

### 3.3.1.3. LOS RECEPTORES CELULARES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Los FCH presentan en ocasiones respuestas funcionales superpuestas e intercambiables. El grado de homología entre los diferentes factores y, también, entre sus correspondientes receptores podrían explicar estos hallazgos.

Receptores como KIT, FLT3 ó FMS (M-CSFR) se caracterizan por un dominio citoplasmático con actividad tirosin-kinasa, mientras que la mayoría de los otros receptores carecen de esta actividad, y pueden dividirse en 4 subclases (130). La mayoría de los receptores de FCH (HGFR) (clase 1) pertenecen a una superfamilia con homología estructural basada en al menos 2 dominios de fibronectina tipo III ligados. De forma análoga, se encuentran los receptores de los interferones (IFNR) (clase 2) con 2 dominios de fibronectina que sugieren una evolución filogenética a partir de una molécula de adhesión primitiva. La familia del factor de necrosis tumoral (TNFR) (clase 3) está caracterizada por una fracción extracelular de 4 repeticiones de 40 aminoácidos, que contienen 6 residuos cisteína conservados. Finalmente, el receptor de IL1 (IL1R) (clase 4) presenta residuos extracelulares “inmunoglobulina-like”.

El hecho común entre los receptores con ó sin actividad tirosin-kinasa intrínseca es que una vez unido el ligando, promueven homodimerización ó heterodimerización de diferentes subunidades del receptor, y esto es seguido por una rápida fosforilación de los residuos tirosina del dominio citoplasmático del receptor (actividad tirosin-kinasa), y de otras proteínas implicadas en la generación de las cascadas de transmisión de señal (no actividad tirosin-kinasa), como la familia JAKs (131). Esta

simplificación funcional en los mecanismos de transmisión de señal apoya aún más la evidencia de efectos compartidos entre diferentes citoquinas.

Otros vías de transmisión de señal activadas por los receptores de FCH son las proteínas STAT, ó la vía de Ras, revisadas por diversos autores (132).

Para inducir la división celular, la cascada de señales iniciada con la unión del factor soluble (FCH) con su receptor, necesita eventualmente activar la maquinaria celular implicada en el ciclo. Compuesta por ciclinas, kinasas dependientes de ciclinas, y otras proteínas reguladoras. Numerosos datos sugieren que los FCH inducen proliferación celular, actuando a nivel de la fase G1 del ciclo en una familia de ciclinas recientemente descrita, como ciclinas tipo D (133). Un numeroso grupo de estudios inciden sobre el efecto de la sobreexpresión de diferentes tipos de ciclinas (D1, D2 ó D3) y efectos en la proliferación versus diferenciación (134). El conocimiento exhaustivo de estas vías de transmisión de señal y sus efectos sobre la regulación del ciclo celular explicaran mejor los mecanismos de acción de las citoquinas reguladoras de la hemopoyesis y servirán para diseñar mejores estrategias de expansión de CMH.

#### 3.3.1.4. REGULACION DE LA HEMOPOYESIS

Para mantener su homeostasis, el sistema hemopoyético tiene una regulación exquisita de la proliferación y diferenciación, a partir de un reducido número de CMH. En la figura 3.2, se propone un esquema de la jerarquía del sistema hemopoyético.

Una única CMH pluripotente es capaz de producir un gran número de progenitores comprometidos, que a su vez están destinados a diferenciarse en precursores

característicos de cada linaje hemopoyético. Esta CMH es capaz, también, de autorrenovarse. Esta cualidad disminuye a medida que las células inician su proceso de diferenciación. El potencial proliferativo y la diferenciación de las células madre y progenitoras está influenciado por las células accesorias (el microambiente medular) ó factores producidos por ellas. Entre ellas se encuentran linfocitos T, células reticulares de la médula, células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas, ó las células madre mesenquimales, que las originan (135). Los progenitores comprometidos responden a reguladores humorales producidos a nivel sistémico ó local, para diferenciarse a un linaje determinado. Bajo este tipo de control, la amplificación en la producción de células maduras ocurre a este nivel (127). Para la mayoría de los linajes hemopoyéticos, parece existir al menos dos reguladores humorales de su proceso de diferenciación que actúan de forma secuencial. Un grupo, que actuaría en las fases más inmaduras de los progenitores, y que promovería proliferación, y un segundo grupo de actuación más tardía que amplificaría la respuesta a la vez que desarrollarían los procesos de diferenciación linaje-específico (115). Para producir la diferenciación celular se necesita un microambiente adecuado que según la época ontogénica se sitúa en el hígado fetal, bazo, ó finalmente en la MO. La capacidad de las CMH de encontrar su nicho de desarrollo depende de su capacidad de anidación sobre el microambiente adecuado. Eso está mediado por lectinas que se unen a manosa ó galactosa presente en el glicocalix de las células estromales (136).

Las CMH “deciden” la realización de divisiones autorrenovativas ó de diferenciación mediante un mecanismo “estocástico”, por cuanto células individualizadas pueden producir diferentes decisiones basadas en el azar: autorrenovación, generación de pocas células comprometidas ó gran cantidad de ellas (137). Esto sugiere que la

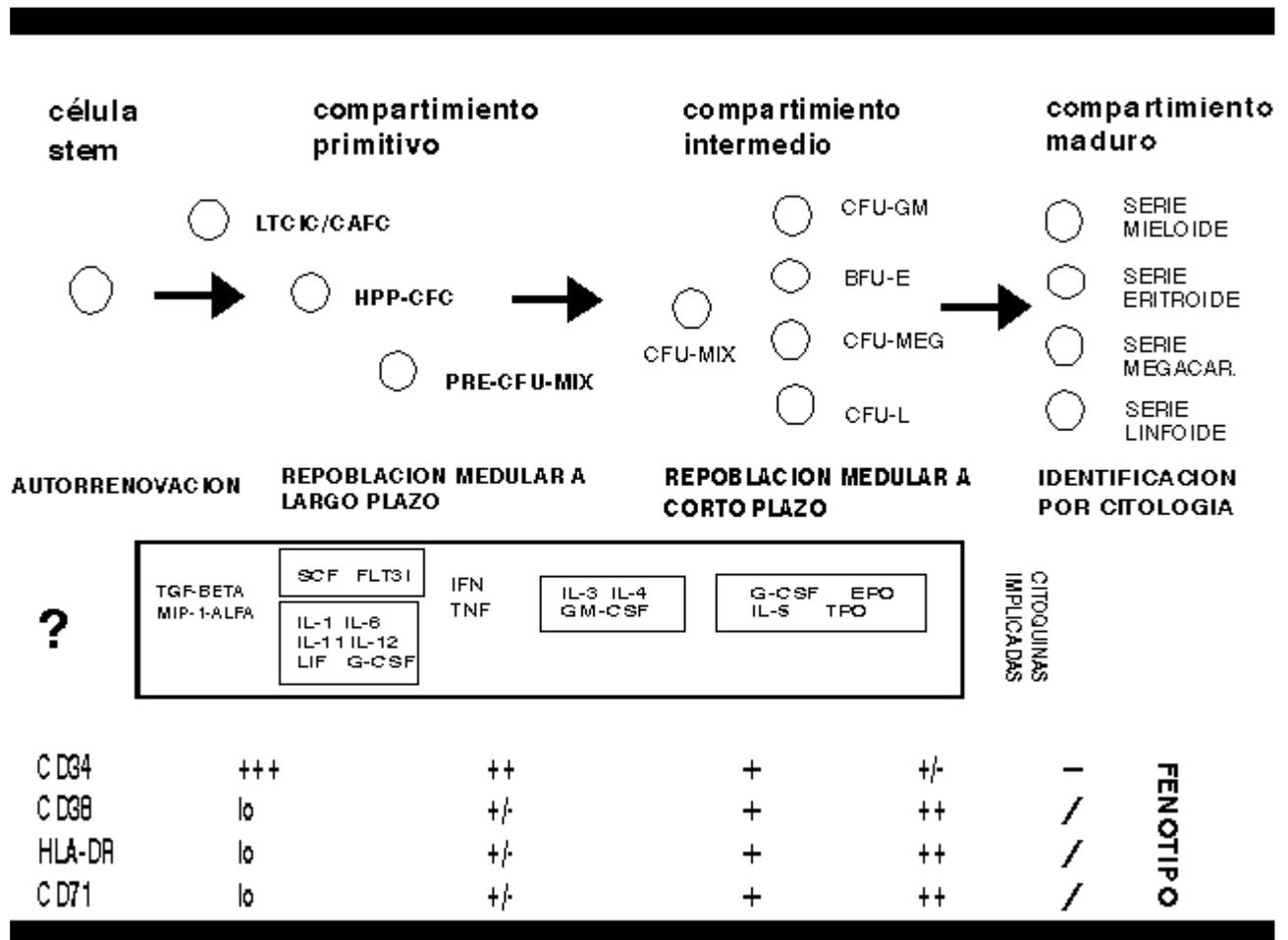
amplificación de la respuesta y el control de la diferenciación debe ocurrir al nivel de progenitor comprometido. El hecho de que sólo un 10-20% de las CMH estén en ciclo celular orienta hacia la hipótesis de que una sucesión clonal mantiene la hemopoyesis a lo largo de la vida de un individuo, como se ha corroborado por estudios de trasplante de células marcadas (138). Se han implicado diversos factores de transcripción en el control de esta decisión. Así, tal-1/SCL, Rbtn2/LMO2, y la familia GATA son importantes en este sentido (139). También en la regulación de la diferenciación actúan los FCH. De esta manera, se ha comprobado el papel de SCF, FLT-3-ligand, TPO en la supervivencia de las CMH, y como IL3, G-CSF, IL6, IL11, LIF y otras participan en la inducción y en la reducción del tiempo del ciclo celular de células inmaduras (115). También se ha descrito el papel del microambiente y el contacto célula a célula en la toma de decisiones, como ocurre con los estudios de la mutación Steel en ratones.

En definitiva, se han propuesto dos modelos para explicar la elección de las CMH por la autorrenovación ó el compromiso. El modelo estocástico, propone que esto ocurre al azar . En condiciones basales, la probabilidad de autorrenovación versus compromiso ocurriría en un 50%. Se ha comprobado que la división podría ser simétrica ó asimétrica, dando células hijas encaminadas a la diferenciación y otras a la autorrenovación ó a la quiescencia. Sin embargo, está probabilidad puede ser alterada en función de circunstancias externas como daños inducidos (citotóxicos, irradiación, etc) ó a través del efecto de factores de crecimiento externos.

El modelo alternativo, propuesto por Trentin (140), postula que el microambiente hemopoyético es inductivo. Evidencias de un desarrollo linaje específico en función del órgano hemopoyético de desarrollo (eritroide en bazo e hígado y mielóide en MO) sugiere este efecto. Asimismo, el papel de las células del estroma en el mantenimiento

Figura 3.2.

Esquema de la regulación de la hemopoyesis: la hemopoyesis compartimental





de las CMH *in vitro* también apunta hacia esta dirección. La observación de que, en los cultivos Dexter, las CMH crecen en focos de células adherentes dentro de “nichos” de células estromales, sugieren un papel importante del microambiente en la regulación del sistema.

En definitiva, parece que sobre la base de una regulación génica, que promovería un comportamiento estocástico de las CMH, existen al menos dos factores extrínsecos capaces de regular el comportamiento individual de estas células. Por un lado, las células del estroma, en relación a promover su supervivencia, y por otro, los factores humorales que parecen afectar en menor medida a las CMH, y tienen un efecto primordial en la amplificación de respuesta a nivel de progenitores comprometidos y precursores.

### 3.3.2. LA HEMOPOYESIS *IN VITRO*

La identificación de las condiciones que promueven la supervivencia de las CMH en cultivos tradicionales, ha sido clave para el inicio de los cultivos de expansión. Se han definido a lo largo de las décadas pasadas varios tipos de cultivo, con características particulares, aplicadas al propósito que nos ocupa.

#### 3.3.2.1. CULTIVOS TIPO DEXTER

Inicialmente, mediante los denominados cultivos a largo plazo dependientes de estroma ó cultivos tipo Dexter se consiguió mantener la hematopoyesis *in vitro* durante varios meses (141). En estos cultivos, un estroma pre-establecido promueve la supervivencia de las células a partir de una regulación *quasi* fisiológica, entre las

células del estroma y las células progenitoras y CMH. Como se ha dicho anteriormente, el estroma lo conforman adipocitos, células reticulares y progenitores de estroma, macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales que crecen en los cultivos, adheridas al plástico, formando monocapas compactas a las cuales se adhieren los progenitores. En este tipo de cultivos es posible recuperar CMH y PH en reducido número, aunque es capaz de promover divisiones de autorrenovación, lo que mantiene la hematopoyesis hasta varios meses.

