



Universitat Autònoma  
de Barcelona

TERÀPIA CEL·LULAR AVANÇADA BASADA EN  
L'EXPANSIÓ DE PROGENITORS  
HEMATOPOÈTICS DE SANG DE CORDÓ  
UMBILICAL

Alba Casamayor Genescà

Tesi Doctoral

Programa de Doctorat en Biotecnologia

Escola d'Enginyeria - Departament d'Enginyeria Química

Directors: Dr. Arnau Pla, Dr. Francesc Gòdia i Dr. Joan Garcia

Bellaterra, setembre 2013



ARNAU PLA CALVET, Facultatiu del Banc de Sang i Teixits, FRANCESC GÒDIA CASABLANCAS, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i JOAN GARCIA LÓPEZ, Director de la Càtedra de recerca en Teràpia Cel·lular del Banc de Sang i Teixits

CERTIFIQUEM:

Que la llicenciada Alba Casamayor Genescà ha dut a terme amb la nostra direcció, en els laboratoris del Banc de Sang i Teixits, el treball que amb el títol de: **Teràpia cel·lular avançada basada en l'expansió de progenitors hematopoètics de sang de cordó umbilical**, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctora en Biotecnologia.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, setembre de 2013

Arnau Pla Calvet

Francesc Gòdia Casablanca

Joan Garcia López



## **A la meva família**

“El que fa bonic el desert és que en algun lloc amaga un pou...” (El Petit Príncep d'*Antoine de Saint-Exupéry*)



# PRÒLEG

---

Des de la primera aplicació amb èxit de la sang de cordó umbilical com a producte terapèutic l'any 1988, aquesta font cel·lular ha adquirit un paper rellevant en el context del tractament de malalties hematològiques. Fruit d'això i des d'ençà, s'ha produït una intensa activitat científica per tal d'aprofundir en el coneixement d'aquesta font cel·lular i ampliar-ne així la seva utilització. No obstant, a dia d'avui, continuen existint importants limitacions que tenen una repercussió directe en el tractament dels pacients, de les quals destaquen els prolongats períodes d'aplàsia medul·lar.

Per tal de donar resposta a aquesta problemàtica, i tenint en compte que la teràpia cel·lular i la medicina regenerativa es postulen com a motors de la medicina del futur, s'apunta que l'ampliació en la utilització d'aquesta font cel·lular podria passar per a la seva utilització com a base d'un producte de teràpia cel·lular avançada. En aquest sentit, en les darreres dècades, nombrosos grups de recerca han centrat la seva activitat investigadors en aquest àmbit, generant nombroses i diverses aproximacions. No obstant, són pocs els que han aconseguit aproximar-se als resultats terapèutics desitjats en termes de reducció de període d'aplàsia aconseguits amb les fonts cel·lulars de primera elecció: el moll d'os i la sang perifèrica mobilitzada. Així doncs, tot i els progressos significatius, es continuen plantejant importants reptes científics per tal d'obtenir millors resultats clínics.

És precisament en aquest punt en el qual s'emmarca aquesta tesi doctoral, doncs el treball realitzat ha consistit en el desenvolupament d'una teràpia cel·lular a partir de l'expansió i especialització selectiva dels progenitors hematopoètics de la sang de

cordó umbilical. El treball es centra en la definició d'una estratègia d'expansió per tal de generar dosis cel·lulars clínicament significatives, així com en la caracterització funcional, tant *in vitro* com *in vivo*, del producte cel·lular resultant. Amb aquesta nova aproximació es pretén donar resposta a les creixents demandes de millora en l'ús de la sang de cordó umbilical.



# AGRAÏMENTS

---

Per fi ha arribat el moment, i és que el fet que estigui escrivint els agraïments és senyal inequívoc que l'elaboració d'aquesta tesi doctoral ja està a la recta final.

Aquest treball és el resultat de la feina realitzada durant els darrers 6 anys, la majoria de la qual no hagués estat possible sense vosaltres. I és que sí, vull agrair-vos a tots i cadascun de vosaltres la tant valuosa ajuda que m'heu brindat al llarg de tot aquest camí...

A l'Arnau Pla, per la infinitat de coneixements transmesos, per la seva confiança i per haver-me guiat i ajudat a créixer com a científica.

Al Quico Gòdia i al Joan Garcia per haver-me donat la possibilitat i confiança per a realitzar aquesta tesi doctoral.

Al Jordi Joan Cairó, per haver-me obert les portes en aquest món i per transmetre'm, des de les primeres classes de la carrera fins els últims dies de treballar plegats el seu entusiasme per la biotecnologia.

A la Marta Vives, per la seva tant agradable i inestimable col·laboració.

