Meg/E y G/M, respectivamente (izquierda). No todas las poblaciones progenitoras mieloides requería SLF, FL, or IL-11 para la formación de colonias (derecha). (B) La formación de colonias Meg/E a partir de las fracciones FcγR^{lo} CD34+/- dependía completamente de Epo y Tpo. Los progenitores mieloides CD34+ myeloid forman colonias mielomonocíticas en presencia de IL-3 y GM-CSF solamente (derecha).

Figura 3. Morfología de colonias del día 7 derivadas de progenitores mieloides seleccionados. Doscintas células obtenidas a partir de cada población se cultivaron en metilcelulosa que contenía SLF, IL-3, IL-11, GM-CSF, Epo y Tpo en discos de 35 mm. Los paneles superiores muestran la aparición de colonias derivadas de progenitores FcγR^{lo} CD34+ CMP (A), FcγR^{lo} CD34- MEP (B), y progenitores FcγR^{hi} CD34+ G/M (C). Los paneles inferiores muestran la morfología celular obtenida a partir de 5 colonias combinadas recogidas a partir de cada cultivo (tinción Giemsa 1000x).

Figura 4. Potencial de diferenciación *in vitro* de los progenitores mieloides. Se analizaron esplenocitos obtenidos a partir de ratones receptores congénitos irradiados letalmente, seis días después de la inyección intravenosa de 10.000 progenitores CMP, Meg/E o GMP progenitores. Los paneles superiores muestran los perfiles Mac-1/Gr-1 de células derivadas de donantes (CD45.1) en ratones receptores (CD45.2). Los paneles inferiores muestran los perfiles CD45.1/TER119 a partir de las fracciones Mac-1-Gr-1-mostradas más arriba.

Figura 5. Relaciones de linaje entre las subclases progenitoras mieloides. (A) FcγR^{lo} CD34⁺ CMP dio lugar a progenitores FcγR^{lo} CD34⁻ MEP y progenitores FcγR^{hi} CD34⁺ G/M 60 h después de la selección sobre capas de estroma S17. (B) RT-PCR para la expresión de GATA-1 y Epo-R. Se observa una baja expresión en FcγR^{lo} CD34⁺ CMP, y es más pronunciado en los progenitores FcγR^{lo} CD34⁻ MEP. Los progenitores CD34⁺ GMP no expresan ninguno de los genes.

Descripción de las realizaciones específicas

Se proporcionan células progenitoras hematopoyéticas de mamífero que están destinadas a linajes mieloides. Dichas células se subdividen en tres subclases distintas: una célula progenitora mieloides común (CMP); una célula progenitora destinada a monolito granulocito (GMP); y una célula progenitora destinada a eritroide/megacariocito (MEP). CMP da lugar a las otras dos subclases.

La población CMP es útil en tranplantes para proporcionar un receptor con células mieloides, incluyendo megacariocitos, plaquetas y células eritroides, además de monocitos y granulocitos; para el cribado de fármacos; en modelos experimentales de diferenciación e interacción hematopoyética; en ensayos de cribado *in vitro* para definir factores de crecimiento y diferenciación y para caracterizar genes implicados en el desarrollo y regulación mieloides; y similares. Las células nativas pueden utilizarse para estos objetivos o pueden modificarse genéticamente para proporcionar capacidades alteradas.

Se separan los CMPs de una mezcla compleja de células utilizando reactivos que reconocen específicamente marcadores sobre la superficie celular, incluyendo CDw127 (receptor α de IL-7); proteína (c-kit) CD117) y un cóctel de marcadores expresados en células destinadas a linaje. Las células progenitoras mieloides murinas de la invención se caracterizan también por carecer de expresión de Sca-1 (Ly-6E y Ly-6A). En las células humanas, el nivel de tinción para CD34 y c-kit es bajo. Las tres subclases de células progenitoras se caracterizan por ser IL-7Rα negativas, sca-1 negativas, linaje negativas y altas en c-kit.

La población de células que se encuentra en la fracción Lin-IL-7R⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ puede subdividirse en las poblaciones progenitoras de la invención dependiendo de la expresión de CD34 y del receptor Fcγ (FcγR). La población FcγR^{lo} CD34⁺ proporciona el progenitor mieloides común. La población FcγR^{lo} CD34⁻ proporciona la población progenitora de MEP; y la población FcγR^{hi} CD34⁺ proporciona la subclase progenitora GMP.

En presencia del factor steel (SLF), ligando fit-3 (FL), interleucina (IL)-3, IL-11, GM-CSF, trombopoyetina (Tpo) y eritropoyetina (Epo), las células FcγR^{lo} CD34⁺ dan lugar a diversos tipos de coloniasmieloeritroides, incluyendo CFU-GEMMeg, unidad formadora de brotes - eritroide (BFU-E), CFU-megacariocitos (CFU-Meg), CFU-granulocito/macrófago (CFU-GM), CFU-granulocito (CFU-G) y CFU-macrófago (CFU-M).

La población FcγR^{hi} CD34⁺ genera colonias CFU-M, CFU-G o CFU-GM que contienen macrófagos y/o granulocitos en respuesta a los factores de crecimiento indicados más arriba. Por el contrario, las células FcγR^{lo} CD34⁻ dan lugar a colonias CFU-Meg, BFU-E o CFU-MEP que sólo contienen megacariocitos y/o eritrocitos en respuesta a IL-3, GM-CSF, Tpo y Epo, pero no forman colonias en ausencia de Tpo y Epo. Las tres poblaciones progenitoras mieloides no requieren "citoquinas de actuación temprana", como por ejemplo SLF, FL y IL-11 para iniciar la formación de colonias.

Todos estos progenitores son capaces de proporcionar una actividad diferenciadora rápida *in vitro*. Las células CMP dan lugar a células Gr-1 +/Mac-1+ mielomonocíticas y megacariocíticas, así como células eritroides TER119+ en bazo y médula espinal. La población progenitora GMP da lugar a células Gr-1+/Mac-1+; y la población progenitora MEP a megacariocitos y células eritroides.

Se proporcionan algunos procedimientos para el enriquecimiento de subclases de células progenitoras mieloides. La población celular enriquecida tendrá habitualmente como mínimo aproximadamente un 90% de células del fenotipo seleccionado, más habitualmente como mínimo un 95% de células del fenotipo seleccionado. Las poblaciones celulares objeto se separan del resto de las células, por ejemplo células hematopoyéticas, tomando como base marcadores específicos, que se identifican con reactivos de afinidad, por ejemplo anticuerpos monoclonales.

Los subgrupos progenitores mieloides se aíslan de cualquier fuente de células progenitoras hematopoyéticas, que pueden ser fetales, neonatales, juveniles o adultas, incluyendo médula espinal, bazo, hígado, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, sangre periférica movilizada, saco vitelino, etc. Para tranplantes autólogos o alogénicos, se prefiere la médula espinal y sangre movilizada como materiales de partida. Para la sangre periférica, las células progenitoras se movilizan a partir del compartimiento medular hasta el torrente sanguíneo periféricos después de un tratamiento con quimioterapia; G-CSF o GM-CSF o ambos. Se ha utilizado una diversidad de agentes terapéuticos aislados o en combinación para movilizar los PBPCs. Al administrar dichos agentes, debe encontrarse un equilibrio en todos los casos entre la movilización efectiva de PBPC y el posible daño al reservorio de células madre hematopoyéticas y la tolerancia general del paciente. Se ha encontrado que el paclitaxel moviliza efectivamente los PBPCs sin dañar el reservorio de células madre hematopoyéticas. Puede encontrarse una revisión de células madre de sangre periférica en Moog *et al.* (1998) Ann Hematol 77(4): 143-7. Como fuente alternativa de células, pueden cultivarse células madre hematopoyéticas *in vitro* o *in vitro* para proporcionar una fuente de células, tal como se describe en las patentes EEUU nos. 5,061,620, publicada el 29 de octubre del 1991; y 5,087,570, publicada el 11 de febrero del 1992.

ES 2 293 912 T3

Las células progenitoras pueden obtenerse a partir de especies de mamífero, por ejemplo equina, bovina, porcina, canina, felina, roedora, por ejemplo ratones, ratas, hámster, primate, etc, en particular humana. El tejido puede obtenerse mediante biopsia o aforesis a partir de un donante de hígado, o obtenerse a partir de un donante muerto o moribundo aproximadamente en un plazo de 48 horas desde la muerte, o tejido recién congelado, tejido congelado en un plazo de aproximadamente 48 horas tras la muerte y mantenido por debajo de aproximadamente -20°C, habitualmente a aproximadamente la temperatura del nitrógeno líquido (-180°C) indefinidamente.