Los cultivos dependientes de estroma suponen, pues, la forma más fisiológica de proceder *in vitro*. Mediante la realización de un cultivo a largo plazo estándar Eaves y cols (142) han realizado trasplantes en LMC (con la intención primaria de purgar el inóculo), demostrando la persistencia de células repobladoras a largo plazo, aunque con niveles muy inferiores a los del inicio del cultivo. Muchos investigadores coinciden en destacar que la presencia de estroma es indispensable para el mantenimiento de las CMH (127). Otras evidencias sitúan a factores difusibles del estroma ó a factores de crecimiento concretos como determinantes de este mantenimiento. De esta manera, se ha conseguido el mantenimiento de las CMH con expansión de progenitores en cultivos con medio condicionado de estroma en un sistema donde no existe contacto físico entre células purificadas y células estromales (143). En una reciente publicación Dao y cols (144) demuestran como FLT3-L, junto con la IL-3, IL-6 y el ligando de c-kit, preservan la capacidad de expansión de las células hemopoyéticas humanas durante cultivos *in vitro* de transducción gènica.

Existen, pues, evidencias de la mayor eficacia de los cultivos dependientes de estroma para la expansión de CMH. La limitación para la aplicación clínica de este tipo de cultivos es la dependencia de un estroma para su realización. Por un lado la dificultad de obtener previamente un estroma autólogo, muchas veces dañado en enfermos

tratados como quimio-radioterapia, que contribuiría a resultados imprevisibles. Mejores resultados serían de esperar con estroma alogénico, aunque la disponibilidad del mismo en ocasiones es complicada. Quizás la mejor solución sea el uso de líneas estromales humanas immortalizadas, pero su uso no reúne en la actualidad garantías GMP y de seguridad suficientes.

### 3.3.2.2. CULTIVOS DEPENDIENTES DE SUERO Y CITOQUINAS

La descripción de las diferentes moléculas que intervienen en la regulación de la hematopoyesis y su aparición como moléculas recombinantes humanas, ha permitido conocer su papel en la regulación hematopoyética y a proponer modelos de expansión más definidos. De hecho, los resultados actuales permiten suponer que las CMH pueden ser mantenidas, en medios con ó sin estroma. Brandt y cols (145) propusieron un modelo de cultivo líquido, donde la hematopoyesis se mantenía simplemente con la adición de citoquinas exógenas, y con independencia de estroma. Los cultivos realizados dependían sin embargo de suero de ternera foetal que proporciona factores fundamentales para el mantenimiento celular *in vitro*. Encontrar la combinación adecuada, que mimetice la situación fisiológica y promueva la proliferación sin exceso de diferenciación se ha convertido en el objetivo de los grupos que actualmente trabajan en este área de la hematología (ver tabla 3.8.).

Para promover la supervivencia en estas condiciones, es muy importante la combinación de citoquinas utilizada. De esta manera, se ha podido demostrar el efecto beneficioso de la adición de citoquinas de acción a nivel stem, junto con citoquinas facilitadoras. Es estas condiciones, combinaciones como SCF, FLT3-L, IL3, IL6 y TPO son las que han dado mejores resultados.



Tabla 3.8.

Diversos estudios publicados sobre la capacidad de expansión *in vitro* según la combinación de citoquinas utilizadas, la fuente de progenitores y el tipo de medio utilizado.

<b>EXPANSION EX VIVO DE PROGENITORES HEMOPOYETICOS PRIMITIVOS</b>					
<b>ESTUDIO (referencia)</b>	<b>FUENTE</b>	<b>CITOQUINAS</b>	<b>MEDIO/ ESTROMA METODO</b>	<b>LTC-IC (expansión)</b>	<b>IN VIVO</b>
<b>Koller y cols (146)</b>	MO (CMN)	IL3,GM, SCF,EPO	10%SC+10% STF; biorreactor 14 días	x7.5	
<b>Petzer y cols (147)</b>	MO (CD34+CD38-)	IL3,IL6,SCF, FLT3-L,GCSF, NGF	MLS; célula única; 10 días	x30	
<b>Zandstra y cols (148)</b>	MO (CD34+CD38-)	IL3,SCF, FLT3-L	MLS; célula única; 10 días	x45	
<b>Bhatia y cols (149)</b>	MO (CD34+DR-)	MIP-1 $\alpha$ ,IL3, MCE	MCE; 8 semanas	x5	
<b>Barnett y cols (150)</b>	MO	Ninguna	Estroma autólogo preformado		prendimiento sostenido (Ph+)
<b>Henschler y cols (151)</b>	SPM	IL1,IL3,IL6, SCF,EPO	Plasma autólogo 2%; 2 semanas	mantenimiento	
<b>Petzer y cols (152)</b>	SPM	IL3,G-CSF, SCF,FLT3-L	MLS, 7 días	x2-x5	
<b>Brugger y cols (153)</b>	SPM	IL1,IL3,IL6, SCF,EPO	Plasma autólogo 2%; 14 días		reconstitución en humanos
<b>Piacibello y cols (154)</b>	SCU CD34+	FLT3-L,TPO	STF; 2 semanas	x160	
<b>Conneally y cols (155)</b>	SCU CD34+/CD38-	IL3,IL6,GCSF, SCF,FLT3-L	MLS; 7 días		NOD-SCID CRU x2
<b>Bhatia y cols (149)</b>	SCU CD34+/CD38+	no especificado	MLS; 4 días	x5	NOD-SCID CRU x2-4

NGF: Nerval growth factor

MCE: Medio condicionado de estroma

MLS: Medio libre de suero

STF: Suero de ternera foetal

SC: Suero de caballo



### 3.3.2.3. CULTIVOS EN MEDIOS LIBRES DE SUERO

El suero ha sido un elemento indispensable en los cultivos clásicos ya que contiene moléculas conocidas (como transferrina, insulina, lipoproteínas de baja densidad) así como otras moléculas no caracterizadas que facilitan el mantenimiento de la homeostasis de las células progenitoras en cultivo (156). Actualmente, se ha conseguido mostrar mantenimiento ó modesta amplificación de células con capacidad de repoblación, en cultivos libres de suero suplementados con citoquinas exógenas. Existen diferentes medios comerciales capaces de mantener las células progenitoras en cultivos de expansión (Stempro34 de Life technologies, X-VIVO de Bio-Whitaker, Cellgro de Cellgenix, etc). Para proponer procedimientos seguros con finalidad clínica deberemos apostar por un medio libre de suero con garantías en su control de calidad. Se han reportado diversos trabajos en la literatura que demuestran la factibilidad de realizar expansiones ex vivo en este tipo de medios (157-159). La propuesta de modelos de cultivo utilizando medios sin suero, es la base del desarrollo experimental de la presente Tesis.

### 3.3.3. MODELOS ANIMALES DE APLICACIÓN DE LA EXPANSION EX VIVO

Los primeros estudios realizados en animales de experimentación ofrecieron ya evidencias significativas que sugerían la potencial aplicación de las técnicas de expansión en la práctica clínica (160-162). En estos primeros trabajos, se observó que, en condiciones adecuadas, el cultivo líquido de inóculos hematopoyéticos facilitaba la amplificación de los progenitores comprometidos. Asimismo, el trasplante de estos

inoculos suponía una mejora en la recuperación leucocitaria de los animales trasplantados, en comparación a receptores infundidos con cantidades equivalentes de MO no manipulada. Un ejemplo del beneficio observado en este tipo de estudios lo muestran observaciones en ratones sometidos a irradiación potencialmente letal y trasplantados con cantidades equivalentes de MO fresca y de MO sometida a expansión *ex vivo* con IL-1 y SCF (160). Los inóculos correspondientes a la MO expandida siempre resultaron más eficaces para facilitar la recuperación leucocitaria del receptor. Asimismo, la tasa de supervivencia de los receptores trasplantados con las células expandidas también mejora en relación a la obtenida en ratones trasplantados con células frescas.

En el mismo sentido, más recientemente se ha demostrado que al expandir MO murina con TPO, SCF, IL-1 e IL-3, la recuperación de plaquetas y neutrófilos en receptores trasplantados con inóculos expandidos se acelera entre 3 y 5 días respecto a receptores trasplantados con MO fresca. Es de destacar que en estos experimentos, la proporción de MO presente en los inóculos expandidos fue la décima parte respecto al tamaño de los inóculos frescos (163).

Uno de los riesgos principales derivados de la manipulación *ex vivo* de células hematopoyéticas proviene de la posible pérdida de las CMH, por un estímulo excesivo de diferenciación, ó por la generación de defectos en su capacidad para anidar en el tejido hematopoyético del receptor. Esto ha generado controversia a la hora del análisis de los resultados.

Un modelo de trasplante en primates, más cercano a la situación en humanos, ha aportado resultados contradictorios (164). Los autores utilizaron células CD34+ de MO y las cultivaron durante 10 días en presencia de SCF, IL-3, IL-6 y GM-CSF, sobre una monocapa de células endoteliales microvasculares de cerdo. Este protocolo

de expansión incrementó la celularidad total, el número de células CD34+ y el contenido de progenitores CFU-GM y CAFC. El trasplante de las células expandidas fue compatible con el injerto hematopoyético estable de los receptores. Sin embargo, la recuperación hematológica de estos estuvo retrasada en comparación a la observada en animales trasplantados con células no expandidas. En cambio, otros autores si han demostrado un efecto beneficioso en este contexto. Andrews y cols (165) publican su experiencia donde la fracción de animales trasplantados con células CD34+ expandidas acortaron el periodo de neutropenia de  $14\pm 2$  días hasta  $3\pm 4$  días. Sin embargo, este efecto no se pudo constatar en la recuperación plaquetar. La expansión se realizó con G-CSF, MGDF y SCF a 100 Ng/mL. Para objetivar los efectos beneficiosos de la expansión, fue necesaria la administración postrasplante de factores de crecimiento (G-CSF y MGDF). Esta circunstancia podría explicar los diferentes tipos de resultados, ya que no se tiene en cuenta a menudo, cuando se trasplantan células expandidas, que la concentración de citoquinas en el cultivo es elevada y que sin embargo, tras la infusión hasta el anidamiento, se produce una deprivación relativa de citoquinas, que podría inducir apoptosis.

Utilizando células de SCU humanas Albella y cols (162) estudian el efecto de la expansión *ex vivo* sobre la capacidad de estos inoculos para injertar ratones inmunodeficientes NOD/SCID. No obstante, la capacidad de repoblación a corto plazo de los inóculos expandidos fue significativamente inferior a la observada en células frescas, a pesar del notable incremento en su celularidad total y número de progenitores CFU-GM. Hay, sin embargo, publicaciones que defienden expansión de SRC a partir de SCU (166, 167). Se desconoce si estas observaciones están relacionadas con el modelo de trasplante xenogénico utilizado, por cuanto la

capacidad de anidación de este sistema es muy baja (solamente el 1% de los progenitores stem inoculados logra prender) (168).

A la vista de estos resultados, hay un cierto grado de controversia sobre el verdadero camino de las células madre en cultivos. Los resultados *in vivo* son también contradictorios, debido a las críticas que se originan por los ensayos funcionales realizados para determinar la capacidad de expansión. Es por ello, que parece justificado la realización de ensayos controlados en humanos, que permitan dilucidar esta cuestión.

#### 3.3.4. EXPANSION EX VIVO EN CLINICA: OBJETIVOS

El trasplante de PH sometidos a expansión *ex vivo* ha surgido recientemente como una nueva aproximación para aminorar los periodos de aplasia asociados a tratamientos de altas dosis de quimio/radioterapia. Asimismo, la expansión *ex vivo* de PH se ha realizado de manera acoplada a técnicas de purgado *ex vivo* de células tumorales y también a procedimientos de transferencia génica de la hematopoyesis. (43, 169, 170).

La expansión *ex vivo* del sistema hemopoyético puede ser aplicada a los distintos compartimentos de la hemopoyesis:

- Expansión de CMH: Necesidad de aumentar el número de CMH, para asegurar injertos a largo término. También aplicable a terapia génica, a partir de vectores que requieren la división celular para insertar el gen terapéutico.
- Expansión de PH comprometidos: Aplicado a facilitar el injerto a corto plazo (velocidad del prendimiento) (que forma parte del objetivo experimental de la presente Tesis).

- Expansión/Modulación de células maduras: Generación de líneas hemopoyéticas concretas para:

- Apoyo en la recuperación a corto plazo: generación de promielocitos, generación de megacariocitos.

- Inmunoterapia adoptiva: expansión de linfocitos, expansión de células dendríticas.

Las ventajas prácticas que las técnicas de expansión pueden aportar a la clínica del trasplante hematopoyético son todavía objeto de discusión. No obstante, una larga serie de estudios han evidenciado el interés de estas técnicas en aspectos básicos y aplicados de la hematopoyesis. Es más, su aplicación clínica es una opción interesante, para evaluar sus efectos, y para ello es necesario trasladar los hallazgos descritos, a un laboratorio de hemoterapia avanzado que pueda desarrollar los cultivos antes descritos y aplicarlos a los pacientes de forma segura y reproducible.