A tots els meus companys i amics de laboratori, perquè formem un bon equip! Juan Pablo Labbrozzi, treballar al teu costat ha estat fantàstic, i espero poder-ho tornar a fer algun dia; Irene Oliver Vila, els teus innumerables consells han estat molt valuosos; Noèlia Pujals, juntes podem amb tot!; Sílvia Marín, encantadores les hores i hores que hem passat compartint cabina de flux; Marta Caminal, amb una mirada ja en tenim prou per esclatar de riure; Joaquim Vives, gràcies per transmetre'ns en tot moment tanta energia i optimisme; i Maribel Coca, gràcies per la teva incansable ajuda. Tots vosaltres m'heu ensenyat el significat de les paraules "companyarisme" i "treball en

equip". Junts hem fet front a fracassos experimentals, hem perseverat, hem continuat caminant i finalment hem celebrat els bons resultats. Perquè una de les coses que he après durant aquest temps és que tan important és sobreposar-se als entrebancs, com celebrar els èxits (i quins esmorzars que ens hem regalat de tant en tant!!).

Però a banda del què és l'entorn científic, vull posar especial èmfasi al meu entorn familiar i d'amistats, els meus vertaders pilars. A les meves amigues, gràcies per haver-me acompanyat en aquest camí durant tot aquest temps. A la Núria i a la Mercè, una referència per a mi, incondicionals, còmplices, protectores... tot el que es pugui demanar d'unes germanes! Als meus pares, TOT això és gràcies a vosaltres! Sense cap mena de dubte, la meva brúixola i els millors consellers que hagi imaginat mai. Gràcies, gràcies i gràcies!!! I al David, per la teva comprensió, suport i estima. Com vaig llegir un dia en algun lloc, *els millors records són els d'ahir, però els millors moments encara han de venir*. De ben segur que plegats ho convertirem en una realitat.

# ÍNDEX

---

GLOSSARI .....	1
<b>CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>3</b>
1.1. CÈL·LULES MARE HEMATOPOÈTIQUES .....	5
1.2. FONTS DE CMH .....	8
1.3. LA SCU COM A FONT DE CMH .....	9
1.4. APROXIMACIONS PER A LA MILLORA DE L'EMPELT EN EL TRASPLANTAMENT DE SCU .....	13
<b>CAPÍTOL 2: OBJECTIUS .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTOL 3: DESENVOLUPAMENT D'UNA ESTRATÈGIA D'EXPANSIÓ .....</b>	<b>25</b>
3.1. INTRODUCCIÓ .....	27
3.2. RESULTATS .....	29
3.2.1. Estudi de la cinètica de creixement de la població cel·lular CD34 <sup>+</sup> i de les cèl·lules nucleades totals en cultiu en discontinu .....	29
3.2.2. Estudi del grau maduratiu de les poblacions cel·lulars generades en cultiu en base a la seva caracterització fenotípica .....	38
3.2.3. Disseny d'una estratègia d'expansió/diferenciació de les CPH a llinatge neutròfil .....	41
3.2.4. Estudi del grau maduratiu en base a la caracterització funcional dels progenitors mieloides obtinguts a partir del cultiu discontinu alimentat .....	44
3.2.5. Estudi del grau maduratiu de les poblacions cel·lulars generades en cultiu discontinu alimentat en base a la seva caracterització fenotípica .....	48
3.3. DISCUSSIÓ .....	50
<b>CAPÍTOL 4: ESTUDI DELS MECANISMES D'ACCIÓ DE LA POBLACIÓ CD34<sup>+</sup> A PARTIR D'ASSAJOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>55</b>
4.1. INTRODUCCIÓ .....	57
4.2. RESULTATS .....	61
4.2.1. Caracterització funcional <i>in vitro</i> dels precursors neutrofílics.....	62
4.2.2. Caracterització funcional <i>in vitro</i> de les MDSC .....	70
4.3. DISCUSSIÓ .....	74

<b>CAPÍTOL 5: ESTUDI DE LA CAPACITAT D'EMPELT I REPOBLACIÓ EN MODEL MURÍ NOD-<i>Scid</i></b> .....	79
5.1. INTRODUCCIÓ .....	81
5.2. RESULTATS .....	83
5.2.1. Producció dels tres productes cel·lulars a trasplantar al model murí NOD- <i>Scid</i> <i>IL2ry<sup>null</sup></i> .....	83
5.2.2. Caracterització <i>in vitro</i> dels tres productes cel·lulars a trasplantar al model murí NOD- <i>Scid</i> <i>IL2ry<sup>null</sup></i> .....	86
5.2.2.1. Determinació de la capacitat clonogènica dels progenitors hematopoètics .....	87
5.2.2.2. Caracterització fenotípica dels progenitors hematopoètics .....	90
5.2.3. Caracterització <i>in vivo</i> dels productes cel·lulars: estudi de la capacitat d'empelt i repoblació en model murí NOD- <i>Scid</i> <i>IL2ry<sup>null</sup></i> .....	92
5.2.3.1. Reconstitució hematopoètica a curt termini .....	94
5.2.3.2. Reconstitució hematopoètica a llarg termini .....	97
5.2.3.3. Estudi de la cinètica de repoblament .....	101
5.2.4. Estudis toxicològics i de biodistribució .....	104
5.3. DISCUSSIÓ .....	107
<b>CAPÍTOL 6: DEFINICIÓ DEL BIOPROCÉS PER A L'OBTENCIÓ DE DOSIS CEL·LULARS CLÍNICAMENT SIGNIFICATIVES</b> .....	113
6.1. INTRODUCCIÓ .....	115
6.2. RESULTATS .....	120
6.2.1. La metodologia de cultiu: avaluació de la seva viabilitat per a la generació de dosis clíniques .....	120
6.2.2. Disseny d'una estratègia de cultiu adaptada .....	122
6.2.3. Prova de concepte: generació de dosis clíniques .....	130
6.2.4. Estudi de l'estabilitat genètica del producte expandit .....	136
6.2.5. Definició del bioprocés i els seus punts de control .....	138
6.3. DISCUSSIÓ .....	143
<b>CAPÍTOL 7: CONCLUSIONS GENERALS I TREBALL FUTUR</b> .....	149
7.1. CONCLUSIONS .....	151
7.2. TREBALL FUTUR .....	153
<b>CAPÍTOL 8: MATERIALS I MÈTODES</b> .....	155
8.1. Aïllament cel·lular .....	157
8.1.1. Purificació de cèl·lules CD34 <sup>+</sup> de SCU fresca .....	157
8.1.2. Purificació de cèl·lules CD34 <sup>+</sup> d'un cultiu d'expansió .....	159