Las células progenitoras mieloides objeto se caracterizan por expresar marcadores de superficie celular. Para muchos de dichos marcadores, la expresión es de nivel bajo o intermedio. Aunque es común referirse a las células como “positivas” o “negativas” para un marcador determinado, los niveles de expresión reales son un rasgo cuantitativo. El número de moléculas sobre la superficie celular puede variar en varios logs y aún caracterizarse por ser “positiva”. La caracterización del nivel de tinción permite distinciones sutiles entre poblaciones celulares.

La intensidad en la tinción de células puede monitorizarse por citometría de flujo, mientras que los láseres detectan los niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de antígeno de superficie unido por los anticuerpos). La citometría de flujo o FACS puede utilizarse también para separar poblaciones celulares basándose en la intensidad de la tinción por anticuerpo, así como en función de otros parámetros, por ejemplo el tamaño celular y la dispersión de la luz. Aunque el nivel absoluto de tinción puede variar con un fluorocromo particular o una preparación de anticuerpo, los datos pueden normalizarse a un control.

Para normalizar la distribución a un control, cada célula se registra como un dato puntual que tiene una intensidad determinada detención. Dichos datos puntuales pueden representarse según una escala logarítmica, donde la unidad de medida es una intensidad de tinción arbitraria. En un ejemplo, las células con mayor intensidad de tinción en una muestra de médula espinal se designan como 4 logs más intensas que las células que tienen en nivel menor de tinción. Cuando se representa de esta manera, está claro que las células que caen en el mayor log de intensidad de tinción son intensas, mientras que aquellas en la intensidad menor son negativas. Las células con tinción “baja”, que caen en el 2º-3º log de intensidad de tinción tienen propiedades que son únicas en relación a las células negativas y a las células positivas. Un control alternativo puede utilizar un sustrato que tenga una densidad definida de antígeno sobre su superficie, por ejemplo una cuenta fabricada o una línea celular que proporciona el control positivo de intensidad. La designación “bajo” indica que el nivel de tinción está por encima de la intensidad de un control del mismo isotipo, pero que no es tan intenso como las células con tinción más intensa que se encuentran normalmente en la médula espinal.

Los subgrupos progenitores mieloides objeto se caracterizan por expresar receptores de factores de crecimiento. Además de proporcionar un marcador conveniente para la separación, los ligandos afines son biológicamente activos sobre CMPs. Las células objeto expresan altos niveles de c-kit (CD117) sobre su superficie. Los anticuerpos que unen específicamente c-kit en humanos, ratones, ratas, etc, son conocidos en el estado de la técnica. Alternativamente, en cuanto a los ligandos c-kit, el factor steel (Sif) puede utilizarse para identificar células que expresen c-kit.

Los subgrupos progenitores mieloides también tienen un fenotipo que carece de expresión de marcadores específicos de linaje, a modo de ejemplo B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1 y Mac-1. Para objetivos de tinción, puede utilizarse un cocktail de reactivos de unión, designados aquí como “lin”. El panel lin comprenderá reactivos de unión, por ejemplo anticuerpos y fragmentos de unión funcionales de los mismos, ligandos, peptidomiméticos, etc, que reconocen dos o más de los marcadores de linaje. Un panel lin incluirá generalmente como mínimo un marcador expresado sobre células B maduras, sobre células T maduras, sobre granulocitos maduros y sobre macrófagos maduros. Algunos marcadores adecuados para ser utilizados en un panel de linaje se expresan típicamente sobre dichas células maduras, pero no están presentes en linajes múltiples o en células madre y células progenitoras.

Las subclases objeto se separan de una mezcla compleja de células mediante técnicas que enriquecen para células que tienen las características indicadas más arriba. Para aislar las células de un tejido, puede utilizarse una disolución apropiada para dispersión o suspensión. Dicha disolución será generalmente una disolución salina equilibrada, por ejemplo disolución salina normal, PBS, disolución salina equilibrada de Hank, etc, suplementada convenientemente con suero bovino fetal o con otros factores presentes en la naturaleza, en conjunción con un tampón aceptable a concentraciones bajas, generalmente 5-25 mM. Algunos tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

La separación de las poblaciones celulares objeto utilizarán entonces una separación por afinidad para proporcionar una población sustancialmente pura. Algunas técnicas para la separación por afinidad pueden incluir la separación magnética, utilizando cuentas magnéticas recubiertas de anticuerpo, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o utilizados junto a un anticuerpo monoclonal, por ejemplo complemento y citoquinas, y “apelmazamiento” con un anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo placa, u otra técnica adecuada. Algunas técnicas para proporcionar una separación adecuada incluyen clasificadores celulares activados fluorescentes, que pueden tener diversos grados de sofisticación, por ejemplo canales de color múltiple, canales de detección de bajo ángulo y dispersión de luz obtusa, canales de impedancia, etc. Las células pueden seleccionarse frente a células muertas empleando tintes que se asocian con las células muertas (por ejemplo yoduro de propidio). Puede emplearse cualquier técnica que no cause un detrimento indebido de la viabilidad de las células seleccionadas.

Los reactivos de afinidad pueden ser receptores o ligandos específicos para las moléculas de superficie celular indicadas más arriba. Además de los reactivos de anticuerpo, pueden utilizarse pares péptido-antígeno MHC y pares receptores de células T; ligandos peptídicos y receptor; moléculas efectoras y receptoras y similares. Los anticuerpos y los receptores de células T pueden ser monoclonales o policlonales y pueden producirse mediante animales trans-
 5 génicos, animales inmunizados, células B humanas o animales immortalizadas, células transfectadas con vectores de ADN que codifican el anticuerpo o el receptor de célula T, etc. Los expertos medios en la materia conocen los detalles de la preparación de anticuerpos y su adecuación para la utilización como miembros de unión específicos.

Es de interés particular la utilización de anticuerpos como reactivos de afinidad. Convenientemente, dichos anti-
 10 cueros se conjugan con una etiqueta para su utilización en separación. Las etiquetas incluyen cuentas magnéticas, que permiten una separación directa, biotina, que puede eliminarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que pueden utilizarse con un clasificador de células activadas fluorescente, o similar, para facilitar la separación del tipo celular particular. Los fluorocromos que pueden encontrar utilidad incluyen las ficobiliproteínas, por ejemplo ficoeritrina y alofococianinas, la fluoresceína y rojo de Texas. Frecuentemente, cada anticuerpo se etiqueta
 15 con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente de cada marcador.

Los anticuerpos se añaden a una suspensión de células y se incuban durante un período de tiempo suficiente para que se unan a los antígenos de superficie celular accesibles. La incubación será habitualmente de como mínimo aproximadamente 5 minutos y habitualmente menos de aproximadamente 30 minutos. Es deseable que haya una
 20 concentración suficiente de anticuerpos en la mezcla de reacción, de manera que la eficiencia de la separación no esté limitada por la falta de anticuerpo. La concentración apropiada se determina por valoración. El medio en el cual las células se separan será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es una disolución salina tamponada fosfato que contenga de un 0,1 a un 0,5% de BSA. Diversos medios son comercialmente accesibles y pueden utilizarse según la naturaleza de las células, incluyendo el Medio de Tagle Modificado por Dulbecco (dMEM),
 25 la Disolución Salina Básica de Hank (HBSS), la disolución salina tamponada fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, el medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc, suplementada frecuentemente con suero bovino fetal, BSA, HSA, etc.

Las células etiquetadas se separan a continuación dependiendo de la expresión de c-kit, IL-7R α y panel lin. La población seleccionada es alta en c-kit, lin negativa, IL-7R α negativa. Opcionalmente, la población celular se divide
 30 también en subclases dependiendo de la expresión de Fc γ R y CD34.

Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, habitualmente con una almohada de suero al fondo del tubo de recogida. Diversos medios son disponibles comercial-
 35 mente y pueden utilizarse según la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPB, RPMI, medio de Iscove, etc, frecuentemente suplementado con suero bovino fetal.

Las composiciones altamente enriquecidas en actividad progenitora mieloides se consiguen de esta manera. La población objeto será de o alrededor de un 90% o más de la composición celular y preferentemente de o alrededor de un 95% o más de la composición celular. Las células deseadas se identifican por su fenotipo de superficie, por la
 40 capacidad de responder a factores de crecimiento y por la capacidad de proporcionar el desarrollo *in vitro* o *in vitro* de linajes mieloides múltiples. La población celular enriquecida puede utilizarse inmediatamente o puede congelarse a las temperaturas del nitrógeno líquido y almacenarse durante largos períodos de tiempo, descongelándose y siendo capaz de ser reutilizada. Las células se almacenarán habitualmente en medio 1640 con DMSO al 10%, FCS al 50%, RPMI al 40%. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse mediante la utilización de factores de crecimiento o
 45 células del estroma asociadas con la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

La población celular enriquecida puede crecer *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido, por ejemplo conteniendo agar, metilcelulosa, etc. La población celular puede suspen-
 50 derse convenientemente en un medio nutriente apropiado, por ejemplo DMEM modificado de Iscove o RPMI-1640, normalmente suplementado con suero bovino fetal (aproximadamente el 5-10%), L-glutamina, un tiol, en particular 2-mercaptoetanol y antibióticos, por ejemplo penicilina y estreptomina.