### 3.3.5. METODOS DE EXPANSION DE USO CLINICO

La tecnología que se está desarrollando para llevar a cabo procedimientos de expansión a escala clínica se basa tanto en necesidades del propio cultivo, como en necesidades de seguridad exigibles para un protocolo clínico.

Los sistemas de expansión *ex vivo* hasta ahora desarrollados para uso clínico se resumen a continuación:

### 3.3.5.1. CULTIVOS ESTATICOS

Las células son depositadas en un continente cerrado, al que se adicionan, con la frecuencia necesaria, las citoquinas requeridas para el crecimiento de las células. Se han desarrollado sistemas cerrados, basados en bolsas semipermeables para gases, que puedan utilizarse con finalidades clínicas. Los dos tipos de bolsas disponibles son: Plástico PL2417<sup>R</sup> de Nexell, y el Teflon<sup>R</sup> producido por American Fluoroseal Company.

Mediante esta tecnología se han reportado experiencias clínicas. Fundamentalmente han sido desarrolladas con medios y citoquinas definidos por la empresa Amgen.

#### A) Expansión de PH de SPM autólogos:

Se han reportado experiencias con dos tipos de estrategias, que incluyen la infusión de células manipuladas y no manipuladas, o el uso de células expandidas solamente.

#### A.1. Experiencia del grupo de Reiffers y cols (Burdeos, Francia): Co-trasplante de células no manipuladas con células expandidas seleccionadas (171):

El objetivo de un protocolo de este tipo es el de eliminar la morbilidad de los autotrasplantes relacionada con el periodo de neutropenia y plaquetopenia.

Este grupo ha incluido 25 pacientes afectos de mieloma múltiple a los que ha sometido a movilización de SP utilizando quimioterapia y G-CSF. Criopreservaron para infundir sin manipular una mediana de  $3,5 \times 10^6$  CD34/kg. El resto del producto de aféresis fue seleccionado para CD34 y criopreservado. Alrededor de  $5 \times 10^6$  CD34/kg fue sometido a expansión con el sistema Amgen, que consistió en la

utilización de un medio libre de suero definido y citoquinas a 100 Ng/mL, que incluye SCF, G-CSF y MGDF, durante 10 días, cultivadas en bolsas de Teflon de 1 litro, a una concentración de 25000-50000/mL. Tras la administración de melfalan a altas dosis  $\pm$  TBI, se realizó infusión de la fracción expandida (día 0) y de la no manipulada (día +1). Los resultados que reporta este grupo son muy buenos por cuanto demuestran una eliminación prácticamente total del periodo de aplasia. Concretamente, la mediana de días por debajo de  $0,1 \times 10^9/L$  neutrófilos fue de 0 (0-3), por debajo de  $0,5 \times 10^9/L$  fue de 2 (0-7). La mediana de días por debajo de  $20 \times 10^9/L$  plaquetas fue de 1 (0-8), con sólo 1 día de mediana en transfusiones de plaquetas (0-8). Estos resultados son mejores que los obtenidos por el grupo francés de mieloma (IFM 94), utilizando el mismo esquema de acondicionamiento, donde en 145 casos incluidos se demuestra una mediana de días con neutrófilos  $< 0,5 \times 10^9/L$  de 9,8. Según estos resultados, las células generadas ex vivo son capaces de eliminar la neutropenia post-quimioterapia.

A.2. Experiencia del grupo de Shpall y cols (Denver, Colorado): Selección de CD34, expansión, e infusión única.(172)

El objetivo de este protocolo es el demostrar la capacidad de las células expandidas de producir injertos estables y ampliar su aplicación a protocolos de trasplante con inóculos subóptimos (malos movilizadores ó post-manipulación). Otra opción sería, incrementar el *purging* al unir selección CD34 e inóculos menores. Han llevado a cabo un protocolo de trasplante de células CD34+ seleccionadas y expandidas en enfermas sometidas a autotrasplante como terapia altas dosis por cáncer de mama. Refieren la realización de 21 casos, con la infusión únicamente del producto de la expansión de células de SPM sometida a selección positiva de CD34. La metodología

utilizada ha sido la de Amgen. 9/21 pacientes injertaron entre días 4 a 6 ( $>0,5 \times 10^9/L$  neutrófilos). El grupo histórico que ellos presentan (n=175), tuvo una mediana de injerto de 9 días, con un rango mínimo de 7. La probabilidad de presentar un injerto rápido dependió de las CN/kg infundidas y no de la monitorización de CD34 durante la expansión. Todos los pacientes que recibieron más de  $40 \times 10^6$  CN expandidas/kg injertaron de neutrófilos por debajo del día 8. Por lo tanto parece que ex vivo se pueden generar células que participan en el injerto a muy corto plazo y son funcionales tras la infusión.

#### B) Expansión de PH de SCU:

Utilizando la misma estrategia de cultivo que la utilizada con SPM, el grupo de Shpall y cols (Denver, Colorado) ha realizado una experiencia de trasplante de SCU expandido en 19 pacientes, 15 adultos y 4 pediátricos. (173)

La estrategia del trasplante ha dependido de la disponibilidad de la unidad de SCU criopreservada en una sola bolsa ó en dos alícuotas. La estrategia primera consistió en descongelar la unidad, separar el 40% para selección positiva e infundir el 60% restante. La expansión se realizó siguiendo la estrategia Amgen tras selección positiva. A día +10 de trasplante se infundieron las células expandidas. En la segunda estrategia, se realizó descongelación de una alícuota en el día -10 y se infundió al paciente conjuntamente con la alícuota no manipulada.

Los resultados de los 13 casos evaluables muestran una probabilidad de injerto de neutrófilos del 100%, en una mediana de 25 días (15-35) ( $>0,5 \times 10^9/L$ ). 10/13 injertaron plaquetas ( $>20 \times 10^9/L$ ) en una mediana de 58 días (27-91). De los pacientes analizados a día +60, todos tenían un nivel de quimerismo del 98-100%, procedente

del donante. Este grupo ha observado una alta incidencia de EICH agudo (8/13) y crónico extenso (7/10) en estos pacientes. Los datos preliminares parecen apuntar hacia una mejora en la probabilidad de injerto para este grupo de enfermos utilizando SCU expandida.

### 3.3.5.2. CULTIVOS DE PERFUSION

Debido al deficiente control físico-químico del medio en los sistemas estáticos se han desarrollado sistemas de perfusión que tratan de intercambiar medio y citoquinas de forma constante para evitar su agotamiento (146). Con ello ha nacido la tecnología de los biorreactores. El propósito es conseguir una cámara de cultivo que renueve sus condiciones recambiando el medio a una velocidad muy baja para evitar turbulencias que puedan afectar el crecimiento de las células en el cultivo. Aamstrom Inc (Ann Arbor, USA) ha diseñado un dispositivo para realizar la expansión en estas condiciones, en un sistema cerrado válido para utilización clínica. Es el sistema Replicell<sup>R</sup> de expansión. Este sistema permite la regulación de factores como variaciones de pH, modificación en la concentración parcial de gases en la disolución, y otros que son incontrolables en los sistemas estáticos. Esto se realiza a partir de la administración continuada de un medio fresco y citoquinas a las células, de manera análoga a como el plasma lo realiza hacia la MO. Con esta tecnología se han reportado experiencias clínicas (174-176).

Cómo se ha comentado previamente, es un sistema automático, cerrado, de perfusión continua para realizar cultivos de expansión. Las células son expandidas en medio suplementado con suero de ternera fetal, suero de caballo y 3 citoquinas: PIXY-321,

FLT3-L, y Epo, durante 12 días. Con esta combinación se consigue una expansión de CFU-GM (en torno a 22-63 veces, utilizando MO ó SCU) pero no se objetiva expansión del *pool* de células CD34+lin- (1,23-1,38 veces, respectivamente).

A) Aumento del contenido de progenitores en trasplante de SCU:

Kurtzberg y cols han presentado el seguimiento de su estudio de trasplante de SCU con una alícuota expandida. El estudio consiste en la infusión de más de  $1,5 \times 10^7$  CN/kg el día 0 y el resultado de la expansión de una fracción de 100 a  $300 \times 10^6$  de CN, con el sistema AastromReplicell, y administradas al paciente el día +12. (177)

Se han incluido 28 pacientes. En la evaluación de resultados no se evidencian diferencias en la cinética del injerto comparado con un control histórico, pero si que se demuestra una mejor supervivencia en la evaluación del día +100. Se plantea la realización de un estudio randomizado para confirmar los datos, ya que indicaría la existencia de otros factores sobre los que depende esta mayor tasa de supervivencia. Se propone una optimización del sistema AastromReplicell y su protocolo de aplicación. Para ello se plantea la necesidad de utilizar bolsas de congelación compartimentalizadas (como el sistema Bioarchive<sup>R</sup> de Thermogenesis) y la utilización de nuevas estrategias en las condiciones de cultivo, fundamentalmente en la combinación de citoquinas utilizadas. En un estudio realizado por este grupo se ha podido determinar la expansión de la población CD34+lin- cuando a la combinación básica se le añade SCF y TPO (de 4 a 6 veces), lo que demuestra mejores resultados con el simple cambio de la combinación de citoquinas.

B) Seguimiento a largo plazo de pacientes sometidas a trasplante de MO autólogo expandido usando el sistema AastromReplicell:

Stiff y cols de la Universidad de Loyola han realizado este protocolo e incluido a 34 pacientes afectas de cáncer de mama (178). El protocolo consiste en la expansión de una alícuota de MO recogida tras 3 días de G-CSF y aislamiento de CMN por gradiente de densidad. La expansión se ha realizado con  $900-1800 \times 10^6$  CMN (equivalente a 100 mL), durante 12 días, con la combinación básica de citoquinas. Se ha realizado infusión única de las células expandidas. La recuperación de neutrófilos ha sido a día 17 (13-24) y la de plaquetas a día 26 (18-61). En 3 casos se utilizó el back-up por problemas de injerto plaquetario. Con un seguimiento medio de 27 meses, 11/12 pacientes en estadio II/IIIa están libres de enfermedad y la supervivencia libre de progresión en los estadios IV es de 15,5 meses.

Se propone esta aproximación como método de *purging*, dado que es un sistema que no favorece el crecimiento tumoral y permite el trasplante con dosis reducidas de inóculo.

C) Trasplante en pacientes con linfoma no-Hodgkin con dosis bajas de células CD34+ de SP y MO expandida ex vivo:

Malik y cols de la Universidad de Hackensack (179) presentan su experiencia en 4 pacientes a los que se ha sometido a un trasplante de SP con menos de  $2 \times 10^6$  CD34/kg y se ha complementado con el producto resultado de la expansión de 80 mL de MO primada con G-CSF en el sistema AastromReplicell. En los 4 pacientes se recuperaron granulocitos entre los días 10-14, aunque dos de ellos continúan dependientes de plaquetas.

Proponen este protocolo para incluir en trasplante autólogo a los pacientes con riesgo de mala movilización: intensamente tratados, sujetos de edad avanzada y enfermos que hayan recibido fludarabina previa.

### 3.3.6. SELECCION POSITIVA DE CELULAS CD34 Y EXPANSION

Para poder obtener un buen control de la expansión en sistemas estáticos es necesario cultivar las células a concentraciones celulares muy bajas y controlando perfectamente las citoquinas efectoras (180). Para ello es necesario depoblar de células accesorias el injerto, y realizar la expansión a partir de células CD34+ seleccionadas. Ello motiva, que para acoplar un sistema de expansión clínico en sistemas estáticos se deban desarrollar técnicas eficaces de selección positiva. En el caso de la SCU, esto debe hacerse a partir de productos criopreservados con la consiguiente complicación. El desarrollo de la tecnología de selección del descongelado de SCU es motivo de la presente Tesis.

Como se ha dicho anteriormente, para conseguir un grado mayor de reproducibilidad técnica es necesario acometer una selección positiva de células CD34+ como paso previo a la expansión. En los sistemas estáticos existe la necesidad de realizar esta selección celular debido a la inhibición del crecimiento observada por la alta densidad celular que se genera en los cultivos. En este sentido, resulta de interés el hecho de que los sistemas de expansión estáticos son óptimos cuando las células están a concentraciones inferiores a  $10^5$  cel/mL. Sin selección de células CD34+ sería técnicamente inviable realizar una expansión eficaz de progenitores ya que se necesitaría un volumen excesivo de medio de cultivo y de citoquinas, aumentando las dificultades técnicas, con el consiguiente coste elevado. Esto ha sido reportado en la

literatura y comprobado en nuestro grupo, donde no se ha obtenido expansión de progenitores cuando se han cultivado CMN a concentraciones de  $10^6$ /mL en sistemas estáticos.