8.1.3. Aïllament de la fracció mononuclear d'un residu leucocitari .....	159
8.2. Cultiu cel·lular .....	159
8.2.1. Preparació del medi de cultiu d'expansió de cèl·lules CD34+ .....	159
8.2.2. Cultiu d'expansió de CMH/CPH .....	160
8.2.3. Càlcul del factor d'expansió i del nombre de duplicacions .....	160
8.2.4. Generació d'una capa confluent de cèl·lules mesenquimals irradiades ...	160
8.3. Tècniques citomètriques .....	161
8.3.1. Quantificació de cèl·lules CD34+ i cèl·lules nucleades totals .....	161
8.3.2. Cicle cel·lular .....	162
8.3.3. Viabilitat cel·lular .....	163
8.3.4. Fenotip neutròfil .....	165
8.3.5. MDSC .....	167
8.3.6. Fenotip CD34+ madur .....	169
8.3.7. Fenotip CD34+ immadur .....	169
8.3.8. Determinació del grau de quimerisme humà en sang perifèrica murina ..	171
8.3.9. Determinació del grau de quimerisme humà en moll d'os murí .....	173
8.3.10. Càlcul del grau de quimerisme humà .....	175
8.4. Assajos funcionals <i>in vitro</i> .....	175
8.4.1. Cultius clonogènics .....	175
8.4.2. Càlcul de l'eficiència clonogènica .....	177
8.4.3. Càlcul del factor d'expansió clonogènic .....	177
8.4.4. Determinació de la capacitat fagocítica .....	177
8.4.5. Determinació de la capacitat immunomoduladora .....	179
8.5. Mesura de la concentració de glucosa/làctic .....	181
8.6. Mesura de pH .....	181
8.7. Estudis d'empelt de cèl·lules humanes en ratolins immunodeficients NOD- <i>Scid IL2r<sup>null</sup></i> .....	182
8.7.1. Model murí .....	182
8.7.2. Preparació de les dosis d'injecció i transferència als animals .....	183
8.7.3. Sacrifici i extracció de mostres .....	184
8.7.4. Necròpsia .....	184
8.7.5. Immunohistoquímica .....	185
8.8. Estudis citogenètics .....	185
<b>CAPÍTOL 9: REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</b>	<b>187</b>



## GLOSSARI

---

APC	<i>Allophycocyanin</i>
BFU-E	Unitat formadora de colònies eritroides - <i>Burst forming unit erythroid</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i>
CFU-GM	Unitat formadora de colònies granulocítiques/macròfag - <i>Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage</i>
CFU-MIX	Unitat formadora de colònies mixtes - <i>Colony Forming Unit-Mix</i>
CMH	Cèl·lula mare hematopoètica
CNT	Cèl·lules nucleades totals
CPH	Cèl·lula progenitora hematopoètica
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Ep	Factor d'expansió
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Flt-3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
GMP	<i>Good manufacturing practices</i>
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IHQ	Immunohistoquímica
IL3	Interleuquina 3
IL6	Interleuquina 6
INF- $\gamma$	Interferó gamma
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
LT-HSC	<i>Long term-hematopoietic stem cells</i>
LT-SRC	<i>Long-term Scid repopulating cells</i>
MDSC	<i>Myeloid derived supressor cells</i>
MHC	Complex major d'histocompatibilitat - <i>Major histocompatibility complex</i>
MO	Moll d'os
MRT	Mortalitat relacionada amb el trasplantament
NOD- <i>scid</i>	<i>Nonobese diabetic severe combined immunodeficiency mice</i>
PB	<i>Pacific Blue</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>