El cultivo puede contener factores de crecimiento a los cuales respondan las células. Los factores de crecimiento, tal como se han definido aquí, son moléculas capaces de promover la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación
 55 de las células, bien en cultivo o en el tejido intacto, mediante efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen factores polipeptídicos y no polipeptídicos. Algunos factores de crecimiento específicos que pueden utilizarse en el cultivo de las células objeto incluyen el factor steel (ligando c-kit), el ligando Flk-2, IL-11, IL-3, GM-CSF, eritropoyetina y trombopoyetina. Las condiciones de cultivo específicas se escogen de tal manera que se consiga un objetivo particular, por ejemplo la diferenciación en poblaciones eritroides o megacariocíticas, el
 60 mantenimiento de actividad celular progenitora, etc.

Además de, o en vez de factores de crecimiento, las células objeto pueden hacerse crecer en co-cultivo con células layer stromal o feeder. Las células stromal adecuadas para ser utilizadas en el crecimiento de células hematopoyéticas son conocidas en el estado de la técnica. Estas incluyen stroma de médula espinal tal como se utiliza en "Whitlock-
 65 Witte" (Whitlock *et al.* [1985] Annu Rev Immunol 3:213-235) o condiciones de cultivo "Dexter" (Dexter *et al.* [1977] J Exp Med 145:1612-1616) y células stromal de timo heterogéneas (Small y Weissman [1996] Scand J Immunol 44:115-121).

Las células cultivadas objeto pueden utilizarse en una gran variedad de maneras. El medio nutriente, que es un medio condicionado, puede aislarse en varias etapas y pueden analizarse los componentes. La separación puede conseguirse mediante HPLC, HPLC de fase reversa, electroforesis en gel, enfoque isoeléctrico, diálisis u otras técnicas no degradativas, que pueden permitir la separación por peso molecular, por volumen molecular, por carga, combinaciones de los mismos o similares. Una o más de dichas técnicas pueden combinarse para enriquecer más fracciones específicas.

Las células progenitoras pueden utilizarse conjuntamente con el sistema de cultivo en el aislamiento y evaluación de factores asociados con la diferenciación y maduración de células linfoides. Así pues, las células progenitoras pueden utilizarse en ensayos para determinar la actividad del medio, por ejemplo medio condicionado, para evaluar la actividad de factores de crecimiento en fluidos, la implicación con la dedicación de linajes o similares.

Las poblaciones objeto CMP, MEP y/o GMP pueden utilizarse para reconstituir la función mieloide en un receptor, por ejemplo plaquetas, megacariocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células eritroides. La enfermedad puede estar provocada por condiciones genéticas o ambientales, por ejemplo infección por un patógeno como HIV, exposición a radiación, etc. Las células autólogas, en particular si se separan antes de terapia citoreductora u otra terapia, o las células alogénicas pueden utilizarse para el aislamiento de células progenitoras y su subsiguiente trasplante.

Pueden introducirse genes en las células progenitoras mieloides para una diversidad de propósitos, por ejemplo para prevenir infección por HIV, para reemplazar genes que tienen una mutación con pérdida de función, para proporcionar el reconocimiento de un antígeno particular, para suprimir la activación de un receptor de antígeno particular, etc. Alternativamente, se introducen vectores que expresan ARNm antisentido o ribozima, bloqueando de esta manera la expresión de un gen indeseado. Otros procedimientos de terapia génica son la introducción de genes de resistencia a fármaco para permitir que las células progenitoras normales tengan una ventaja y se sometan a una presión selectiva, por ejemplo el gen de resistencia a fármaco múltiple (MDR) o genes anti-apoptosis, por ejemplo bcl-2. Pueden utilizarse diferentes técnicas conocidas en el estado de la técnica para transfectar las células diana, por ejemplo electroporación, ADN precipitado por calcio, fusión, transfección, lipofección y similares. La manera particular en que se introduce el ADN no es crítica para la práctica de la invención.

Muchos vectores útiles para transferir genes exógenos a células de mamífero diana pueden estar a disposición pública. Los vectores pueden ser episomales, por ejemplo plásmidos, virus derivados de vectores, por ejemplo citomegalovirus, adenovirus, etc, o pueden integrarse en el genoma de la célula diana, mediante la recombinación homóloga o integración al azar, por ejemplo vectores derivados de retrovirus, por ejemplo MMLV, HIV-1, ALV, etc. Los vectores basados en retrovirus han mostrado ser particularmente útiles cuando las células diana son células progenitoras hematopoyéticas. Por ejemplo, véase Schwarzenbeger *et al.* (1996) Blood 87:472-478; Nolte *et al.* (1996), P.N.A.S. 93:2414-2419; y Maze *et al.* (1996) P.N.A.S. 93:206-210.

Pueden utilizarse combinaciones de retrovirus y una línea de empaquetamiento apropiada, donde las proteínas de cápside serán funcionales para infectar las células diana. Habitualmente, las células y virus pueden incubarse durante como mínimo aproximadamente 24 horas en el medio de cultivo. Entonces se permite a las células que crezcan en el medio de cultivo durante intervalos cortos para algunas aplicaciones, por ejemplo 24-73 horas o como mínimo dos semanas y puede permitirse que crezcan durante cinco semanas o más, antes de su análisis. Los vectores retrovíricos utilizados comúnmente son "defectivos", es decir, son incapaces de producir proteínas víricas que se requieren para una infección productiva. La replicación del vector requiere el crecimiento en la línea celular de empaquetamiento.

Los vectores lentivíricos, por ejemplo los basados en secuencias gag HIV o FIV pueden utilizarse para transfectar células que no se encuentren en división, por ejemplo la fase en reposo de células madre hematopoyéticas a largo plazo (véase Uchida *et al.* (1998) P.N.A.S. 95(20): 11939-44).

La especificidad del retrovirus por la célula huésped se determina por la proteína de cubierta *env* (p120). La proteína de cubierta se proporciona mediante la línea celular de empaquetamiento. Las proteínas de cubierta son como mínimo de tres tipos, ecotrópicas, anfotrópicas y xenotrópicas. Los retrovirus empaquetados con una proteína de cubierta ecotrópica, por ejemplo MMLV, son capaces de infectar la mayoría de tipos celulares murinos y de rata. Las líneas celulares de empaquetamiento ecotrópico incluyen BOSC23 (Pear *et al.* (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396). Los retrovirus que exhiben proteína de cubierta anfotrópica, por ejemplo 4070A (Danos *et al.*, véase más arriba) son capaces de infectar la mayoría de tipos celulares de mamífero, incluyendo humanos, de perro y de ratón. Las líneas de celulares de empaquetamiento anfotrópicas incluyen PA12 (Millar *et al.* (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Millar *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902) GRIP (Danos *et al.* (1988) PNAS 85: 6460-6464). Los retrovirus empaquetados con proteína de cubierta xenotrópica, por ejemplo AKR *env*, son capaces de infectar la mayoría de tipos celulares de mamífero, excepto las células murinas.

Las secuencias en los extremos 5' y 3' del retrovirus son secuencias de repetición terminales largas (LTR). Se conoce en el estado de la técnica una diversidad de secuencias LTR y pueden utilizarse, incluyendo MMLV-LTR; HIV-LTR; AKR-LTR; FIV-LTR; ALV-LTR; etc. Puede accederse a las secuencias específicas a través de bases de datos públicas. También se conocen diversas modificaciones de las secuencias LTR nativas. La LTR 5' actúa como un fuerte promotor, conduciendo la transcripción del gen introducido después de la integración en un genoma celular diana. Sin embargo, para algunos usos, es deseable tener un promotor regulable conduciendo la expresión. Si se incluye un promotor de este tipo, la función promotora de la LTR se inactivará. Esto se consigue mediante delección de la

región U3 en la LTR 3', incluyendo las secuencias de repetición potenciadoras y el promotor, lo cual es suficiente para inactivar la función promotora. Después de integrarse en un genoma celular diana, hay una reorganización de la LTR 5' y 3' que da como resultado un provirus que carece de función transcripcional, denominado "vector autoinactivable".

5 Los vectores pueden incluir genes que deben quitarse más tarde, por ejemplo utilizando un sistema de recombinasa, por ejemplo Cre/Lox o las células que los expresan deben destruirse más tarde, por ejemplo incluyendo genes que permiten una toxicidad selectiva, por ejemplo el herpesvirus TK, bcl-xs, etc.

10 Algunos promotores inducibles adecuados se activan en un tipo celular diana deseado, bien la célula transfectada o la progenie de la misma. Mediante la activación transcripcional se pretende que la transcripción aumente por encima de los valores basales en la célula diana como mínimo aproximadamente en un factor de 100, más habitualmente como mínimo aproximadamente en un factor de 1000. Se conocen diversos promotores que son inducidos en tipos celulares hematopoyéticos.