Las técnicas de selección celular están siendo optimizadas en la actualidad. Diversos autores, y nuestro propio grupo, han publicado experiencias que permiten definir los factores que intervienen en el rendimiento de los procedimientos (181). Sin embargo, todavía no se han definido técnicas adecuadas para realizar la selección celular a partir de productos criopreservados. Esto es más trascendente utilizando SCU, donde la poca cantidad de células CD34 obliga a procedimientos de alto rendimiento. El presente trabajo de Tesis propone una metodología de selección celular para utilización clínica.

Los sistemas de perfusión continua permiten la expansión sin necesidad de realizar la selección celular, lo que *a priori* resulta más atractivo por dos razones diferentes. En primer lugar porque se evitan las pérdidas de progenitores relacionadas al procedimiento de selección celular. En segundo lugar, porque no se desechan del cultivo las poblaciones CD34<sup>+</sup>, en las cuales posiblemente se encuentren CMH primitivas. La trascendencia de la reflexión anterior está por demostrar, a la espera del análisis de las experiencias clínicas iniciales. Al mismo tiempo, el empleo de biorreactores está condicionado a la disponibilidad de una tecnología todavía experimental y cara. Evidentemente, este es un campo de creciente interés para los programas de I+D+i, siendo necesario realizar estudios de optimización de los procesos en estos sistemas.



### 3.4. INTRODUCCION AL TRABAJO EXPERIMENTAL

Este trabajo de Tesis describe el desarrollo de una nueva estrategia de trasplante de donante alternativo a partir de la SCU. Después de describir el contenido hemopoyético de una recogida estándar, se justifica la necesidad de promover un implante más rápido que disminuya la morbimortalidad relacionada con el procedimiento y permita la generalización de su uso. Para ello se proponen estrategias de terapia celular como es la expansión ex vivo.

Existen numerosos autores que han publicado trabajos sobre expansión, cultivos de CMH y generación de PH para trasplante. Estos datos, enmarcados en el contexto de la investigación básica del sistema hemopoyético, sugieren la posibilidad de su aplicación clínica. La expansión se ha propuesto para generar CMH en trasplantes con bajo contenido celular, y para diferenciar células pertenecientes a diferentes linajes hemopoyéticos, e incluso tejidos, con finalidad terapéutica: trasplante hemopoyético, soporte de la recuperación a corto plazo, inmunoterapia, terapia génica, y diferenciación a tejidos mesenquimales. El propósito de la presente Tesis es tratar de desarrollar una estrategia biotecnológica para poder aplicar estas técnicas a procedimientos clínicos. Para ello, aspectos como la seguridad transfusional, la prevención de efectos indeseables, la reproducibilidad del método, la factibilidad logística y económica, el uso de reactivos manufacturados según normas farmacéuticas, pasan a ser primordiales. Esta perspectiva, enmarcada en I+D+i o investigación translacional en algunos casos, es la que fundamenta la presente Tesis. Recogiendo la experiencia de la literatura, conjuntamente con estudios propios, se propone una metodología al alcance de un laboratorio de Hemoterapia avanzada. Se

presentan 3 publicaciones encaminadas a definir los puntos fundamentales para la estandarización de dicha metodología.

El primer trabajo (capítulo 5.1) presenta las condiciones del cultivo que permiten la expansión de progenitores y los parámetros críticos para el mantenimiento de las células. Se incide en la importancia de la concentración de citoquinas y su presencia continua en el medio, se estudian la sinergia entre las mismas y, como la combinación ordenada de ellas, permite una mayor tasa de expansión. Finalmente, se estudia el papel de la renovación de los nutrientes y su efecto en el cultivo.

El segundo trabajo (capítulo 5.2) que se presenta, estudia la adaptación de las técnicas de expansión a modelos y tecnología que permita su utilización en clínica. Para ello, se evalúa la calidad del producto obtenido en función de la utilización de medio libre de suero, y se define la combinación de citoquinas más adecuada que permite la conservación de las células más primitivas (cómo las CAFC de 5 semanas) mientras se generan en el cultivo, gran cantidad de células comprometidas a las diferentes líneas y medidas por ensayos clonogénicos.

En el tercer trabajo (capítulo 5.3) se presenta ya un protocolo, aplicable en clínica, de trasplante de SCU sometido a expansión, y se describen los experimentos realizados para su validación. En él destaca, la descripción de un método de selección positiva de descongelado de una unidad de SCU, la expansión de las células CD34+ obtenidas en bolsas semipermeables, y el resultado de la expansión en esas condiciones. Al mismo tiempo, se presentan los resultados biológicos obtenidos en un grupo de 5 trasplantes realizados con esta tecnología.

#### 4. OBJETIVOS



4.1. Definición de una estrategia de cultivo que permita mantener la hemopoyesis *in vitro* en sistemas libres de estroma.

- Estudio de las condiciones que permitan el mantenimiento de la hemopoyesis *in vitro*
- Estudio de los factores que permitan la proliferación de las células madre *in vitro*
- Estudio de los factores implicados en el rendimiento de la expansión
- Definición de las condiciones del cultivo de expansión que permitan generar progenitores diferenciados y amplificar células madre

4.2. Definición de una estrategia estándar, reproducible, y aplicable a la clínica, basada en cultivos líquidos, con medios libres de suero, y sistemas estáticos, fácilmente adaptables a cualquier laboratorio especializado de citoterapia

- Cultivos líquidos de expansión
- Cultivos de expansión en sistemas estáticos cerrados
- Cultivos de expansión en medios libres de suero

4.3. Aplicación de esta estrategia para la amplificación del *pool* de PH contenido en una unidad de SCU criopreservada utilizable para trasplante

- Protocolo de descongelación y selección positiva de células CD34 de SCU de unidades procedentes de un banco de SCU
- Puesta a punto a gran escala de las condiciones de expansión de progenitores comprometidos
- Propuesta de un protocolo clínico, seguro y reproducible para aplicar la tecnología de la expansión a los trasplantes de SCU



## 5. RESULTADOS



## 5. 1. METODO DE CULTIVO:

Effect of glycosylation of recombinant human granulocytic colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34+ cells

Haematologica 1999; 84: 493-98.



5.2. DESARROLLO DE UN METODO DE CULTIVO DE CORTA DURACION,  
LIBRE DE SUERO, ESTATICO Y APLICABLE A PROCEDIMIENTOS  
CLINICOS:

Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34+ cells: effects of  
FLT3-L and MIP-1-alfa on *in vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells

Haematologica 1999; 84: 675-82.



### 5.3. APLICACION CLINICA: METODO DE SELECCION POSITIVA DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL CRIOPRESERVADA Y EXPANSION EN SISTEMAS ESTATICOS CERRADOS

Direct immunomagnetic CD34+ cell selection method from cryopreserved cord blood grafts for ex vivo expansion protocols

Transfusion 2000; 40: 625-31.



## 6. DISCUSSION GENERAL



## 6.1. INTRODUCCIÓN

Un protocolo de expansión *ex vivo* de PH tiene como objetivo generar nuevas células madre y/o progenitoras a partir de un producto inicial al que se le somete a cultivo. El éxito *in vivo* del modelo dependerá de las características funcionales de las células generadas y su capacidad de injertar tras infusión.

Dexter y cols (141) publicaron en 1977, la primera aproximación a un cultivo de expansión, cuando analizaron la diferenciación y proliferación de células hemopoyéticas *in vitro* en un medio de cultivo definido. Posteriormente, cuando se desarrollaron los cultivos a largo plazo, se estudiaron los factores que mantenían la regulación del sistema hemopoyético *in vitro*, fundamentalmente el papel del estroma como nicho regulador del sistema. Esto permitió el aislamiento y la síntesis de citoquinas con diferentes funciones en el sistema. Brandt y cols (145) publicaron en 1990, el mantenimiento de la hemopoyesis *in vitro* en cultivos líquidos, libres de estroma, y dependientes de suero y citoquinas. En esos momentos las citoquinas utilizadas incluían IL6, IL1 como reguladoras del *pool stem* y IL3, GM-CSF y G-CSF como inductoras de diferenciación.

La aparición en escena de SCF, una citoquina que promueve la supervivencia de las CMH *in vitro*, contribuyó a la aparición de los primeros estudios de expansión donde se evaluaron fundamentalmente la generación de PH comprometidos a línea. El mantenimiento a largo plazo de estos cultivos no era posible y habitualmente después de 14 días de proliferación el sistema se agotaba. Solo algunos estudios habían demostrado expansión moderada ó mantenimiento de células candidatas a CMH *in vitro*. Los estudios *in vivo* en modelos murinos pusieron de manifiesto la pérdida funcional de las propiedades stem de las células que habían sido sometidas a cultivos

de expansión *in vitro*, lo que indicaba una ineficiencia en las condiciones de cultivo empleadas. (169)

Finalmente, el análisis de los cultivos utilizando FLT3-L y más recientemente TPO, mostraron un efecto beneficioso en el mantenimiento de la viabilidad y la autorrenovación *in vitro* de la CMH, con la consiguiente posibilidad de mantener el cultivo a largo plazo y generar una cantidad creciente de progenitores diferenciados. (182). Al mismo tiempo, se evidenció que IL3 generaba un estrés proliferativo muy elevado en cultivos libres de estroma y agotaba de forma precoz el cultivo de expansión. De esta manera, Piacibello y cols (154) mostraron la posibilidad de mantener durante varios meses, el potencial de generación de progenitores comprometidos a línea, en sistemas libres de estroma y suero, donde las variables críticas eran la presencia de TPO y FLT3-L y la ausencia de IL3. Con este sistema se lograba expandir las CMH (autorrenovación) y generar gran cantidad de PH multilineales (proliferación y diferenciación). Estos datos fueron corroborados en modelos animales xenogénicos (NOD-SCID). (166)

La expansión se ha utilizado en clínica en diversos protocolos. Por una parte, estudios promovidos por Aastrom<sup>R</sup>, (178) que comercializa un sistema de expansión basado en la perfusión continua (biorreactor) y que ha mostrado la posibilidad de generar y infundir progenitores hemopoyéticos sin una aparente toxicidad. Por otra parte, utilizando sistemas estáticos, basados en medios y citoquinas proporcionados por Amgen<sup>R</sup>, (171) se han presentado experiencias en trasplante de SCU y en trasplante autólogo en enfermos diagnosticados de mieloma múltiple. A destacar los resultados de Reiffers et al, que consiguen eliminar el periodo de aplasia tras la coin fusión de aféresis expandidas con alícuotas no manipuladas en el contexto autólogo. Estos

resultados demuestran el efecto en la recuperación a corto plazo secundaria a la infusión de dosis altas de progenitores comprometidos.

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que el sistema hemopoyético puede mantenerse *in vitro* bajo condiciones de cultivo muy seleccionadas. En general, su mantenimiento depende de la interregulación células madre-nicho estromal. Cuando además del mantenimiento se desea forzar un estado de proliferación/diferenciación la regulación del sistema *in vitro* es más difícil. En todo caso, se pueden conseguir aceptables cifras de PH comprometidos manteniendo, ó incluso aumentando, las cifras de CMH, en sistemas libres de suero y estroma, dependientes de citoquinas con acción a nivel de *pool stem*, como SCF, FLT3-L, TPO e IL6.