<b>rSRC</b>	<i>Rapid Scid repopulating cells</i>
<b>SCF</b>	<i>Stem cell factor</i>
<b>Scid</b>	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
<b>SCU</b>	Sang de cordó umbilical
<b>SPM</b>	Sang perifèrica mobilitzada
<b>ST-HSC</b>	<i>Short term-hematopoietic stem cells</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TPO</b>	Trombopietina



# I

Introducció



## 1.1 CÈL·LULES MARE HEMATOPOÈTIQUES

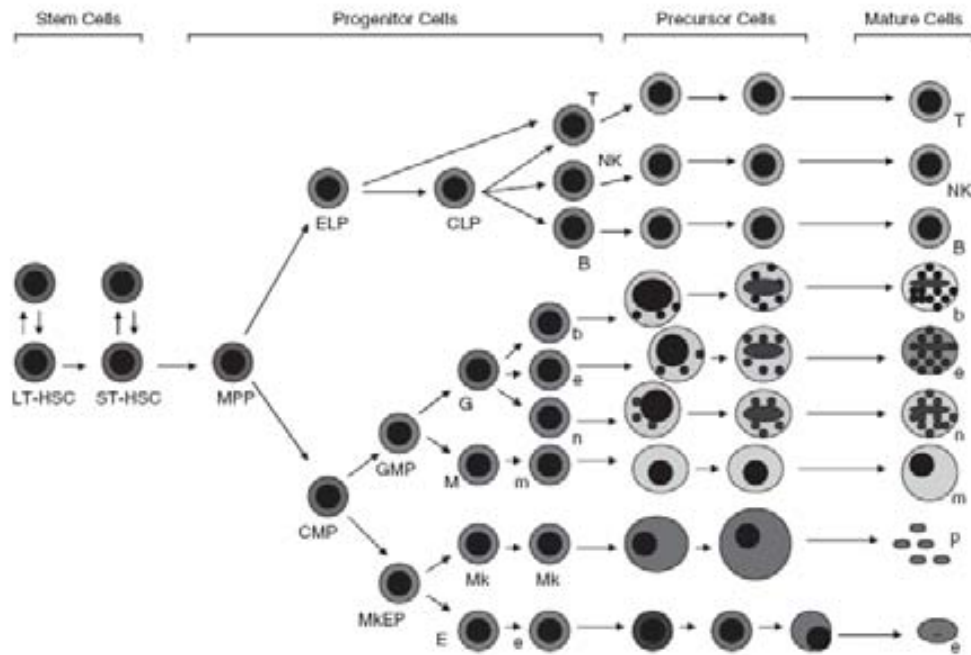
Les cèl·lules mare hematopoètiques (CMH) es defineixen com a cèl·lules amb capacitat d'autorenovació i de generació de tots els llinatges cel·lulars sanguinis, en un procés anomenat hematopoesi (Domen and Weissman, 1999). L'hematopoesi és un procés dinàmic i finament regulat que transcorre en el seu nínxol habitual, el moll d'os, el qual està compost per una sèrie d'elements que es classifiquen en: cèl·lules (poblacions cel·lulars heterogènies, la majoria de les quals d'origen mesenquimal, així com les pròpies CMH i la seva progènie), matriu extracel·lular (conforma l'estructura tridimensional del nínxol) i factors de creixement, citoquines i quimioquines (Hines et al., 2008). Tots aquests elements interaccionen de forma simultània per tal de que el sistema sigui capaç de mantenir l'homeòstasi a partir del balanç que es dona entre l'autorenovació, la diferenciació i l'apoptosi (mort cel·lular) (Domen et al., 2006, Domen and Weissman, 1999, Zon, 2008, Martinez-Agosto et al., 2007). Una dada que posa de manifest la rellevància del procés és la productivitat cel·lular: en un organisme humà adult, degut a la reduïda vida mitja de la majoria de les cèl·lules madures efectores, es produeixen en torn de  $1,5 \times 10^6$  cèl·lules sanguínies per segon (Bryder et al., 2006, Hines et al., 2008, Kondo et al., 2003, Mayani, 2010).

Tal com s'esquematitza en la Figura 1.1, la progènie més directa de les CMH són els progenitors multipotents (CPH o cèl·lules progenitores hematopoètiques), els quals mantenen la capacitat de donar lloc a cèl·lules de tots els llinatges, però limitats en la seva capacitat d'autorenovació. Aquests progenitors multipotents, al seu torn, donen lloc a progenitors oligopotents, que es caracteritzen per estar compromesos cap a un dels dos grans llinatges sanguinis: progenitor limfoide comú i progenitor mieloide

comú. Finalment, aquests progenitors oligopotents donen lloc a progenitors més compromesos dels diferents llinatges a partir dels quals es generen totes les cèl·lules madures sanguínies (Bryder et al., 2006). Aquest esquema de diferenciació en diversos nivells presenta una sèrie d'avantatges; per una banda, permet la generació d'un ampli nombre de cèl·lules madures a partir d'una única CMH. A més, aquesta característica té associada l'avantatge d'adaptar-se a les demandes homeostàtiques d'un determinat tipus de cèl·lules madures efectores. Per altra banda, aquest esquema de diferenciació jeràrquica té la particularitat de posar molt poca pressió proliferativa en la població de CMH, la qual cosa els permet residir en la fase G<sub>0</sub> del cicle cel·lular, ciclant de forma esporàdica. Aquesta mínima pressió proliferativa afavoreix al fet que les cèl·lules no estiguin exposades amb més freqüència a possibles mutacions indesitjables associades al procés de replicació del DNA (Bryder et al., 2006).