15 Para demostrar que se tienen células progenitoras modificadas genéticamente, pueden emplearse diversas técnicas. El genoma de las células puede restringirse y utilizarse con o sin amplificación. Puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa; la electroforesis en gel; el análisis de restricción; el Southern, Northern y Western blot; la secuenciación; o similares. Las células pueden hacerse crecer bajo diversas condiciones para asegurar que las células son capaces de madurar para dar todos los linajes mieloides, manteniendo la capacidad de expresar el ADN introducido. 20 Pueden utilizarse diversos análisis *in vitro* e *in vitro* para asegurar que se ha mantenido la capacidad pluripotencial de las células.

Las células progenitoras pueden administrarse en cualquier medio fisiológicamente aceptable, normalmente intravascularmente, aunque también pueden introducirse en hueso u otra localización adecuada, donde las células puedan 25 encontrar un lugar apropiado para su regeneración y diferenciación. Habitualmente, se administrará como mínimo 1×10^5 células, preferentemente 1×10^6 o más. Las células pueden introducirse por inyección, catéter o similar. Las células pueden congelarse a las temperaturas del nitrógeno líquido y almacenarse durante largos periodos de tiempo, pudiéndose utilizar tras su descongelación. Si se congelan, las células se almacenarán habitualmente en medio 1640 con DMSO al 10%, FCS al 50%, RPMI al 40%. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse mediante la 30 utilización de factores de crecimiento y/o células del estroma asociadas con la proliferación y diferenciación de células progenitoras.

Las células objeto son útiles para ensayos *in vitro* y para cribado para detectar factores que son activos sobre progenitores mieloides, particularmente aquellos que son específicos para los linajes mieloides, incluyendo los linajes 35 megacariocíticos y los linajes eritroides y que no afectan a las células linfoides. Los ensayos de cribado de agentes que son activos sobre las células humanas son de interés particular. Puede utilizarse una gran variedad de ensayos para este fin, incluyendo inmunoensayos para la unión a proteína; la determinación del crecimiento celular, la diferenciación y la actividad funcional; la producción de citoquinas, por ejemplo IL-1; y similares.

40 El examen de la expresión génica en las subclases progenitoras mieloides de la invención es de interés particular. La clase de genes expresada puede compararse entre las subclases progenitoras mieloides o con otras subclases hematopoyéticas, tal como se ha descrito en el estado de la técnica. Por ejemplo, para determinar los genes que se regulan durante el desarrollo megacariocítico, podría compararse la clase de genes expresados en la clase progenitora MEP con CMP, o con los progenitores GM, o con células madre o con células progenitoras linfoides.

45 Puede utilizarse cualquier procedimiento cualitativo o cuantitativo adecuado descrito en el estado de la técnica para detectar ARNm específicos. Puede detectarse ARNm mediante, por ejemplo, la hibridación a un biochip, mediante hibridación *in situ* en secciones de tejido, mediante PCR con transcriptasa reversa o en Northern blots que contienen ARNm poli A+. Un experto medio en la técnica puede utilizar fácilmente dichos procedimientos para determinar 50 diferencias en el tamaño o en la cantidad de transcritos de ARNm entre dos muestras. Por ejemplo, el nivel de ARNMs particulares en células MEP se compara con la expresión de los ARNMs en una muestra de referencia, por ejemplo células CMP.

Puede utilizarse cualquier procedimiento adecuado para detectar y comparar niveles de expresión de ARNm en 55 una muestra en conexión con los procedimientos de la invención. Por ejemplo, la expresión de niveles de ARNm en una muestra puede determinarse mediante la generación de una biblioteca de expressed sequence tags (ESTs) a partir de una muestra. La enumeración de la representación relativa de ESTs dentro de la biblioteca puede utilizarse para aproximar la representación relativa de un transcripto génico en la muestra de partida. Los resultados del análisis EST de una muestra de ensayo puede compararse entonces al análisis EST de una muestra de referencia para determinar 60 los niveles de expresión relativa de un polinucleótico seleccionado, en particular un polinucleótido que corresponda a uno o más de los genes expresados diferencialmente descritos en el presente documento.

Alternativamente, la expresión génica en una muestra de ensayo puede llevarse a cabo utilizando la metodología de análisis en serie de la expresión génica (SAGE) (Velculescu *et al.*, Science (1995) 270:484). En resumen, SAGE 65 implica el aislamiento de un marcador de secuencia expresada único corto a partir de una localización específica dentro de cada transcripto. Los marcadores de secuencia se concatenan, se clonan y se secuencian. La frecuencia de transcritos particulares dentro de la muestra de partida se refleja por el número de veces que el marcador de secuencia asociado se encuentra en la población de secuencias.

La expresión génica en una muestra de ensayo puede analizarse también utilizando la metodología de representación diferencial (DD). En DD, fragmentos definidos por delimitadores de secuencia específicos (por ejemplo dianas de enzimas de restricción) se utilizan como los identificadores únicos de genes, acoplados con información sobre la longitud de un fragmento o la localización de un fragmento dentro del gen expresado. La representación relativa de un gen expresado en una muestra puede estimarse entonces en base a la representación relativa del fragmento asociado con dicho gen dentro de la combinación de todos los fragmentos posibles. Algunos procedimientos y composiciones para llevar a cabo DD son bien conocidos en el estado de la técnica, véase, por ejemplo U.S. 5,776,683; y U.S. 5,807,680.

Alternativamente, puede analizarse la expresión génica en una muestra utilizando análisis de hibridación, que se basa en la especificidad de las interacciones de nucleótidos. Pueden utilizarse oligonucleótidos o ADNc para identificar selectivamente o capturar ADN o ARN de una composición de secuencia específica y la cantidad de ARN o ADNc que se hibrida a una secuencia de captura conocida determinada cualitativamente o cuantitativamente, para proporcionar información sobre la representación relativa de un mensaje particular en la combinación de mensajes celulares en una muestra. Puede diseñarse un análisis de hibridación para permitir un cribado concurrente de la expresión relativa desde cientos a miles de genes utilizando, por ejemplo, tecnologías basadas en matriz que tienen formatos de elevada densidad, incluyendo filtros, cortes de microscopio o microchips o tecnologías basadas en disolución que utilizan análisis espectroscópico (por ejemplo espectrometría de masas). Una utilización a modo de ejemplo de las matrices en los procedimientos de diagnóstico de la invención se describe con mayor detalle más abajo.

Puede llevarse a cabo hibridación a matrices, produciéndose las matrices según cualquier procedimiento adecuado conocido en el estado de la técnica. Por ejemplo, algunos procedimientos para producir grandes matrices de oligonucleótidos se describen en U.S. 5,134,854 y U.S. 5,445,934 utilizando técnicas de síntesis dirigidas por luz. Utilizando un sistema controlado por ordenador, se convierte una matriz heterogénea de monómeros en una matriz heterogénea de polímeros, mediante un acoplamiento simultáneo en una variedad de sitios de reacción. Alternativamente, se generan biochips mediante la deposición de oligonucleótidos presintetizados sobre un sustrato sólido, por ejemplo tal como se describe en la solicitud de PCT publicada con el número WO 95/35505.

Algunos procedimientos para recoger datos a partir de la hibridación de muestras a una matriz también son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, pueden generarse polinucleótidos de las muestras celulares utilizando una marca fluorescente detectable y puede detectarse la hibridación de los polinucleótidos en las muestras mediante una exploración de la presencia de la marca detectable en los biochips. Algunos procedimientos y dispositivos para detectar dianas marcadas por fluorescencia sobre dispositivos son bien conocidas en el estado de la técnica. Generalmente, dichos dispositivos de detección incluyen un microscopio y una fuente de luz para dirigir la luz al sustrato. Un contador de fotones detecta la fluorescencia a partir del sustrato, mientras que una etapa de traslación x-y varía la localización del sustrato. Un instrumento de detección confocal que puede utilizarse en los procedimientos objeto se describe en la patente U.S. número 5,631,734. Se describe un microscopio de exploración por láser en Salón *et al.*, Genome Res. (1996) 6: 639. Se lleva a cabo una exploración, utilizando la línea de excitación apropiada, para cada fluoróforo utilizado. Las imágenes digitales generadas a partir de la exploración se combinan entonces para su análisis posterior. Para cualquier elemento de matriz particular, la relación de la señal fluorescente de una muestra se compara a la señal fluorescente de otra muestra, y se determina la intensidad de señal relativa.

Algunos procedimientos para analizar los datos recogidos de la hibridación a matrices son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, si la detección de la hibridación implica una marca fluorescente, el análisis de datos puede incluir las etapas de determinar la intensidad de fluorescencia como una función de la posición del sustrato a partir de los datos recogidos, de eliminar valores extremos, es decir, datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada y calcular la afinidad de unión relativa de las dianas a partir del resto de datos. Los datos resultantes pueden representarse como una imagen con intensidad variable en cada región dependiendo de la afinidad de unión entre dianas y sondas.