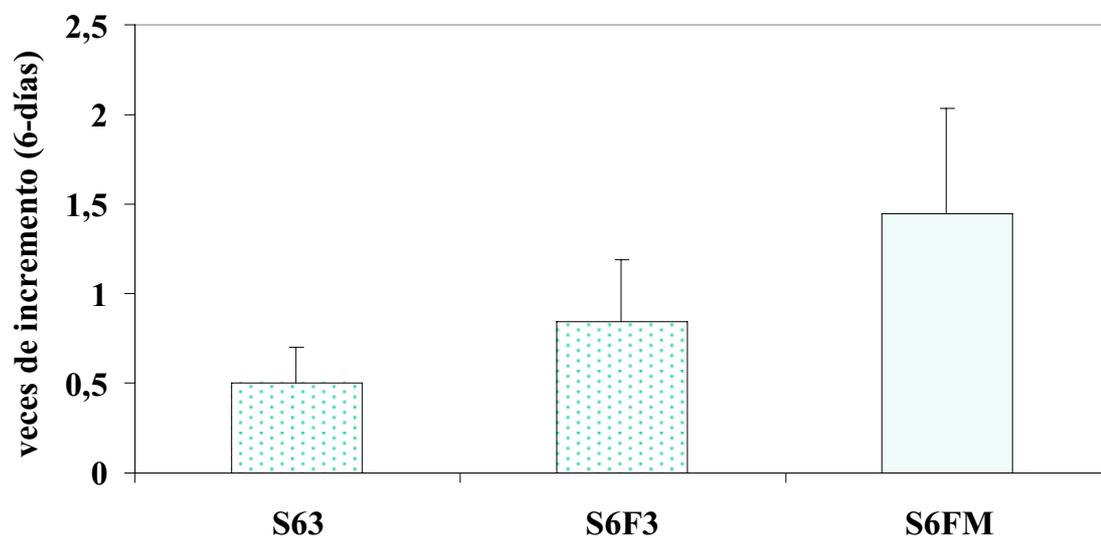
## 6.2. DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO DE UN CULTIVO A CORTO-TÉRMINO, LIBRE DE SUERO: ESTUDIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES

Inicialmente nuestro grupo ha buscado el desarrollo de un modelo biotecnológico de aplicación a protocolos clínicos de los estudios básicos de expansión. Para ello se han realizado los estudios en modelos libres de proteínas de origen animal. En sistemas estáticos, donde el medio no se intercambia de forma permanente (simulando el flujo plasmático *in vivo*), la concentración celular de incubación es crítica para forzar la proliferación celular. (180) La presencia, además, de células accesorias como monocitos ó linfocitos contribuye a añadir variables no controladas, como citoquinas inhibitoras, y hacen muy ineficiente el sistema. Esto hace necesario realizar una selección de células CD34+, previa. Posteriormente, hemos definido las citoquinas requeridas para promover el mantenimiento de las CMH *in vitro*, evaluadas por el ensayo CAFC. En presencia de SCF, IL3 consigue incrementar substancialmente el número de CFU, pero a costa de una disminución del *pool stem* que lleva al agotamiento del cultivo. La adición de FLT3-L consigue mejorar la recuperación de CAFC a los 6 días, probablemente por el efecto anti-apoptótico a algunas células CAFC. La presencia de inhibidores como MIP-1-alfa consigue proteger al *pool stem* del estrés proliferativo de IL3. Los estudios realizados substituyendo IL3 por TPO, manteniendo las mismas condiciones de cultivo se consigue un equilibrio aceptable entre autorrenovación del *pool stem* y la proliferación y diferenciación multilineal deseable en un protocolo de expansión (ver figura 6.1). Las condiciones han sido comprobadas en sistemas libres de suero y estroma.

Con el fin de adaptar estos resultados a un sistema de uso clínico en SCU, realizamos un estudio de estandarización de las condiciones de cultivo a partir de muestras criopreservadas. Para ello, proponemos un método inmunomagnético directo de selección positiva de células CD34, utilizando productos aptos para uso clínico *ex vivo*. Las células obtenidas se cultivan en sistemas cerrados (bolsas semipermeables), con las mismas condiciones de cultivo que previamente fueron definidas en pocillos: concentración celular de inicio inferior a  $5 \times 10^4$  células CD34+/mL, feeding frecuente (cada 3 días) y utilización de las citoquinas SCF, FLT3-L, IL3 y TPO a concentraciones saturantes (100 Ng/mL) en un medio libre de suero producido en condiciones farmacéuticas. Las condiciones empleadas han permitido amplificar las células CD34+ de SCU criopreservadas hasta 10 veces (considerando que existe una pérdida por el proceso de descongelación y selección celular del 50%).

Posteriormente, hemos realizado estudios para monitorizar la calidad del producto que incluyen caracterización fenotípica de las células CD34+ obtenidas, capacidad clonogénica de las mismas hacia linaje granulomonocítico, eritroide y megacariocítico, capacidad de mantenimiento de cultivos a largo plazo sobre estroma, y capacidad funcional de migración a gradientes SDF-1-alfa como medida indirecta de la capacidad de anidación a MO. Se ha podido constatar que las células CD34+ generadas no mantiene el perfil fenotípico de las iniciales (pérdida de CD38, disminución de CXCR4, disminución de la densidad del antígeno CD34), pero tienen una capacidad clonogénica mayor (la CLONE de las células CD34+ pasa del 50 al 90% en SCU), y tienen aumentada la capacidad quimocinética a gradiente de SDF-1-alfa (x4 veces) (artículo en preparación). Estos datos funcionales permiten proponer la utilización de las citadas células generadas *in vivo* para testar su capacidad de participar en la regeneración precoz de células maduras mieloides.

Figura 6.1. Incremento de CAFC de 5 semanas según combinación de citoquinas.



Citoquinas: SCF (S), IL3(3), IL6(6), FLT3-L(F), MGDF(M), todas ellas a 100 Ng/mL

Se ha cuantificado el número absoluto de CAFC de 5 semanas al inicio del cultivo, y 6 días después, y se ha calculado las veces de incremento. Los resultados son la media y desviación estándar de 5 experimentos consecutivos.



### 6.3. DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA BIOTECNOLOGICA PARA LA APLICACIÓN CLINICA DE LA EXPANSION

El mantenimiento de las células CD34+ en cultivos libres de estroma, depende de la adición exógena de citoquinas. Pero el complejo sistema de regulación del sistema hemopoyético requiere la adecuada combinación de las mismas, para que se promueva la supervivencia de las células más primitivas en el mismo, y de esta manera, garantizar la persistencia a largo plazo. El primer trabajo presentado (Capítulo 5.1), estudia las condiciones básicas para el diseño de un cultivo con garantías. En este trabajo se recogen aspectos importantes de los cultivos de expansión. Se demuestra que la capacidad proliferativa de los cultivos depende de la concentración de citoquinas. En un cultivo donde se añade SCF para promover la supervivencia de las CMH, dependiendo de la concentración de G-CSF, que actúa como factor sinérgico, para la proliferación y diferenciación celular, existe una respuesta mayor ó menor, demostrando, que la concentración de citoquinas, es importante para conseguir el efecto deseado. La presencia continuada del factor tiene además un beneficio adicional. De esta manera, la inducción de proliferación es mayor si se suplementa el cultivo diariamente, porque probablemente, se mantiene su efecto sobre las nuevas células generadas y se evitará la apoptosis por deprivación. Precisamente, en esa presencia continuada, se basa el mayor efecto a equidosis entre la forma glicosilada del G-CSF y la forma no glicosilada. El efecto, que es específico, se observa en diferentes tipos de análisis: el grado de expansión de CN, CD34 y colonias, y también la mayor inducción de diferenciación terminal, con la consiguiente aparición de células CD15+/CD11b+, equivalentes a células maduras de

linaje granulocítico. En estos experimentos iniciales, se definen las concentraciones óptimas de cultivo, que se sitúan alrededor de  $1 \times 10^5$ , aunque se realizan con medios dependientes de suero bovino fetal. Este actúa aportando nutrientes y citoquinas no empleadas en este ensayo. A la vista de los resultados anteriores, se recomienda un cultivo a dosis saturantes de citoquinas, con suplementos frecuentes para mantener un nivel de activación celular continuo, que posibilite la consecución de los objetivos.

En el segundo trabajo, Capítulo 5.2, se analiza el papel de diferentes combinaciones de citoquinas, para modular la respuesta de los productos generados. Además, se puede comprobar las características funcionales de las células obtenidas tras una expansión de corta duración. En este trabajo, se demuestra la posibilidad de obtener resultados equiparables a la expansión dependiente de lotes de suero de ternera fetal testado, con un medio libre de suero, que aporta los nutrientes básicos, y que además puede ser más fácilmente reproducible. De hecho, en estos experimentos se demuestra un menor coeficiente de variación intermuestral, probablemente porque la respuesta celular a las citoquinas exógenas es más homogénea debido a la ausencia de factores séricos no controlados. El trabajo con medios libres de suero, aporta además, la ventaja de poder ser más fácilmente trasladable a la clínica, ya que no se usan proteínas de origen animal. En la segunda parte del trabajo, se incide en el papel relevante de la citoquina FLT3-L en el mantenimiento de las células del compartimento stem en el cultivo. Como se presentaba en la introducción general, FLT3-L es una citoquina que promueve la supervivencia de las células del *pool* stem, por su efecto antiapoptótico. En este trabajo se ofrecen evidencias indirectas de ese efecto, y se puede comprobar, que la adición de FLT3-L supone una mejor conservación de las células CAFC de 5 semanas. En ese trabajo, la adición de MIP-1-alfa, también parece tener un efecto positivo en el mantenimiento del *pool* inmaduro.

Esta es una citoquina inhibidora de la proliferación terminal del sistema, y, seguramente, inducirá efectos reguladores a nivel primitivo, evitando un excesivo estrés proliferativo. Después de estos experimentos, habíamos conseguido definir un sistema de cultivo *ex vivo*, en un medio libre de suero, y con una combinación de citoquinas, que mantenía la capacidad de formación de cultivos a largo plazo. La presencia de SCF y FLT3-L contribuye probablemente al efecto observado.

El siguiente objetivo planteado es, pues, ofrecer los principios del cultivo expuesto, a un procedimiento que pudiera utilizarse en el contexto clínico. Para ello, se pasó de los pocillos de cultivo a sistemas cerrados, en bolsas semipermeables, y se testó un medio sin suero elaborado en condiciones farmacéuticas, y distribuido para uso *ex vivo*. Las condiciones de los cultivos han sido reproducidas, y se ha recomendado la expansión con concentraciones celulares reducidas, y de citoquinas elevadas (100 Ng/mL), incluyendo suplemento cada 3 días. Se utilizaron citoquinas disponibles para uso *ex vivo*, y se substituyó MIP-1 $\alpha$  e IL6 por TPO (ver Capítulo 5.3).

En esta publicación se desarrolló, también, un sistema de selección positiva de producto congelado. Evidentemente, la SCU se encuentra criopreservada en todos los bancos de SCU, y su utilización, con fines de manipulación, depende de la posibilidad de procesar, seleccionar, etc, células inmediatamente después de ser descongeladas. Para ello, se ha acoplado un lavado del DMSO, con dilución progresiva de la osmolaridad, mediante adición de dextrano (peso molecular 40.000) y albúmina humana, para preservar el mayor número posible de PH (183). Para evitar los agregados de ADN propios de la destrucción de granulocitos post-descongelación, se añade DNAasa humana recombinante, inmediatamente después de descongelar. Junto con ella, el buffer contiene Magnesio, para facilitar la acción del enzima, y citrato sódico para evitar la agregabilidad celular y de las plaquetas. Posteriormente, se hace

una selección, presensibilizando las bolas magnéticas, con el anticuerpo monoclonal anti-CD34. De esta manera, se ahorra un paso de centrifugación, y se reduce el tiempo desde la descongelación, al inicio del cultivo. Otras medidas utilizadas han sido sugeridas por otros autores, como es, la alta ratio entre bolas magnéticas y células diana, que hace posible aumentar la recuperación celular. En el producto descongelado, y utilizando SCU, que tiene una media de CD34 por CN alrededor del 0.40% tras la descongelación, el riesgo de tener recuperaciones celulares bajas es elevado (184). En nuestro caso, se presenta una serie con recuperación global de la manipulación superior al 50%. La mayor parte de las pérdidas de CD34 son inespecíficas, básicamente en relación con las tubuladuras de los equipos utilizados. Dado que los niveles de pureza y recuperación son aceptables, recomendamos este procedimiento para realizar la selección positiva de células CD34 de productos congelados, como paso imprescindible para cultivar células con concentración celular baja. En este trabajo se utiliza la combinación que incluye SCF, FLT3-L, IL3, y TPO. Fundamentados en resultados obtenidos por otros autores, (185) sustituimos en la fase de escalada clínica, el MIP-1-alfa y la IL6, por la TPO, con una acción pleiotrópica, que incluye mantenimiento de la función stem y proliferación y diferenciación multilineal. El rendimiento de los cultivos en bolsas semipermeables se ha comprobado inferior al obtenido en pocillos de cultivo, con 1 mL de medio. De todas formas, en este trabajo se monitoriza la expansión continuada de células y el rendimiento a los 6 días es importante por cuanto la ratio de expansión en CFU-GM es de cerca de 10 veces (incluyendo el 50% de pérdidas debidas a la selección celular), con el consiguiente incremento en el potencial de recuperación a corto plazo de la unidad de SCU.

Una vez definidas las condiciones de cultivo idóneas, se realizaron 5 trasplantes de SCU utilizando células CD34+ obtenidas de un donante diferente de SCU. En los 5 casos se pudo utilizar el producto expandido. Solamente en un caso (1/6), no se pudo infundir debido a una contaminación bacteriana del cultivo (dato no mostrado).

Con esta experiencia inicial, se puede afirmar que los factores que afectan los cultivos en el laboratorio están identificadas. Esta plataforma definida, puede en el futuro ser utilizada para testar nuevas citoquinas ó estrategias.



#### 6.4. EXPERIENCIA CLÍNICA DE 5 TRASPLANTES DE SCU EXPANDIDA

En el capítulo 5.3, se presenta una propuesta para desarrollar un sistema de expansión de SCU para uso clínico. En ese artículo, se presentan los resultados biológicos obtenidos con esa técnica en 5 casos. Recientemente, la colaboración de nuestro grupo se ha presentado en un trabajo que discute los resultados clínicos de esos trasplantes (186).