Aquest ventall de CMH i CPH que conformen l'arbre de diferenciació hematopoètic comparteixen un mateix marcador, l'antigen CD34, una glicoproteïna de membrana de 90-120 kDa (Krause et al., 1996). L'existència d'aquest marcador immunofenotípic en permet tant la seva detecció com l'aïllament mitjançant tècniques de citometria de flux i immunomagnètiques. No obstant, el fenotip s'ha de considerar com un indicador subrogat de la funcionalitat cel·lular, essent els assajos funcionals *in vitro*, concretament els cultius clonogènics, els que tradicionalment s'han utilitzat per a la caracterització funcional dels progenitors hematopoètics (van Os et al., 2004). Aquests assajos consisteixen en la sembra de les CPH en un medi semisòlid i posterior recompte i classificació de les colònies cel·lulars generades, permetent determinar el llinatge cel·lular al qual estan orientades les CPH (Broxmeyer et al., 2009). Tot i això, aquests tipus d'assajos no permeten determinar-ne la seva capacitat d'empelt, de

manera que l'assaig funcional definitiu per identificar les CMH/CPH és l'assaig de repoblament *in vivo* de ratolins immunodeficients (NOD-*Scid*). En aquest tipus d'assajos s'avaluen les principals característiques de les CMH: la seva capacitat d'empelt i repoblació del sistema hematopoètic d'un hoste amb el sistema hematopoètic empobrit (Broxmeyer et al., 2009, Hines et al., 2008). A partir d'aquests assajos de repoblament, les CMH es poden dividir en dues poblacions cel·lulars: CMH amb capacitat repobladora a llarg termini (LT-HSC) i CMH amb capacitat repobladora a curt termini (ST-HSC) (Kondo, 2010, Zon, 2008). Com el seu nom indica, les LT-HSC tenen la capacitat de repoblar un hoste a llarg termini i de forma definitiva, mentre que les ST-HSC únicament podran reconstituir el sistema hematopoètic de forma transitòria degut a la seva limitada capacitat d'autorenovació (Kondo, 2010). Tradicionalment les LT-HSC s'han identificat a partir dels assajos de trasplantaments seriatos en ratolins immunodeficients, en els quals les CMH trasplantades en un primer hoste són novament aïllades per ser trasplantades a un segon hoste (Bryder et al., 2006).



**Figura 1.1:** Organització jeràrquica del sistema hematopoètic. Es creu que, com a mínim, el sistema hematopoètic està dividit en 4 compartiments cel·lulars. El primer compartiment correspon a les cèl·lules mare hematopoètiques (CMH), les quals tenen la capacitat d'autorenovació com de diferenciació. Aquestes CMH es divideixen en dos subtipus: les que tenen capacitat de repoblació a llarg termini (LT-HSC) i les que tenen capacitat de repoblació a curt termini (ST-HSC). A continuació, les CMH donen lloc a les CPH, les cèl·lules progenitores hematopoètiques. Al seu torn, les CPH donen lloc a tots els precursors dels diferents llinatges, essent les cèl·lules madures efectores les últimes de la cascada de diferenciació (Mayani, 2010).

## 1.2 FONTS DE CMH

El trasplantament de les CMH és una pràctica habitual en el tractament de malalties hematològiques en les que el pacient s'ha de sotmetre a una mieloablació mitjançant quimioteràpia i/o radioteràpia. Aquests trasplantaments tenen com a objectiu reconstituir el sistema hematopoètic del pacient de forma estable i duradora.

Actualment, s'estan realitzant de l'ordre de 55.000-60.000 trasplantaments de CMH a l'any en tot el món (Gyurkocza et al., 2010). Tradicionalment, les fonts de CMH utilitzades han estat el moll d'os (MO) i la sang perifèrica mobilitzada (SPM) de donants amb el complex major d'histocompatibilitat (representat pels antígens leucocitaris, en endavant HLA) emparentat amb el receptor, ambdues classificades com a fonts cel·lulars adultes. No obstant, s'estima que únicament un 30% dels pacients disposen d'un donant de CMH adultes amb aquestes característiques (Barker and Wagner, 2003, Brown and Boussiotis, 2008, Cutler and Ballen, 2012). Una font alternativa de CMH és la sang de cordó umbilical (SCU) en la que, degut a la immaduresa immunològica del sistema hematopoètic dels nadons, els requeriments de compatibilitat d'HLA entre donant i receptor són molt inferiors. De fet, s'estima que un 95% dels pacients que requereixen un trasplantament de CMH disposen d'una unitat de SCU compatible (Gyurkocza et al., 2010).