Puede llevarse a cabo una casación de patrones manualmente, o puede realizarse utilizando un programa de ordenador. Algunos procedimientos para la preparación de matrices de sustrato (por ejemplo matrices), para el diseño de oligonucleótidos para utilizar con dichas matrices, para el marcaje de sondas, de condiciones de hibridación, para la exploración de matrices hibridadas y para el análisis de patrones generados, incluyendo el análisis comparativo, se describen, por ejemplo, en U.S. 5,800,992.

En otro procedimiento de cribado, se ensaya el nivel de un polipéptido con secuencias CMP en la muestra de ensayo. Puede llevarse a cabo un diagnóstico utilizando cualquiera entre una variedad de procedimientos para determinar la ausencia o presencia de cantidades alteradas de un polipéptido expresado de manera diferencial en la muestra de ensayo. Por ejemplo, la detección puede utilizar la tinción de células o secciones histológicas (por ejemplo de una muestra de biopsia) con anticuerpos marcados, llevada a cabo según procedimientos convencionales. Las células pueden permeabilizarse para teñir moléculas citoplasmáticas. En general, los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido expresado de manera diferencial de la invención se añaden a una muestra y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión al epítipo, habitualmente como mínimo aproximadamente 10 minutos. El anticuerpo puede marcarse para su detección mediante detección directa (por ejemplo utilizando radioisótopos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes y similares) o puede utilizarse conjuntamente con un anticuerpo o reactivo de segunda etapa para detectar la unión (por ejemplo biotina con avidina conjugada a la peroxidasa de rábano picante, un anticuerpo secundario conjugado a un compuesto fluorescente, por ejemplo fluoresceína,

rodamina, rojo de Texas, etc). La ausencia o presencia de unión a anticuerpo puede determinarse mediante diversos procedimientos, incluyendo citometría de flujo de células disociadas, microscopía, radiografía, contador de centelleo, etc. Puede utilizarse cualquier procedimiento alternativo para la detección cualitativa o cuantitativa de niveles o cantidades de polipéptidos expresados de manera diferencial, por ejemplo ELISA, Western blot, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, etc.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se indican para proporcionar a los expertos medios en la técnica una divulgación y descripción sobre cómo hacer y utilizar la invención objeto y no se pretende que limiten el alcance de lo que se considera invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar exactitud respecto a los números utilizados (por ejemplo cantidades, temperatura, concentraciones, etc) pero debe permitirse algún error experimental y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, partes son partes en peso, peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura es en grados centígrados; y la presión es alrededor o cerca de la presión atmosférica.

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos descritos, dado que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada aquí tiene como objeto sólo describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que se limitará sólo mediante las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se utiliza aquí, las formas singulares “a”, “y” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a “la proteína” incluye referencia a una o más proteínas y equivalentes de las mismas conocidas para los expertos medios en la materia y así sucesivamente. Todos los términos técnicos i cinéticos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto medio en la materia a la cual pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

Ejemplo 1

Aislamiento de un progenitor mieloide común

La Figura 1A muestra el perfil de expresión de Sca-1/c-Kit del linaje (Lin⁻) fracción IL-7Rα. *In vitro*, la actividad de la unidad formadora de colonias mieloeritroide (CFU) se encontró exclusivamente en la fracción c-Kit+, pero no en la fracción c-Kit-. Las células Lin- IL-7Rα- c-Kit+ contenían células Sca-1+ y Sca-1-. La población Lin- IL-7Rα- Sca-1- c-Kit+ se encuentra altamente enriquecida en HSC1-3, y una mayoría de la población HSC era receptor Fc γ II/III (FcγR)lo CD34+. Por otro lado, las células Lin- IL-7Rα- Sca-1- c-Kit+ se subdividieron en tres subpoblaciones según el perfil de expresión de FcγR y CD34: las poblaciones FcγR^{lo} CD34+, FcγR^{lo} CD34- y FcγR^{hi} CD34+ (Figura 1B). El receptor CSF-1 (receptor CSF de macrófagos {M-CSFR}), receptor CSF de granulocitos (G-CSFR), y la cadena b común (bc) (la subunidad indispensable de los receptores para IL-3, IL-5 y el factor estimulador de colonias de granulocito/macrófago {GM-CSF}), son los que más se expresan en la población FcγR^{hi}, lo cual sugiere que las células FcγR^{hi} CD34+ están destinadas a linajes granulocito/macrófago (Figura 1B).

La actividad metilcelulosa CFU para cada una de las poblaciones anteriores se muestra en las Figuras 2 y 3. En presencia de factor steel (SLF), ligando flt-3 (FL), interleucina (IL)-3, IL-11, GM-CSF, trombopoyetina (Tpo) y eritropoyetina (Epo), >90% de las células de selección única FcγR^{lo} CD34+ dieron lugar a diversos tipos de colonias mieloeritroides, incluyendo CFU-GEMMeg, unidad formadora de brotes - eritroide (BFU-E), megacariocitos-CFU (CFU-Meg), CFU-granulocito/macrófago (CFU-GM), CFU-granulocito (CFU-G) y CFU-macrófago (CFU-M). Sorprendentemente, la población FcγR^{hi} CD34+ population generó sólo colonias CFU-M, CFU-G, o CFU-GM que contenían macrófagos y/o granulocitos en respuesta a cualquiera de las combinaciones de factores. Por el contrario, las células FcγR^{lo} CD34- dieron lugar estrictamente a colonias CFU-Meg, BFU-E, o CFU-MEP que sólo contenían megacariocitos y/o eritrocitos en respuesta a IL-3, GM-CSF, Tpo and Epo, pero que no formaban colonias en ausencia de Tpo y Epo. Las tres poblaciones progenitoras mieloides no requieren “citoquinas de acción temprana” tales como SLF, FL y IL-11 para iniciar la formación de clonias, mientras que HSC dependen en gran medida de dichas citoquinas, tal como se ha descrito previamente 6.

Todos estos progenitores mostraron una actividad diferenciadora rápida *in vitro* (Figura 4). Seis días después de la inyección de 10.000 células FcγR^{lo} CD34+ en ratones receptores irradiados letalmente, tanto células mielomonocíticas Gr-1+/Mac-1+ como células eritroides TER119+ fueron detectables en bazo y médula espinal. Por el contrario, 10.000 células transientes FcγR^{hi} CD34+ sólo dieron lugar a células Gr-1+/Mac-1+, mientras que la población FcγR^{lo} CD34- sólo reconstituyó células TER119+ cells. De acuerdo con lo anterior, la mayoría de actividad de unidad formadora de colonias en bazo (CFU-S) en el día 8 - comprendida en gran medida células eritroides -, residía en la población FcγR^{lo} CD34- (Tabla 1). Las células FcγR^{lo} CD34+ dieron lugar por encima de cuatro veces menos colonias en el día 8, mientras que las células FcγR^{hi} CD34+ no tenían actividad detectable. Algunas CFU-S del día 12 - que comprendían células multipotenciales 7,8 - también derivaron de células FcγR^{lo} CD34- y FcγR^{lo} CD34+. Éstas pueden ser remanentes de las colonias del día 8, tal como se ha descrito previamente.

Tabla 1. Frecuencia CFU-S de Poblaciones Progenitoras Hematopoyéticas

LT-HSC	ST-HSC	CMP	MEP-P	G/M-P
Día 12	1/14*	1/200	1/53	< 1/500
1/61*				
Día 8	< 1/100*	1/67	1/15	< 1/500
< 1/100*				
*Estos datos de Morrison y Weissman se presentan a modo comparativo				

Para evaluar la autorenovación de la capacidad proliferativa, coinyectamos 200 HSC (CD45.2-C57B6) con 5.000 células de cada progenitor mieloide (CD45.1-C57B6) en huéspedes CD45.2-C57B6 irradiados letalmente. En este ensayo de reconstitución competitiva, la progenie de las células FcγR^{lo} CD34- o FcγR^{hi} CD34+ no era detectable después de dos semanas. La progenie mieloide a partir de las células FcγR^{lo} CD34+ fue detectable dos semanas tras la inyección. Esto sugiere que estas poblaciones no tenían actividad autorenovadora o tenían una actividad autorenovadora limitada. Estos resultados son consistentes con nuestros descubrimientos previos de que HSC contenido en trasplantes de médula espinal es responsable de la mayoría de las células sanguíneas blancas, plaquetas y células sanguíneas rojas producidas después de dos semanas después del trasplante. No pudimos detectar diferenciación en células B o células T a partir de la población FcγR^{lo} CD34- o FcγR^{hi} CD34+ en ensayos de reconstitución competitiva o de inyección intratímica. La población FcγR^{lo} CD34+ no pudo generar células T, pero 1 de cada 2.800 células en la fracción FcγR^{lo} CD34+ se diferenció en células B *in vitro* mediante el procedimiento descrito previamente. La lectura de células B a partir de CLP en este ensayo es de 1 en 6 células. Así, la baja frecuencia de la lectura de salida de células B a partir de la población FcγR^{lo} CD34+ refleja probablemente una contaminación residual de un progenitor destinado a células B con un fenotipo de superficie celular similar que sólo se hace manifiesta cuando se seleccionan grandes números de células.