El modelo utilizado es el doble trasplante de SCU: uno, no manipulado y otro expandido, en un modelo de competencia *in vivo*. Este modelo tiene evidentemente críticas por cuanto no se establece una competencia igualitaria entre la dos fuentes de progenitores. Por un lado, la elección de la SCU se realiza priorizando la unidad no manipulada. Por otra parte, las células expandidas se infunden tras selección positiva, sin presencia de células T (que se han asociado a la facilitación del injerto hemopoyético). También, se puede especular que la presencia de linfocitos T de la unidad no manipulada, podrían contribuir a un aparente rechazo inmunológico de la unidad manipulada.

Los resultados que se obtuvieron muestran que las células de SCU expandidas tuvieron una presencia transitoria en el receptor. Esto se evidenció al comprobar una quimera molecular durante las 2 primeras semanas tras la infusión. Su presencia no pudo ser constatada tras el injerto hematológico ( $>500$  neutrófilos/ $\mu$ l), donde solamente se detectó quimera a partir de la unidad no manipulada. Esta capacidad limitada de las células expandidas de sobrevivir en el receptor, podría ser debido a una reducida cantidad de células infundidas, ó a defectos intrínsecos sobre la capacidad funcional de las células manipuladas para realizar la anidación y continuar la proliferación. Parece que puedan influir a este nivel dos factores: uno, es la

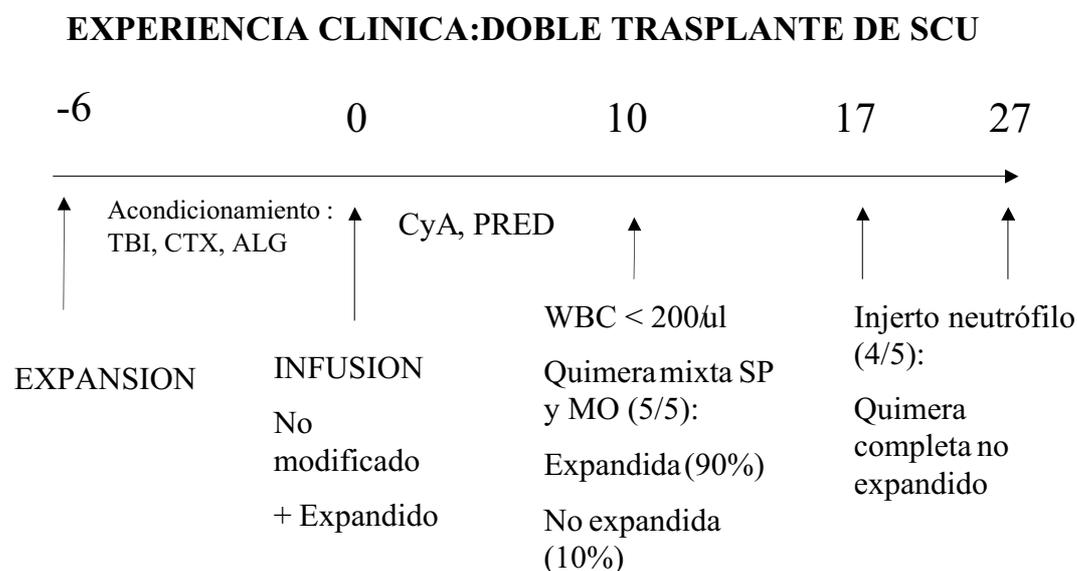
capacidad de homing modulada por la incubación *in vitro* de células progenitoras; dos, la posibilidad de inducción de apoptosis debida a la privación de citoquinas tras el lavado final y la infusión al paciente. En esta experiencia, este proceso a supuesto un tiempo aproximado de 1 hora de centrifugación y lavado, al que se tiene que añadir el tiempo que transcurre desde la infusión hasta que las células progenitoras alcanzan un microambiente adecuado para poder continuar con su mensaje proliferativo inducido *in vitro*.

La posibilidad de un rechazo inmunológico de los linfocitos T acompañantes en la unidad no manipulada podría ser otra explicación, aunque nos parece poco probable debido a la intensa inmunosupresión farmacológica a la que se encuentra el receptor y a la ausencia de EICH, en 4/5 trasplantes realizados.

Como se indica en la figura 6.2, en los 5 casos realizados, se utilizó el esquema técnico descrito en el capítulo 5.3. La expansión se realizó 6 días antes de la infusión, tras elegir una unidad de SCU, que fuera compatible 4/6 ó mayor con el enfermo. La unidad con más celularidad y mejor compatibilidad se utilizó para la infusión del producto no manipulado.

La infusión simultánea de un producto no manipulado, y otro expandido al mismo paciente, pretende establecer un modelo *in vivo* que permita evaluar la contribución de las células de SCU expandidas en el injerto hematológico en base a la trazabilidad de las células injertadas por medio de diferentes marcadores genéticos. Este modelo presenta críticas para estudiar el verdadero papel de la recuperación medular a corto plazo de las unidades manipuladas, pero sirve como modelo de estudio de la factibilidad del procedimiento, y del análisis de toxicidad.

Figura 6.2. Esquema terapéutico del protocolo de doble trasplante de SCU, y resultados del injerto a corto plazo



El porcentaje indicado en el quimerismo mixto representa el porcentaje relativo de cada donante (o fracción infundida) en el total de la quimera encontrada. La quimera mixta, se estudió por técnicas de seguimiento de HLA por medio de la técnica RSCA, en muestras de SP de menos de 200 neutrófilos/ $\mu$ L.

Un enfermo desarrolló EICH grado IV con evidencias de quimerismo pero sin injerto mieloide. En los otros 4 casos se produjo reconstitución mieloide precoz, a partir del donante no sujeto a manipulación. En estos casos no hubo evidencia de EICH moderada o severa.



## 6.5. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA DE UN NUEVO PROTOCOLO DE EXPANSIÓN EX VIVO PARA REDUCIR LOS DÍAS DE APLASIA MIELOIDE

La infusión de una cantidad elevada de células progenitoras stem y comprometidas ha de facilitar la recuperación medular a corto plazo tras la infusión. Para que ello suceda, se deben infundir un número de células elevado y funcionalmente activas. Este injerto puede ser transitorio, si se co-infunde inóculo no manipulado con CMH capaces de mantener la hemopoyesis a largo plazo. La propuesta que se formula consiste en una transfusión de elementos indiferenciados, con el objetivo de producción inmediata de neutrófilos, junto con un trasplante de CMH convencionales. Para conseguir este *pool* de células, se pretende generar ex vivo un número apreciable de células con capacidad de generación de colonias en cultivos semisólidos, que se han utilizado como un parámetro clínico de calidad de un injerto.

La expansión aquí estandarizada consiste en el cultivo de células CD34+ de SCU. Tras la selección, se inicia el cultivo con un 60% de células capaces de promover cultivos en medio semisólido, junto con un 5% de ellas que presentan capacidad CAFC. A los 6 días, parte de las células clonogénicas se han derivado a células precursoras ó células maduras (50% del cultivo ya no expresa antígeno CD34). El 50% restante constituyen células CD34+ compuestas por un 90% de células clonogénicas y un 5% por células con capacidad CAFC. Globalmente, se ha producido una generación de células con capacidad clonogénica manteniendo la función de producir colonias a largo plazo en cultivos tipo Dexter. Para que, realmente, estas células clonogénicas tengan capacidad de generar neutrófilos *in vivo*, su cifra ha de aumentar considerablemente, porque de otro modo su contribución a la producción de neutrófilos circulantes será mínima. Esto supone que durante estos 6

días, no hay posibilidad de aumentar substancialmente el contenido de progenitores de un inóculo (hay que considerar que parte del incremento obtenido en la expansión se debe a la presencia de células más maduras procedentes de las iniciales).

Para conseguir generar un número elevado de células progenitoras es necesario que se cumplan dos premisas en el cultivo:

-por un lado, que exista un *pool* de CMH que mantengan la longevidad del cultivo, y lo alimenten para que se produzcan nuevas células progenitoras

-por otro, se necesita tiempo para que las células indiferenciadas puedan realizar las suficientes divisiones como para generar una cantidad considerable de células para la infusión.

Para ello parece necesario redefinir el diseño del cultivo.

Según los resultados que se disponen, la combinación de citoquinas que presenta SCF, FLT3-L, IL6 y TPO, es la más apropiada para mantener vivas las CMH en el cultivo, y promoverlas a divisiones autoconservativas. Al mismo tiempo, fundamentalmente TPO, induce una proliferación y diferenciación multilineal, en el cultivo, sin los efectos adversos observados con la presencia de IL3. Con esta combinación, se puede plantear un protocolo que induzca mantenimiento de CMH y diferenciación durante varias semanas. La nueva propuesta incluiría un mínimo de 14 días de expansión, con criopreservación del producto expandido a tiempos definidos, y en condiciones adecuadas para su recuperación viable, con el fin de criopreservar un *pool* elevado de células progenitoras de linaje mieloide.

## 7. CONCLUSIONES



- I. La concentración de PH en la sangre placentaria es similar, aunque con mayor capacidad clonogénica, que la SPM adulta. El reducido volumen disponible de SCU condiciona su menor contenido absoluto de PH. Esta diferencia es menos evidente cuanto mayor es la inmadurez de los PH comparados.
- II. La capacidad de generación de PH a partir de células seleccionadas de SCU es mayor cuanto mas continuada es la presencia de citoquinas en el cultivo, como sucede al suplementar de citoquinas diariamente, ó al utilizar formas que aumenten la vida media activa (glicosilación).
- III. Los sistemas de cultivo que consiguen una mayor tasa de expansión utilizan citoquinas con acción en diferentes estadios de diferenciación hemopoyética. En cultivos dependientes de suero, la combinación que utiliza SCF, FLT3-L, IL3, IL6 y MIP-1-alfa es la que ha producido una mayor tasa de expansión, manteniendo el contenido de CMH iniciales.
- IV. La utilización de medios libres de suero es un paso necesario para la generalización en la aplicación clínica. Con ellos, es posible mantener las tasas de expansión obtenidas con cultivos dependientes de suero, aumentando la reproducibilidad del método.
- V. El sistema inmunomagnético directo de selección de células CD34+ presentado consigue adecuadas tasas globales de recuperación y pureza, en

muestras criopreservadas. Las células obtenidas tras la manipulación son funcionalmente similares, a las obtenidas en procedimientos de selección celular en fresco.

- VI. Con este método, utilizando SCF, FLT3-L, IL3 y TPO, se consigue amplificar hasta 20 veces las células CD34+, tras un cultivo de 6 días. El método se ha aplicado a un protocolo clínico de doble trasplante de SCU. Se han realizado 5 procedimientos, con un rendimiento neto de 7 veces en células CD34+, comparando criopreservadas/infundidas.
  
- VII. El método biotecnológico descrito, constituye una plataforma terapéutica que permite su desarrollo y adaptación a diferentes objetivos clínico-biológicos, basados en la expansión ex vivo de PH.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;337(6):373-81.
2. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339(22):1565-77.
3. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000;342(25):1846-54.
4. Brugnara C, Platt OS. The neonatal erythrocyte and its disorders. In: David G Nathan SHO, editor. *Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood*. 5th ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1998. p. 29-33.
5. Yao AC, Lind J, Tiisala R, Michelsson K. Placental transfusion in the premature infant with observation on clinical course and outcome. *Acta Paediatr Scand* 1969;58(6):561-6.
6. Usher RH, Saigal S, O'Neil A, Surainder Y, Chua LB. Estimation of red blood cell volume in premature infants with and without respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 1975;26(3-4):241-8.
7. Kinmond S, Aitchison TC, Holland BM, Jones JG, Turner TL, Wardrop CA. Umbilical cord clamping and preterm infants: a randomised trial [see comments]. *Bmj* 1993;306(6871):172-5.
8. Hofmeyr GJ, Gobetz L, Bex PJ, Van der Griendt M, Nikodem C, Skapinker R, et al. Periventricular/intraventricular hemorrhage following early and delayed umbilical cord clamping. A randomized controlled trial. *Online J Curr Clin Trials* 1993;Doc No 110.
9. Saigal S, Wison R, Usher R. Radiological findings in symptomatic neonatal plethora resulting from placental transfusion. *Radiology* 1977;125(1):185-8.
10. Saigal S, Usher RH. Symptomatic neonatal plethora. *Biol Neonate* 1977;32(1-2):62-72.
11. Erkkola R, Kero P, Kanto J, Korvenranta H, Nanto V, Peltonen T. Delayed cord clamping in cesarean section with general anesthesia. *Am J Perinatol* 1984;1(2):165-9.
12. Prendiville WJ, Elbourne D, McDonald S. Active versus expectant management in the third stage of labour (Cochrane review) [In Process Citation]. *Cochrane Database Syst Rev* 2000(3):CD000007.
13. Vanrell J. Parto normal en presentación de vértice. In: Gonzalez Merlo J, Del Sol JR, editors. *Obstetricia*. 2ª ed. Barcelona: Salvat; 1985. p. 222-248.
14. Yao AC, Moinian M, Lind J. Distribution of blood between infant and placenta after birth. *Lancet* 1969;2(7626):871-3.
15. Thomas IL, Jeffers TM, Brazier JM, Burt CL, Barr KE. Does cord drainage of placental blood facilitate delivery of the placenta? *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1990;30(4):314-8.
16. Rubinstein P, Taylor PE, Scaradavou A, Adamson JW, Migliaccio G, Emanuel D, et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* 1994;20(2-3):587-96; discussion 596-600.