### 1.3 LA SCU COM A FONT DE CMH

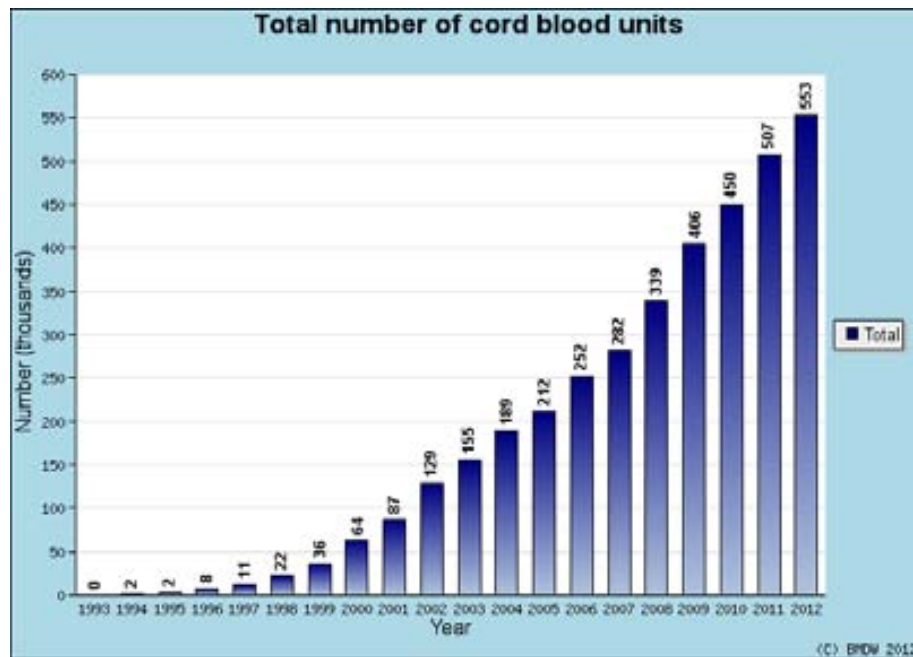
---

El 1988, l'equip de la Dra. Gluckman va realitzar el primer trasplantament de SCU en un pacient amb anèmia de Fanconi (Gluckman et al., 1989). Des d'aleshores, s'han realitzat aproximadament 20.000 trasplantaments pel tractament de múltiples malalties hematològiques (Rocha and Broxmeyer, 2009). Aquest fet es deu als nombrosos avantatges que presenta la SCU com a font de CMH, de les quals destaquen: la ràpida disponibilitat de les unitats, el reduït risc d'infecció vírica del receptor, l'absència de risc pel donant, la baixa incidència i gravetat de la malaltia de l'empelt contra l'hoste

(GvHD, de l'anglès *Graft versus Host Disease*), i els requeriments de compatibilitat entre donant i receptor més reduïts respecte el MO i la SPM (Broxmeyer, 2010, Gluckman, 2009). D'aquests avantatges, un dels més destacables és la immediatesa en la disponibilitat de la SCU en comparació amb les fonts de CMH adultes, fet que facilita de forma molt substancial la logística del trasplantament (Gluckman, 2009, Schoemans et al., 2006). Això es deu bàsicament a la facilitat de recollida i a la metodologia d'emmagatzematge, doncs hi ha més de 500.000 unitats de SCU criopreservades amb el tipatge HLA definit en més de 50 bancs de sang de cordó umbilical en tot el món (Broxmeyer, 2010), xifra que ha augmentat de forma exponencial en els darrers anys (Figura 1. 2). Aquesta facilitat en la cerca d'una unitat compatible es tradueix en un temps d'espera molt més reduït respecte la cerca de donants de CMH adultes, fet que repercuteix de forma positiva sobre la salut del pacient, doncs els llargs períodes d'espera sovint n'empitjoren el pronòstic (Barker et al., 2002, Brown and Boussiotis, 2008, Rocha and Locatelli, 2007).

Com s'ha comentat anteriorment, una altra propietat diferencial de la SCU que suposa un avantatge respecte les fonts de CMH adultes és la immaduresa immunològica dels seus limfòcits (estat *naïve*). Aquest fet afavoreix que el grau de compatibilitat HLA entre donant i receptor pugui ser menor, augmentant així de forma molt notable la probabilitat de cerca d'una unitat compatible. Així, el nivell d'aparellament de la SCU pot ser de com a mínim 4/6 amb els locus HLA entre donant i receptor (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1), mentre que en un trasplantament de moll d'os, el nivell d'aparellament mínim ha de ser de 7-8/8 (Delaney and Ballen, 2010, Schoemans et al., 2006).