Para analizar las relaciones de linaje entre estas tres poblaciones progenitoras mieloides, cultivamos cada población sobre capas de estroma S17 durante 60 horas y se analizaron sus cambios fenotípicos mediante citometría de flujo. Las células Fcγ^{lo} CD34+ dieron lugar a células FcγR^{lo} CD34- y células FcγR^{hi} CD34+ (Figura 5A). Las células reseleccionadas FcγR^{lo} CD34- y FcγR^{hi} CD34+ derivadas de células FcγR^{lo} CD34+ formaron colonias MEP y colonias G/M en metilcelulosa, respectivamente. Por el contrario, ni las células FcγR^{lo} CD34- ni las células FcγR^{hi} CD34+ dieron lugar a los otros dos subtipos de células progenitoras; la progenie derivada de ambas poblaciones reguló negativamente rápidamente la expresión c-Kit y se diferenció en tipos celulares maduros. Así, FcγR^{lo} CD34+ CMP se encuentra secuenciada arriba tanto en las células FcγR^{lo} CD34- como en las células FcγR^{hi} CD34+ que están destinadas a los linajes MEP y G/M, respectivamente.

Entre los diferentes factores de transcripción, GATA-1 ha mostrado jugar un papel crítico en el compromiso de los progenitores multipotenciales a los linajes eritroides y megacariocíticos mediante la activación del promotor del receptor Epo (Epo-R). La expresión de GATA-1 fue detectable en FcγR^{lo} CD34+ CMP, y era muy pronunciado en los progenitores FcγR^{lo} CD34- MEP (Figura 5B). Por el contrario, ni los progenitores FcγR^{hi} CD34+ G/M ni HSC expresaron niveles detectables de GATA-1. El patrón de expresión de Epo-R correlacionó con el de GATA-1.

Estudios de reclonación utilizando células formadoras de colonias multipotentes sugiere que el compromiso mieloide es un suceso asimétrico y que el compromiso de linaje no sigue necesariamente un patrón específico *in vitro*. La identificación de un progenitor mieloide común, además del progenitor linfoide común descrito previamente, sugiere que el compromiso con los linajes mieloide o linfoide sucede relativamente temprano después de la diferenciación HSC. La capacidad de diferenciación restringida, tanto *in vitro* como *in vivo*, hacia los linajes mieloide o linfoide, a partir de cada progenitor, sugiere también que se encuentra raramente un cruce o plasticidad a través de estos linajes una vez que HSC se diferencian hasta estos puntos. De manera similar, la capacidad de diferenciación restringida de CMP a los linajes eritroide / megacariocítico o mielomonocítico sugiere que esta selección en el desarrollo se regula específicamente y puede implicar una expresión diferencial de los genes que controlan la transcripción, por ejemplo GATA-1. El descubrimiento de CMP, así como sus descendientes con linaje restringido, deben proporcionar el medio para estudiar los sucesos moleculares que se encuentran detrás de la determinación de linaje, analizar si el compromiso de linaje es estocástico o instructivo, y pueden mejorar nuestro entendimiento sobre cómo quedan afectados los linajes específicos en las leucemias no linfoides.

Métodos

Cepas de ratón

- 5 Las cepas congénitas de ratón, C57BL/Ka-Thy1.1 (CD45.2) y C57BL/Ka-Thy1.1-CD45.1 se utilizaron como se describe. Se generaron ratones C57BU6 RAG-2-/- (CD45.2) cruzando ratones C57BL/6 RAG-2-/- (CD45.1) con C57BL/6-CD45.2. Los ratones C57BL/6 RAG-2-/- (CD45.2) se utilizaron como receptores.

Tinción celular y selección

- 10 Se tiñeron células de médula ósea con anticuerpos biotinilados específicos para marcadores de linaje (Lin) (CD3: KT31.1, CD4: GK1.5, CD8: 53-6.7, B220: 6B2, Gr-1: 8C5, TER119, y CD19: 1D3, IgM: R6-60.2 (Pharmingen)), y IL-7Ra (A7R34). Las células Lin+ se extrajeron parcialmente con cuentas inmunomagnéticas conjugadas con IgG anti-rata de oveja (Dynabeads M-450, Dynal A.S., Oslo, Noruega), y las células remanentes se tiñeron con avidina-Cy5-
15 PE (Tricolor) (Caltag, Burlingame, CA). Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-FcγR conjugado a PE (2.4G2), CD34 conjugado a FITC (RAM34) (Pharmingen), anti-Sca-1 conjugado a rojo de Texas (E13-161-7) y anti-c-Kit conjugados a APC (2B8) monoclonal antibodies. También se utilizaron anticuerpos anti-cadena β común conjugados a FITC (9D3) y anticuerpos anti-M-CSFR de ratón. Las células se seleccionaron o analizaron tal como se ha descrito previamente (Kondo *et al.* (1997), véase más arriba).

Ensayos in vitro e in vitro para determinar el potencial de diferenciación de los progenitores

- 20 Para los ensayos de reconstitución, se inyectaron progenitores purificados en el seno venoso retro-orbital de ratones congénitos irradiados letalmente (920 RAD) que solo diferían en el alelo CD45, junto a 200 HSC de tipo huésped. Los receptores RAG-2-/- recibieron 400 RAD. Las inyecciones intratímicas fueron tal y como se ha descrito (Kondo *et al.* (1997), véase más arriba). Los ensayos CFU-S se llevaron a cabo con 100-500 progenitores doblemente seleccionados / ratón, tal como se ha descrito (Traver *et al.* (1998), véase más arriba).

- 30 La evaluación de la formación de colonias mieloides se llevó a cabo mediante un ensayo de metil-celulosa descrito previamente (Morrison *et al.* (1996), véase más arriba). Algunas citoquinas, por ejemplo SLF de ratón (20 ng/ml), IL-3 de ratón (30 ng/ml), IL-11 de ratón (10 ng/ml), GM-CSF de ratón (10 ng/ml), Tpo de ratón (10 ng/ml) y Epo humano (1 U/ml) se compraron a R&D systems (Minneapolis, MN). También se cultivaron progenitores sobre capas de células de estroma S-17 irradiadas (3.000 rad) en placas de 24 pozos con medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) y IL-7 de ratón (10 ng/ml). Todos los cultivos se incubaron a 37°C en
35 una cámara humidificada bajo un 7% de CO₂.

Evaluación de la expresión de GATA-1 y Epo-R

- 40 Se purificó RNA a partir de 10.000 células obtenidas a partir de cada población y se amplificó mediante RT-PCR, tal como se ha descrito previamente 18. Las secuencias de cebadores utilizadas para

(SEQ ID NO:1) GATA-1: 5'-GGAATTCGGGCCCCCTTGTGAGGCCAGAGAG-3' y

(SEQ ID NO:2) 5'-CGGGGTACCTCACGCTCCAGCCAGATTTCGACCC-3', para

- 45 Epo-R: (SEQ ID NO:3) 5'-ATGCCTGTAATCCCAGCACT-3' y (SEQ ID NO:4)

5'-TCATGGTGGTAGCTGGTAGC-3', y para HPRT: (SEQ ID NO:5)

- 50 5'-GTTCTTTGCTGACCTGCTGG-3' y (SEQ ID NO:6)

5'-TGGGGCTGTACTGCTTAACC-3'. La longitud esperada de los productos es de 375 bp, 581 bp y 400 bp, respectivamente. Las muestras se desnaturalizaron (94°C, 30 sec), se hibridaron (55°C, 2 min) y se elongaron (72°C, 3 min) durante 40 ciclos.

- 55 Las publicaciones comentadas más arriba y a lo largo del texto, se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de solicitud de la presente invención. Nada en las mismas debe considerarse como una admisión de que los inventores no están autorizados para anticipar dicha divulgación en virtud de una invención previa.