17. Amat L, Querol S, Molina C, Salvador C, Badell I, Garcia J, et al. La sangre de cordón umbilical, una nueva fuente de progenitores hemopoyéticos para trasplante. Análisis de nuestra experiencia en la recolección y procesamiento. *Prog Obst Gin* 1996;39(8):571-579.
18. Dzierzak E, Medvinsky A, de Bruijn M. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today* 1998;19(5):228-36.
19. de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J* 2000;19(11):2465-74.
20. Tavian M, Hallais MF, Peault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 1999;126(4):793-803.
21. Peault B, Touraine JL, Charbord P. Haematopoietic stem cell emergence and development in the human embryo and fetus; perspectives for blood cell therapies in utero. *Semin Neonatol* 1999;4:55-66.
22. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood* 2000;95(6):1967-72.
23. Shields LE, Andrews RG. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178(5):931-7.
24. Migliaccio G, Baiocchi M, Hamel N, Eddleman K, Migliaccio AR. Circulating progenitor cells in human ontogenesis: response to growth factors and replating potential. *J Hematother* 1996;5(2):161-70.
25. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(9):4109-13.
26. Geissler K, Geissler W, Hinterberger W, Lechner K, Wurnig P. Circulating committed and pluripotent haemopoietic progenitor cells, in infants. *Acta Haematol* 1986;75(1):18-22.
27. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3828-32.
28. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991;17(2):313-29.
29. Li K, Liu J, Fok TF, Yau FW, Wong A, Li CK, et al. Human neonatal blood: stem cell content, kinetics of CD34+ cell decline and ex vivo expansion capacity. *Br J Haematol* 1999;104(1):178-85.
30. Poli F, Crespiatico L, Lecchi L, Sirchia G, Scalamogna M, Sirchia SM, et al. Highly sensitive chemiluminescent method for the detection of maternal cell contamination in human cord blood stored for allotransplantation: the experience of the Milano cord blood bank [letter]. *Blood* 1997;89(8):3061-2.
31. Scaradavou A, Carrier C, Mollen N, Stevens C, Rubinstein P. Detection of maternal DNA in placental/umbilical cord blood by locus-specific amplification of the noninherited maternal HLA gene. *Blood* 1996;88(4):1494-500.

32. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 1991;77(8):1717-22.
33. Nakauchi H. Hematopoietic stem cells: are they CD34-positive or CD34-negative? *Nat Med* 1998;4(9):1009-10.
34. Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 1999;17(5):286-94.
35. Michallet M, Philip T, Philip I, Godinot H, Sebban C, Salles G, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol* 2000;28(7):858-70.
36. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999;285(5433):1553-8.
37. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E, Pearce R, Fielding A, Devereux S, et al. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1997;15(2):535-46.
38. Korbling M, Huh YO, Durett A, Mirza N, Miller P, Engel H, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86(7):2842-8.
39. Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R. Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF. *Exp Hematol* 1993;21(4):508-14.
40. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, van Beurden CA, Baert MR, Chan PL. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1991;78(10):2527-33.
41. Breems DA, Blokland EA, Neben S, Ploemacher RE. Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia* 1994;8(7):1095-104.
42. Lefebvre P, Winter JN, Kahn LE, Giri JG, Cohen I. Megakaryocyte ex vivo expansion potential of three hematopoietic sources in serum and serum-free medium. *J Hematother* 1999;8(2):199-208.
43. Aglietta M, Bertolini F, Carlo-Stella C, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, et al. Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use. *Haematologica* 1998;83(9):824-48.
44. Campain JA, Terrell KL, Tomczak JA, Shpall EJ, Hami LS, Harrison GS. Comparison of retroviral-mediated gene transfer into cultured human CD34+ hematopoietic progenitor cells derived from peripheral blood, bone marrow, and fetal umbilical cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997;3(5):273-81.

45. Pawliuk R, Eaves C, Humphries RK. Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells *in vivo*. *Blood* 1996;88(8):2852-8.
46. Sandstrom CE, Collins PC, McAdams TA, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM. Comparison of whole serum-deprived media for ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood mononuclear cells. *J Hematother* 1996;5(5):461-73.
47. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995;86(10):3961-9.
48. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor [see comments]. *Blood* 1995;85(6):1655-8.
49. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995;13(10):2547-55.
50. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3(12):1337-45.
51. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(25):14482-6.
52. Goodell MA. Introduction: Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter? [comment]. *Blood* 1999;94(8):2545-7.
53. Pecora AL, Preti RA, Gleim GW, Jennis A, Zahos K, Cantwell S, et al. CD34+CD33- cells influence days to engraftment and transfusion requirements in autologous blood stem-cell recipients. *J Clin Oncol* 1998;16(6):2093-104.
54. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998;16(6):387-96.
55. Henon P, Sovalat H, Becker M, Arkam Y, Ojeda-Urbe M, Raidot JP, et al. Primordial role of CD34+ 38- cells in early and late trilineage haemopoietic engraftment after autologous blood cell transplantation. *Br J Haematol* 1998;103(2):568-81.
56. Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirkson MK, Slaper-Cortenbach IC, Schaasberg WP, et al. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1995;85(11):3313-9.
57. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;283(5403):845-8.
58. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, et al. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25(3-4):141-6.
59. Timeus F, Crescenzo N, Basso G, Ramenghi U, Saracco P, Gabutti V. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34+ cells. *Stem Cells* 1998;16(2):120-6.

60. Aiuti A, Tavian M, Cipponi A, Ficara F, Zappone E, Hoxie J, et al. Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur J Immunol* 1999;29(6):1823-31.
61. Ladd AC, Pyatt R, Gothot A, Rice S, McMahel J, Traycoff CM, et al. Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood* 1997;90(2):658-68.
62. Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Rice S, Srouf EF. Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. *Blood* 1997;90(11):4384-93.
63. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Clapp DW, Srouf EF. Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol* 1994;22(13):1264-72.
64. De Bruyn C, Delforge A, Lagneaux L, Bron D. Characterization of CD34+ subsets derived from bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood after stem cell factor and interleukin 3 stimulation. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(4):377-83.
65. Lu L. Characterization of cord blood stem/progenitor cells (high proliferative potential colony-forming cells). *J Hematother* 1993;2(2):201-2.
66. Lu L, Xiao M, Shen RN, Grigsby S, Broxmeyer HE. Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* 1993;81(1):41-8.
67. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Clapp DW, Hoffman R, Law P, et al. Human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells: are they the same as their adult bone marrow counterparts? [see comments]. *Blood Cells* 1994;20(2-3):382-90; discussion 390-1.
68. Durand B, Eddleman K, Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson JW. Long-term generation of colony-forming cells (CFC) from CD34+ human umbilical cord blood cells. *Leuk Lymphoma* 1993;11(3-4):263-73.
69. Mayani H, Lansdorp PM. Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1995;23(14):1453-62.
70. Knaan-Shanzer S, Verlinden SF, van Beusechem VW, Van Bekkum DW, Valerio D. Intrinsic potential of phenotypically defined human hemopoietic stem cells to self-renew in short-term *in vitro* cultures. *Exp Hematol* 1999;27(9):1440-50.
71. Xiao M, Broxmeyer HE, Horie M, Grigsby S, Lu L. Extensive proliferative capacity of single isolated CD34 human cord blood cells in suspension culture. *Blood Cells* 1994;20(2-3):455-66; discussion 466-7.
72. Breems DA, van Hennik PB, Kusadasi N, Boudewijn A, Cornelissen JJ, Sonneveld P, et al. Individual stem cell quality in leukapheresis products is related to the number of mobilized stem cells. *Blood* 1996;87(12):5370-8.
73. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996;2(12):1329-37.

74. Wang JC, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative *in vivo* SCID-repopulating cell assay. *Blood* 1997;89(11):3919-24.
75. Srour EF, Hoffman R, Zanjani D. Animal models for human hematopoiesis. *J Hematother* 1992;1(2):143-53.
76. Zanjani ED, Pallavicini MG, Harrison MR, Tavassoli M. Successful stable xenograft of human fetal hemopoietic cells in preimmune fetal sheep. *Trans Assoc Am Physicians* 1991;104:181-6.
77. Zanjani ED, Mackintosh FR, Harrison MR. Hematopoietic chimerism in sheep and nonhuman primates by in utero transplantation of fetal hematopoietic stem cells. *Blood Cells* 1991;17(2):349-63; discussion 364-6.
78. Srour EF, Zanjani ED, Cornetta K, Traycoff CM, Flake AW, Hedrick M, et al. Persistence of human multilineage, self-renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood* 1993;82(11):3333-42.
79. Traycoff CM, Hoffman R, Zanjani ED, Cornetta K, Law P, Gianni AM, et al. Measurement of marrow repopulating potential of human hematopoietic progenitor and stem cells using a fetal sheep model. *Prog Clin Biol Res* 1994;389:281-91.
80. Jones RJ, Sharkis SJ, Celano P, Colvin OM, Rowley SD, Sensenbrenner LL. Progenitor cell assays predict hematopoietic reconstitution after syngeneic transplantation in mice. *Blood* 1987;70(4):1186-92.
81. Rowley SD, Zuehlendorf M, Braine HG, Colvin OM, Davis J, Jones RJ, et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 1987;70(1):271-5.
82. Lasky LC. Hematopoietic reconstitution using progenitors recovered from blood. *Transfusion* 1989;29(6):552-7.
83. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89(7):2233-58.
84. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174-8.
85. Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, et al. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 1999;84(12):1110-49.
86. Champlin R. Optimizing the composition of bone marrow for allogeneic transplantation. *J Hematother* 1995;4(1):53-60.
87. Ploemacher RE. Characterisation and biology of normal human haematopoietic stem cells. *Haematologica* 1999;84:4-7.
88. Jacobson LO, Marks EL. Role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949;70:7440.
89. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213.

90. Magli MC, Iscove NN, Odartchenko N. Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. *Nature* 1982;295(5849):527-9.
91. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(9):3584-8.
92. Bock TA, Ziegler BL, Buhring HJ, Scheduling S, Brugger W, Kanz L. Characterization of purified and ex vivo manipulated human hematopoietic progenitor and stem cells in xenograft recipients. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:200-7; discussion 207-10.
93. Quesenberry PJ, Stewart FM, Zhong S, Habibian H, McAuliffe C, Reilly J, et al. Lymphohematopoietic stem cell engraftment. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:40-5; discussion 45-7.
94. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2000;18(6):1360-77.
95. Theilgaard-Monch K, Raaschou-Jensen K, Heilmann C, Andersen H, Bock J, Russel CA, et al. A comparative study of CD34+ cells, CD34+ subsets, colony forming cells and cobblestone area forming cells in cord blood and bone marrow allografts. *Eur J Haematol* 1999;62(3):174-83.
96. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer HE, et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994;83(9):2489-97.
97. Carlo-Stella C, Mangoni L, Almici C, Garau D, Craviotto L, Piovani G, et al. Differential sensitivity of adherent CFU-blast, CFU-mix, BFU-E, and CFU-GM to mafosfamide: implications for adjusted dose purging in autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 1992;20(3):328-33.
98. Wolf NS, Kone A, Priestley GV, Bartelmez SH. *In vivo* and *in vitro* characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol* 1993;21(5):614-22.
99. Muench MO, Cupp J, Polakoff J, Roncarolo MG. Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential. *Blood* 1994;83(11):3170-81.
100. Ivanovic Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, Cipolleschi MG, Milenkovic P, Praloran V, et al. A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-GM-like) progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors. *Stem Cells* 1999;17(4):219-25.
101. Hagan M, Patchen M, Weinberg S, MacVittie T. Erythroid progenitor (BFU-E, CFU-E) proliferation as inferred from 5'bromodeoxyuridine labeling. *Exp Hematol* 1994;22(13):1221-6.
102. Lu L, Xiao M, Li ZH, Jolliffe LK, Jones S, Broxmeyer HE, et al. Influence *in vitro* of IL-3/Epo fusion proteins compared with the combination of IL-3 plus Epo in enhancing the proliferation of single isolated erythroid and multipotential progenitor cells from human umbilical cord blood and adult bone marrow. *Exp Hematol* 1995;23(10):1130-4.
103. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 1965;66(3):319-24.
104. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966;44(3):287-99.

105. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srouf EF, Hoffman R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 1989;74(1):145-51.
106. Bender JG, Williams SF, Myers S, Nottelman D, Lee WJ, Unverzagt KL, et al. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10(3):281-5.
107. Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, et al. Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995;13(8):1922-32.
108. Martin-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, Garcia J. CD7 expression on CD34+ cells from chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *Am J Hematol* 1999;61(3):178-86.
109. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991;78(11):2791-808.
110. Roth P, Stanley ER. The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;181:141-67.
111. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79(12):3101-9.
112. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors. *Blood* 1995;86(7):2494-9.
113. Berridge MV, Fraser JK, Carter JM, Lin FK. Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat. *Blood* 1988;72(3):970-7.
114. Hirayama F, Ogawa M. Cytokine regulation of early lymphohematopoietic development. *Stem Cells* 1996;14(4):369-75.
115. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;81(11):2844-53.
116. Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Vadas MA, Lopez AF, et al. Biologic properties *in vitro* of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1986;67(1):37-45.
117. Sieff CA, Emerson SG, Donahue RE, Nathan DG, Wang EA, Wong GG, et al. Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science* 1985;230(4730):1171-3.
118. Keller JR, Ihle JN. Unique pathway of IL-3-driven hemopoietic differentiation. *J Immunol* 1989;143(12):4025-33.
119. Mayer P, Valent P, Schmidt G, Liehl E, Bettelheim P. The *in vivo* effects of recombinant human interleukin-3: demonstration of basophil differentiation factor, histamine-producing activity, and priming of GM-CSF-responsive progenitors in nonhuman primates. *Blood* 1989;74(2):613-21.
120. Szabolcs P, Moore MA, Young JW. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol* 1995;154(11):5851-61.
121. Yu H, Bauer B, Lipke GK, Phillips RL, Van Zant G. Apoptosis and hematopoiesis in murine fetal liver. *Blood* 1993;81(2):373-84.

122. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994;55:1-96.
123. Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, et al. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7350-4.
124. Mohle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an *in vitro* study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 1997;89(1):72-80.
125. Lyman SD, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993;75(6):1157-67.
126. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995;3(1):147-61.
127. Breems DA, Blokland EA, Siebel KE, Mayen AE, Engels LJ, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 1998;91(1):111-7.
128. Zhang XG, Gu JJ, Lu ZY, Yasukawa K, Yancopoulos GD, Turner K, et al. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 1994;179(4):1337-42.
129. Ogawa M, Yonemura Y, Ku H. *In vitro* expansion of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997;15 Suppl 1:7-11; discussion 12.
130. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(18):6934-8.
131. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72(5):767-78.
132. McCormick F. Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev* 1995;42(4):500-6.
133. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73(6):1059-65.
134. Kato JY, Sherr CJ. Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(24):11513-7.
135. Moore MA. Hematopoietic reconstruction: new approaches. *Clin Cancer Res* 1995;1(1):3-9.
136. Hardy CL. The homing of hematopoietic stem cells to the bone marrow. *Am J Med Sci* 1995;309(5):260-6.
137. Ogawa M. Stochastic model revisited. *Int J Hematol* 1999;69(1):2-5.
138. Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 1986;45(6):917-27.
139. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain

diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86(6):2031-5.

140. Curry JL, Trentin JJ. Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. Dev Biol 1967;15(5):395-413.

141. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. J Cell Physiol 1977;91(3):335-44.

142. Udomsakdi C, Eaves CJ, Swolin B, Reid DS, Barnett MJ, Eaves AC. Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long-term culture due to a defect at the leukemic stem cell level. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(13):6192-6.

143. Gupta P, Oegema TR, Jr., Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM. Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks *in vitro* when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: requirement for optimal binding interactions of heparan sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins. Blood 2000;95(1):147-55.

144. Dao MA, Hannum CH, Kohn DB, Nolte JA. FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction. Blood 1997;89(2):446-56.

145. Brandt J, Srouf EF, van Besien K, Briddell RA, Hoffman R. Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow. J Clin Invest 1990;86(3):932-41.

146. Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. Blood 1993;82(2):378-84.

147. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. J Exp Med 1996;183(6):2551-8.

148. Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(9):4698-703.

149. Bhatia R, McGlave PB, Miller JS, Wissink S, Lin WN, Verfaillie CM. A clinically suitable ex vivo expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium. Exp Hematol 1997;25(9):980-91.

150. Barnett MJ, Eaves CJ, Phillips GL, Gascoyne RD, Hogge DE, Horsman DE, et al. Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: results of a pilot study [see comments]. Blood 1994;84(3):724-32.

151. Henschler R, Brugger W, Luft T, Frey T, Mertelsmann R, Kanz L. Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34(+)-selected human peripheral blood progenitor cells. Blood 1994;84(9):2898-903.

152. Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) *in vitro* and their expansion in defined medium. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(4):1470-4.

153. Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo [see comments]. *N Engl J Med* 1995;333(5):283-7.
154. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89(8):2644-53.
155. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion *in vitro* of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(18):9836-41.
156. Koller MR, Maher RJ, Manchel I, Oxender M, Smith AK. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J Hematother* 1998;7(5):413-23.
157. Shadduck RK, Gilmore GL, Lister J. Role of serum-free medium in the ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2000;18(2):154-5.
158. Mobest D, Mertelsmann R, Henschler R. Serum-free ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Biotechnol Bioeng* 1998;60(3):341-7.
159. Kohler T, Plettig R, Wetzstein W, Schaffer B, Ordemann R, Nagels HO, et al. Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. *Stem Cells* 1999;17(1):19-24.
160. Muench MO, Moore MA. Accelerated recovery of peripheral blood cell counts in mice transplanted with *in vitro* cytokine-expanded hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 1992;20(5):611-8.
161. Serrano F, Varas F, Bernad A, Bueren JA. Accelerated and long-term hematopoietic engraftment in mice transplanted with ex vivo expanded bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(6):855-62.
162. Albella B, Segovia JC, Bueren JA. Does the granulocyte-macrophage colony-forming unit content in ex vivo-expanded grafts predict the recovery of the recipient leukocytes? *Blood* 1997;90(1):464-70.
163. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, Mick R, Gewirtz AM. *In vitro* and *in vivo* evidence that ex vivo cytokine priming of donor marrow cells may ameliorate posttransplant thrombocytopenia. *Blood* 1998;91(1):353-9.
164. Brandt JE, Bartholomew AM, Fortman JD, Nelson MC, Bruno E, Chen LM, et al. Ex vivo expansion of autologous bone marrow CD34(+) cells with porcine microvascular endothelial cells results in a graft capable of rescuing lethally irradiated baboons. *Blood* 1999;94(1):106-13.
165. Andrews RG, Briddell RA, Hill R, Gough M, McNiece IK. Engraftment of primates with G-CSF mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cells expanded in G-CSF, SCF and MGDF decreases the duration and severity of neutropenia. *Stem Cells* 1999;17(4):210-8.
166. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex

vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999;93(11):3736-49.

167. Kollet O, Moore JG, Aviram R, Ben-Hur H, Liu BL, Nagler A, et al. The plant lectin FRIL supports prolonged *in vitro* maintenance of quiescent human cord blood CD34(+)/CD38(-/low)/SCID repopulating stem cells. *Exp Hematol* 2000;28(6):726-36.

168. van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE. Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. *Blood* 1999;94(9):3055-61.

169. Srour EF, Abonour R, Cornetta K, Traycoff CM. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells: are we there yet? *J Hematother* 1999;8(2):93-102.

170. Williams DA. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? [editorial]. *Blood* 1993;81(12):3169-72.

171. Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron JM. Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells [letter]. *Lancet* 1999;354(9184):1092-3.

172. McNiece I, Jones R, Cagnoni P, Bearman S, Nieto Y, Shpall EJ. Ex-vivo expansion of hematopoietic progenitor cells: preliminary results in breast cancer. *Hematol Cell Ther* 1999;41(2):82-6.

173. Shpall EJ, Quinones R, Jones R, Bearman SI, Cagnoni P, Giller R, et al. Transplantation of adult and pediatric cancer patients with cord blood progenitors expanded ex vivo. *Blood* 1999;94(10):712a.

174. Chabannon C, Novakovitch G, Blache JL, Olivero S, Camerlo J, Genre D, et al. The role of autologous hematopoietic progenitor and cell reinfusion for intensive chemotherapy in women with poor-prognosis breast cancer. Clinical studies with ex-vivo expanded cells produced with the Aastrom Replicell technology. *Hematol Cell Ther* 1999;41(2):78-81.

175. Pecora AL, Stiff P, Jennis A, Goldberg S, Rosenbluth R, Price P, et al. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(7):797-9.

176. Lundell BI, Mandalam RK, Smith AK. Clinical scale expansion of cryopreserved small volume whole bone marrow aspirates produces sufficient cells for clinical use. *J Hematother* 1999;8(2):115-27.

177. Kurtzberg J, Jaroscak J, Martin PL, Driscoll T, Waters-Pick B, Douville J, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo expanded cells, a phase I trial using the Replicell system. *Blood* 1999;94(10):571a.

178. Stiff P, Chen B, Franklin W, Oldenberg D, Hsi E, Bayer R, et al. Autologous transplantation of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. *Blood* 2000;95(6):2169-74.

179. Malik S, Pecora AL, Petri RA, Goldberg SL, Falvey M, Morgan D, et al. Engraftment after high dose therapy for non-Hodgkin's lymphoma (NHL) with low doses of CD34+ peripheral blood stem cells and *in vitro* expanded bone marrow cells. *Blood* 1999;94(10):558a.
180. Briddell RA, Kern BP, Zilm KL, Stoney GB, McNiece IK. Purification of CD34+ cells is essential for optimal ex vivo expansion of umbilical cord blood cells. *J Hematother* 1997;6(2):145-50.
181. Martin-Henao GA, Picon M, Amill B, Querol S, Gonzalez JR, Martinez C, et al. Isolation of CD34+ progenitor cells from peripheral blood by use of an automated immunomagnetic selection system: factors affecting the results. *Transfusion* 2000;40(1):35-43.
182. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Ruggieri L, Li ZH, Lyman SD. Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 1995;23(10):1121-9.
183. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(22):10119-22.
184. Cancelas JA, Querol S, Canals C, Bertran J, Limon A, Amill B, et al. CD34+ cell positive selection from mobilized peripheral blood by an indirect immunomagnetic method: effect of the type of mobilization and assessment of tumor depletion ability. *J Hematother* 1995;4(6):531-8.
185. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor [see comments]. *J Clin Invest* 2000;105(7):1013-21.
186. Fernandez MN, Granena A, Millan I, Regidor C, Cabrera R, Querol S, et al. Evaluation of engraftment of ex vivo expanded cord blood cells in humans. *Bone Marrow Transplant* 2000;25 Suppl 2:S61-7.

## 7. CONCLUSIONES

- I. *La concentración de PH en la sangre placentaria es similar, aunque con mayor capacidad clonogénica, que la SPM adulta. El reducido volumen disponible de SCU condiciona su menor contenido absoluto de PH. Esta diferencia es menos evidente cuanto mayor es la inmadurez de los PH comparados.*
- II. *Las células CD34+ seleccionadas a partir de SCU pueden mantenerse in vitro en cultivos líquidos libres de estroma. La amplificación celular depende de la sinergia entre las citoquinas.*
- III. *La capacidad de generación de PH a partir de células seleccionadas de SCU es mayor cuanto más continuada es la presencia de citoquinas en el cultivo, como sucede al suplementar de citoquinas cada día, ó utilizar formas que aumenten la vida media activa (glicosilación).*
- IV. *Los sistemas de cultivo que consiguen una mayor tasa de expansión utilizan citoquinas con acción en diferentes estadios de diferenciación hemopoyética. La combinación que utiliza SCF, FLT3-L, junto con IL3, IL6 y MIP-1-alfa es la que ha producido una mayor tasa de expansión de progenitores comprometidos, manteniendo el contenido de CMH iniciales.*
- V. *La utilización de un medio libre de suero es un paso necesario para la generalización en la aplicación clínica. Con estos es posible mantener las tasas de expansión obtenidas con cultivos dependientes de suero, y además, contribuyen a la reproductibilidad del método.*
- VI. *El sistema inmunomagnético directo de selección de células CD34+ presentado consigue adecuadas tasas globales de recuperación y pureza. Las células obtenidas tras la manipulación son funcionalmente similares, a las obtenidas en procedimientos de selección celular en fresco.*

- VII. *Las células CD34+ seleccionadas de unidades procedentes de un banco de SCU conservan su capacidad de expansión ex vivo. Utilizando SCF, FLT3-L, IL3, TPO se consigue amplificar hasta 20 veces las células CD34+ iniciales, tras un cultivo de 6 días. El método se ha aplicado a un protocolo clínico de doble trasplante de SCU. Se han realizado 5 procedimientos, con una infusión media de  $7,16 \pm 4,8$  veces más células CD34+ que las criopreservadas.*
- VIII. *Este método biotecnológico constituye una plataforma terapéutica que permite su optimización y adaptación a diferentes objetivos clínico-biológicos.*