**Figura 1. 2:** Nombre acumulat d'unitats de SCU en bancs públics de tot el món, segons *Bone Marrow Donors Worldwide* (<http://www.bmdw.org>)

Per altra banda, s'apunta que aquest menor potencial al·loreactiu dels limfòcits presents en la SCU també és el responsable de la menor incidència i gravetat de GvHD en els pacients trasplantats (Gyurkocza et al., 2010). El desenvolupament d'aquesta malaltia es deu a l'activació de les cèl·lules T de l'empelt degut a la seva interacció amb el complex major d'histocompatibilitat (MHC) del receptor. Com a conseqüència d'aquesta activació, es produeix una resposta agressiva de les cèl·lules T *helper* amb manifestacions clíniques caracteritzades per produir de forma selectiva danys a la pell, al fetge i al tracte gastrointestinal (Couriel et al., 2004). Tenint en compte aquest mecanisme d'acció, la reduïda incidència de GvHD observada després del trasplantament de SCU pot ser producte de múltiples factors: el reduït nombre de limfòcits per unitat de SCU, el fet que el reconeixement dels antígens del receptor per part dels limfòcits T de la SCU està alterat, i per la limitada resposta d'aquestes

cèl·lules T immadures del donant al ser activades pels al·loantigens del receptor (Brown and Boussiotis, 2008). De fet, estudis *in vitro* han demostrat que els limfòcits T de la SCU (majoritàriament CD45RA<sup>+</sup>), presenten un patró d'expressió de citoquines proinflamatòries reduït, amb una producció de baixos nivells de TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (Chalmers et al., 1998).

No obstant, tot i els nombrosos avantatges descrits, la SCU presenta un inconvenient que fa que aquesta no sigui la font de CMH de primera elecció: els pacients trasplantats pateixen un retard en la recuperació dels nivells normals de neutròfils i plaquetes en sang respecte els trasplantats amb MO o SPM, el que s'anomena aplàsia medul·lar (nombre absolut de neutròfils i de plaquetes en sang  $<0,5 \times 10^9$  i  $<20 \times 10^9$ , respectivament). Durant els períodes d'aplàsia medul·lar, el pacient no és capaç de combatre infeccions ni coagular amb normalitat, tractant-se, per tant, d'un lapse de temps que comporta un risc per a la seva salut (Delaney et al., 2010, Paquette et al., 2000). En un trasplantament de SCU, els temps mitjos de recuperació dels nivells normals de neutròfils en sang se situen al voltant dels 26 dies (Rocha et al., 2004). Aquest retard en l'empelt és conseqüència de la reduïda dosis de CMH trasplantada, tenint en compte que el nombre de cèl·lules nucleades totals en una unitat de SCU és d'1 a 2 logaritmes inferior respecte una donació de MO (Brown and Boussiotis, 2008, Gyurkocza et al., 2010, Rocha and Broxymeyer, 2009). Nombrosos treballs han establert una relació de proporcionalitat entre les dosis de CMH i de cèl·lules nucleades totals (CNT) i la reducció dels períodes d'aplàsia (Bittencourt et al., 2002, Heimfeld, 2003a, Heimfeld, 2003b, Mavroudis et al., 1996, Mehta et al., 2009, Nakamura et al., 2008, Rocha and Gluckman, 2009, Weaver et al., 1995). No obstant, diversos treballs apunten que a partir de cert llindar ( $5 \times 10^6$  -  $8 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg pacient),

un increment de la dosi no es tradueix en un escurçament del temps d'aplàsia medul·lar (Mehta et al., 2009, Nakamura et al., 2008).

A banda de la dosi cel·lular, també s'apunta que el grau de maduresa de les CMH/CPH podria tenir un paper rellevant en l'escurçament dels períodes d'aplàsia. El fet que les CMH i CPH de SCU, tot i presentar el mateix fenotip que les de MO i SPM, estan en un estat biològic més immadur (Mayani, 2010, Steen et al., 1994, Wang et al., 1997), implica que aquesta pot ser una variable destacada en el trasplantament de SCU. Així doncs, s'especula que part del retard en l'empelt en el trasplantament de SCU és degut a que les CMH han de realitzar un nombre superior de divisions fins a diferenciar-se a cèl·lules madures efectores degut al seu estat d'immaduresa (Broxmeyer et al., 1995, Gluckman, 2000, Shpall et al., 2002). De fet, aquesta hipòtesi seria consistent amb els resultats obtinguts en l'assaig clínic dut a terme per l'equip del Dr. Boiron, en que a partir de l'expansió de cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SPM s'aconseguia reduir el període d'aplàsia a zero dies, fet que podria atribuir-se al canvi en el grau maduratiu que pateixen les CMH durant el procés d'expansió (Boiron et al., 2006).

## **1.4 APROXIMACIONS PER A LA MILLORA DE L'EMPELT EN EL TRASPLANTAMENT DE SCU**

Tradicionalment l'increment en la dosi cel·lular ha estat la diana principal a afrontar per aconseguir una millora en l'empelt i poder així, aprofitar les nombroses avantatges de la SCU com a font de CMH. És per aquest motiu que existeixen diverses aproximacions que tenen com a objectiu incrementar el nombre de CMH/CPH de la SCU a trasplantar.