Referencias citadas en la descripción

- 60 Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5061620 A [0034]
- US 5445934 A [0072]
- US 5087570 A [0034]
- WO 9535505 A [0072]
- US 5776683 A [0070]
- US 5631734 A [0073]
- US 5807680 A [0070]
- US 5800992 A [0075]
- US 5134854 A [0072]
- WO 60141421 A [0093]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **ORKIN**. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1996, vol. 6, 597-602 [0005]
- **GEORGOPOULOS et al.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 155-176 [0005]
- **SINGH**. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, vol. 8, 160-165 [0005]
- **MORRISON, S.J; WEISSMAN, I.L.** The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1994, vol. 1, 661-673 [0006]
- **SPANGRUDE, G.J; HEIMFELD, S; WEISSMAN, I.L.** Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 1988, vol. 241, 58-62 [0007]
- **KONDO, M; WEISSMAN, I.L; AKASHI, K.** Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 1997, vol. 91, 661-672 [0008]
- **AKASHI, K; KONDO, M; VON FREEDEN-JEFFRY, U; MURRAY, R; WEISSMAN, I.L.** Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell*, 1997, vol. 89, 1033-1041 [0009]
- **OGAWA, M.** Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 1993, vol. 81, 2844-2853 [0010]
- **HEIMFELD, S; HUDAK, S; WEISSMAN, I; RENNICK, D.** The *in vitro* response of phenotypically defined mouse stem cells and myeloerythroid progenitors to single or multiple growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, vol. 88, 9902-9906 [0011]
- **SIMINOVITCH, L; MCCULLOCH, E. A; TILL, J. E.** The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. cell comp. Physiol.*, 1963, vol. 62, 327-336 [0012]
- **MAGLI, M.C; ISCOVE, N.N; ODARTCHENKO, N.** Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. *Nature*, 1982, vol. 295, 527-529 [0013]
- **MIYAMOTO, T et al.** Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood*, 1996, vol. 87, 4789-4796 [0023]
- **SHPALL et al.** *Annu Rev Med*, 1997, vol. 48, 241-251 [0034]
- **MOOG et al.** *Ann Hematol*, 1998, vol. 77 (4), 143-7 [0034]
- **WHITLOCK et al.** *Annu Rev Immunol*, 1985, vol. 3, 213-235 [0051]
- **DEXTER et al.** *J Exp Med*, 1977, vol. 145, 1612-1616 [0051]
- **SMALL; WEISSMAN.** *Scand J Immunol*, 1996, vol. 44, 115-121 [0051]
- **SCHWARZENBERGER et al.** *Blood*, 1996, vol. 87, 72-478 [0056]
- **UCHIDA, N; AGUILA, H.L; FLEMING, W.H; JERABEK, L; WEISSMAN, I.L.** Rapid and sustained hematopoietic recovery in lethally irradiated mice transplanted with purified Thy-1.1lo Lin-Sca-1+ hematopoietic stem cells. *Blood*, 1994, vol. 83, 3758-3779 [0014]
- **SHIVDASANI, R.A; FUJIWARA, Y; MCDEVITT, M.A; ORKIN, S.H.** A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J*, 1997, vol. 16, 3965-3973 [0015]

ES 2 293 912 T3

- **PEVNY, L** *et al.* Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, 1991, vol. 349, 257-260 [0016]
- **ZON, L.I; YOUSSEF, H; MATHER, C; LODISH, H.F; ORKIN, S.H.** Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, vol. 88, 10638-10641 [0017]
- **SUDA, J; SUDA, T; OGAWA, M.** Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors. *Blood*, 1984, vol. 64, 393-399 [0018]
- **ENVER, T; HEYWORTH, C.M; DEXTER, T.M.** Do stem cells play dice?. *Blood*, 1998, vol. 92, 348-351 [0019]
- **METCALF, D.** Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood*, 1998, vol. 92, 345-347 [0020]
- **TRAYER, D; AKASHI, K; WEISSMAN, I.L; LAGASSE, E.** Mice defective in two apoptosis pathways in the myeloid lineage develop acute myeloblastic leukemia. *Immunity*, 1998, vol. 9, 47-57 [0021]
- **MORRISON, S.J; WANDYCH, A.M; AKASHI, K; GLOBERSON, A; WEISSMAN, I.L.** The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 1996, vol. 2, 1011-1016 [0022]
- **NOLTA** *et al.* *P.N.A.S.*, 1996, vol. 93, 2414-2419 [0056]
- **MAZE** *et al.* *P.N.A.S.*, 1996, vol. 93, 206-210 [0056]
- **UCHIDA** *et al.* *P.N.A.S.*, 1998, vol. 95 (20), 11939-44 [0058]
- **PEAR** *et al.* *P.N.A.S.*, 1993, vol. 90, 8392-8396 [0059]
- **MILLER** *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 431-437 [0059]
- **MILLER** *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 2895-2902 [0059]
- **DANOS** *et al.* *PNAS*, 1988, vol. 85, 6460-6464 [0059]
- **VELCULESCU** *et al.* *Science*, 1995, vol. 270, 484 [0069]

REIVINDICACIONES

1. Composición substancialmente pura de células progenitoras mieloides de mamífero, donde como mínimo el 95% de las células en dicha composición se **caracterizan** como *c-kit^{hi}*, *IL-7R α ⁻* *lin⁻*.

2. Composición según la reivindicación 1, donde dichas células progenitoras mieloides se **caracterizan** además como *Fc γ R^{lo}* *CD34⁺*.

3. Composición según la reivindicación 1, donde dichas células progenitoras mieloides se **caracterizan** además como *Fc γ R^{lo}* *CD34⁻*.

4. Composición según la reivindicación 1, donde dichas células progenitoras mieloides se **caracterizan** además como *Fc γ R^{hi}* *CD34⁺*.

5. Composición según la reivindicación 1, donde dichas células se han modificado genéticamente de manera que comprenden un vector de ADN exógeno.

6. Procedimiento para enriquecer una composición de células progenitoras mieloides de mamífero **caracterizadas** como *c-kit^{hi}*, *IL-7R α ⁻* *lin⁻*, dicho procedimiento comprendiendo:

Combinar los reactivos que reconocen específicamente los marcadores *c-kit*, *IL-7R α* y *lin* con una muestra de células hematopoyéticas; y

Seleccionar aquellas células que son *c-kit^{hi}*, *IL-7R α ⁻* *lin⁻*, para proporcionar una población enriquecida de células que tienen actividad progenitora de linaje mieloides.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde dicha muestra de células hematopoyéticas es médula espinal.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde dicha muestra de células hematopoyéticas es sangre periférica movilizada.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, donde dichas células son células de ratón, que comprende además las etapas de:

Combinar los reactivos que reconocen específicamente *Sca-1* con una muestra de células hematopoyéticas; y seleccionar aquellas células que son *Sca-1⁺*.

10. Procedimiento para rastrear secuencias genéticas que se expresan específicamente en las células destinadas al linaje mieloides, dicho procedimiento comprendiendo:

Aislar ARN de una población celular según la reivindicación 1,

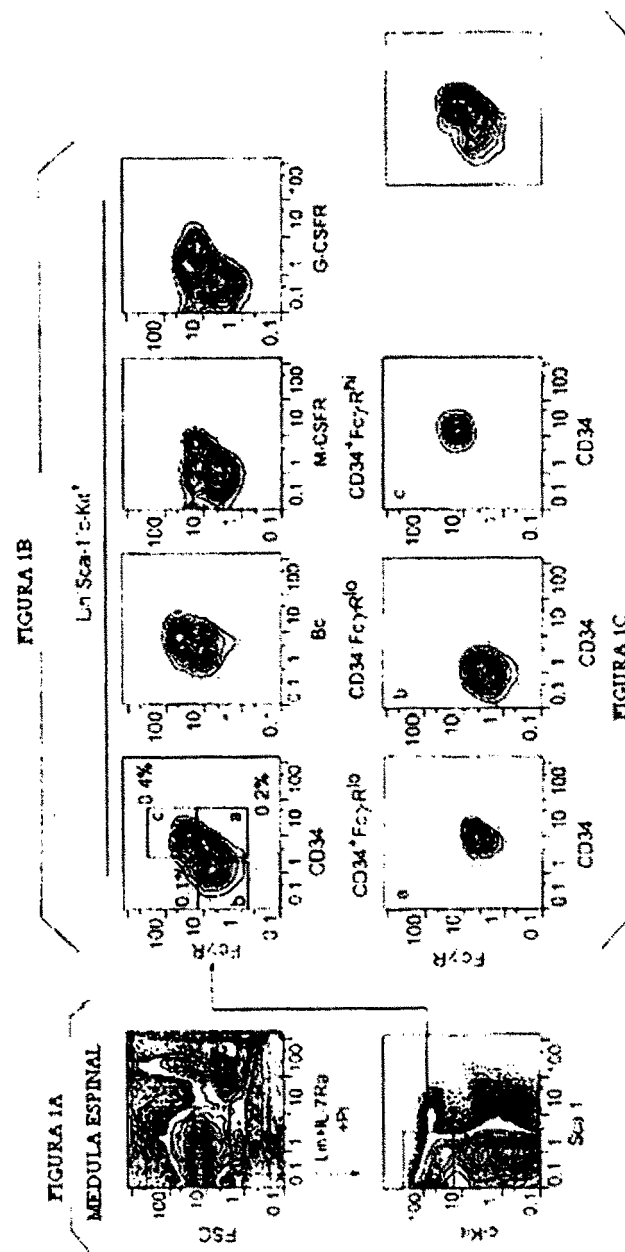
Generar una sonda a partir de dicho ADN,

Rastrear una población de ácidos nucleicos para hibridar a dicha sonda.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende además subdividir dicha población de células, según la expresión de *CD34* y de *FCR γ* .

12. Procedimiento según la reivindicación 11, que comprende además comparar la hibridación obtenida entre dicha subpoblación de células.

13. Procedimiento según la reivindicación 10, donde dicha población de ácidos nucleicos se representa en una matriz.



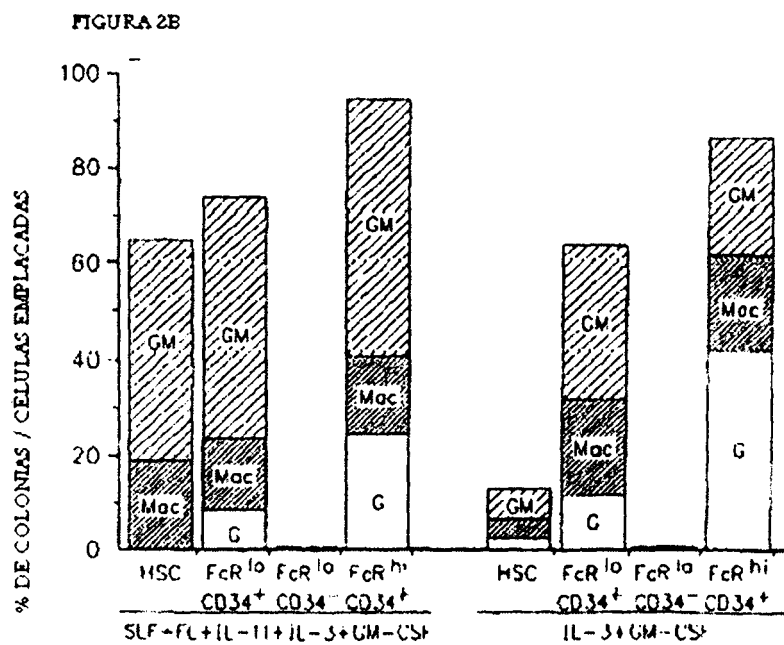
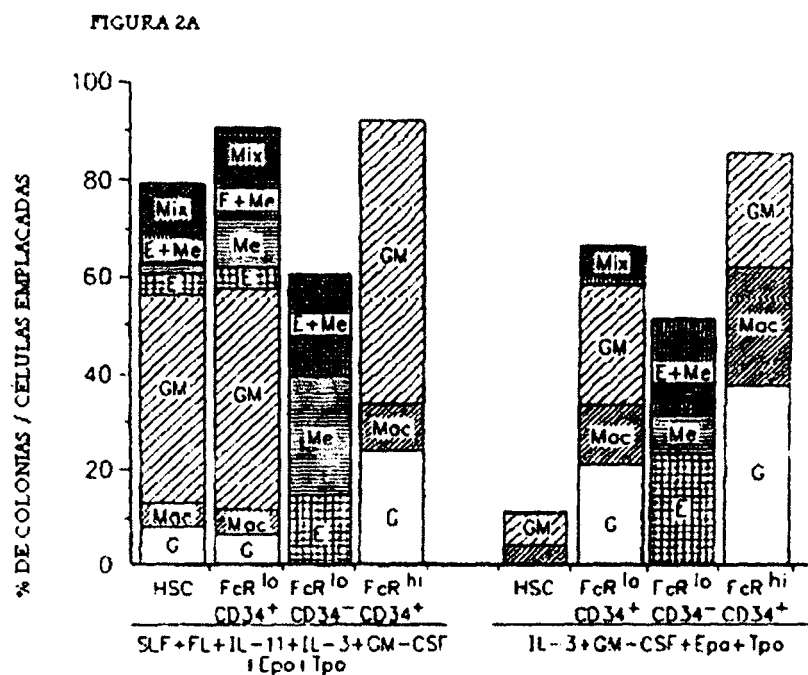


FIGURA 3

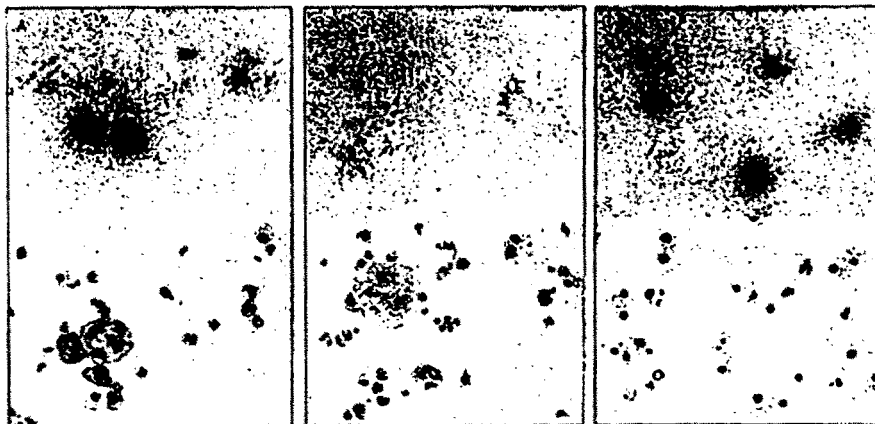


FIGURA 4

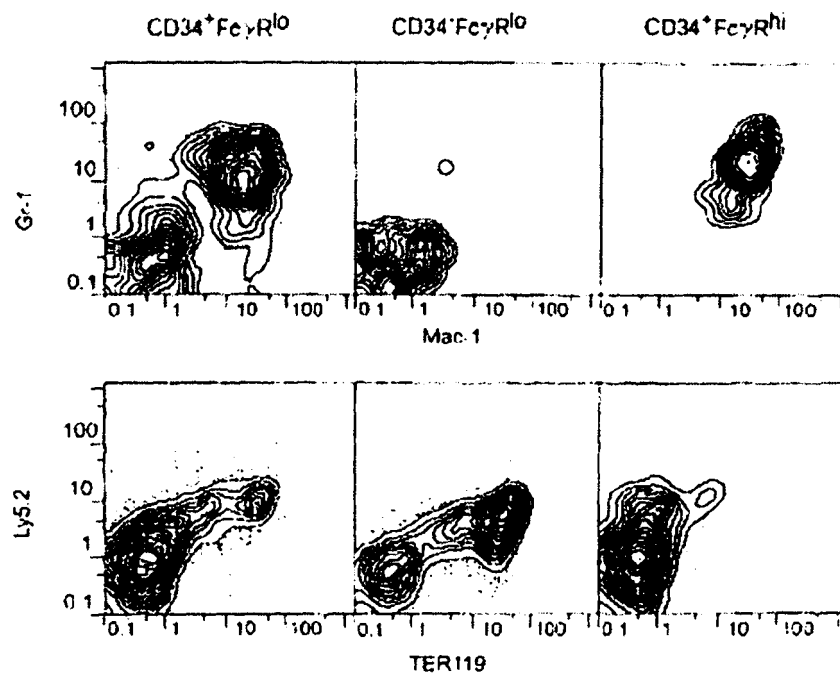


FIGURA 3A

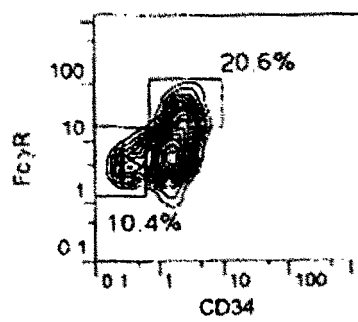
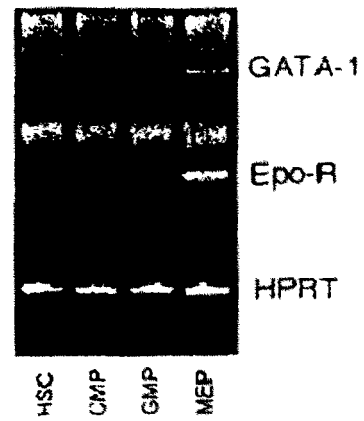


FIGURA 3B



ES 2 293 912 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Irving L. Weissman David Jeffrey Traver Koichi Akashi	
	<120> SUBCLASES DE CÉLULAS PROGENITORAS MIELOIDES DE MAMÍFERO	
	<130> STAN-126WO	
10	<150> 60/141,421	
	<151> 1999-06-29	
	<160> 6	
	<170> FastSEQ para la Windows Versión 4.0	
15	<210> 1	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
25	ggaattcggg cccctgtga ggccagagag	30
	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
35	cgggtacct cacgtccag ccagattcga ccc	33
	<210> 3	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 3	
	atgcctgtaa tccagcact	20
50	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 4	
	tcatggtggt agctggtagc	20
60	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 912 T3

<400> 5		
	gttccttgct gacctgctgg	20
5	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
<400> 6		
15	tggggctgta ctgcttaacc	20
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		