- **Doble trasplantament de SCU:**

Una de les aproximacions més emprades ha estat el trasplantament de dues unitats de SCU no emparentades (Barker et al., 2005, Brunstein et al., 2007). Amb la utilització d'aquesta estratègia s'han incrementat les dosis cel·lulars infoses, permetent ampliar la utilització de la SCU pel tractament de pacients adults (Broxmeyer, 2010). Els pacients trasplantats seguint aquesta estratègia, mostren un quimerisme mixte transitori que evoluciona amb el temps cap al domini d'una de les unitats. Tot i que en els estudis duts a terme fins al moment els resultats semblen indicar que es produeix un augment de GvHD, això no repercuteix negativament sobre la mortalitat relacionada amb el trasplantament (MRT). No obstant, no hi ha evidències clares que la velocitat de l'empelt sigui comparable a la obtinguda en el trasplantament de CMH/CPH adultes (Brunstein et al., 2010).

- **Injecció directa al MO:**

Una altra de les línies de treball que es considera que podria millorar la velocitat d'empelt és mitjançant la injecció directa de la SCU al moll d'os. Així, a diferència de l'anterior, aquesta aproximació no se centra en l'increment de la dosi cel·lular, sinó en la millora de la tècnica del trasplantament per tal de fer-lo més efectiu. Aquesta estratègia es fonamenta en estudis preclínics en els quals s'ha demostrat que els ratolins trasplantats seguint aquesta metodologia presenten uns nivells d'empelt 15 vegades superiors als trasplantats per via intravenosa (Castello et al., 2004). A nivell clínic, alguns assajos han demostrat resultats prometedors amb una reducció del període de neutropènia (Frassoni et al., 2008). No obstant, aquesta experiència no ha pogut ser reproduïda amb èxit per d'altres grups (Brunstein et al., 2009), deixant per tant la porta oberta a més estudis per tal de confirmar-ne l'efectivitat.

- **Teràpia combinada SCU-SPM:**

Una de les estratègies que ha donat més bons resultats clínics a nivell de reducció del període d'aplàsia ha estat la teràpia dual dissenyada pel grup del Dr. Fernández, que consisteix en la co-infusió d'una unitat de SCU no emparentada juntament amb cèl·lules CD34<sup>+</sup> purificades de SPM de donant haplo-idèntic (Fernández et al., 2003). La raó fonamental d'aquesta estratègia és aprofitar la ràpida recuperació dels neutròfils en sang observada al trasplantar SPM per tal de generar un empelt transitori fins que es produeixi l'empelt definitiu per part de la SCU. Així, en els pacients trasplantats seguint aquesta metodologia el temps d'aplàsia se situa en torn dels 12 dies, i en tots els casos els granulòcits i les cèl·lules mononucleades aparegudes en aquest primer període són derivades de la SPM del donant haplo-idèntic. És a llarg termini quan la SCU mostra un avantatge competitiu respecte la SPM, de manera que una vegada superat el quimerisme transitori, en la majoria de pacients l'empelt definitiu el realitza la SCU. A partir d'aquests resultats tant prometedors, aquesta teràpia dual ha estat assajada i exitosament reproduïda per d'altres grups (Liu et al., 2011).

A banda de les aproximacions descrites, també s'ha treballat en la millora de l'estratègia de recollida de la SCU en el moment del part (Bornstein et al., 2005, Broxmeyer et al., 2009), així com en dissenyar règims d'acondicionament pre-trasplantament més òptims (Nabhan et al., 2008).

- **Cultiu d'expansió:**

Com a alternativa a totes les aproximacions descrites fins al moment, s'ha posat especial atenció en l'increment de la dosi cel·lular a partir de l'expansió *ex vivo* de la SCU. A dia d'avui nombrosos grups de recerca han centrat els seus esforços en la

cerca de les condicions idònies per promoure l'expansió de les CMH/CMPH de SCU *in vitro*, amb l'objectiu d'obtenir dosis cel·lulars comparables a les del MO i la SPM. Com a conseqüència, s'han dissenyat un gran ventall d'estratègies d'expansió.

En les darreres dècades, les estratègies d'expansió desenvolupades s'han basat en la utilització de diferents combinacions de citoquines i factors de creixement estimuladors de l'hematopoesi amb l'objectiu de mimetitzar el microambient natural de les CMH i CPH (Kelly et al., 2009). Les combinacions dels diferents factors de creixement han variat en funció de cada estudi, però la majoria conté SCF, Flt-3L i TPO, a més de GM-CSF, IL6 i IL3. Les metodologies han estat molt diferents, i a dia d'avui no es pot determinar quina és la millor metodologia d'expansió: quina és la millor combinació de factors de creixement ni la concentració òptima de cadascun d'ells, entre d'altres variables (Norkin et al., 2012).

Una altra de les aproximacions assajades ha estat el cocultiu de les CMH/CPH amb cèl·lules mesenquimals amb l'objectiu, una vegada més, d'assimilar al màxim les condicions fisiològiques del seu nínxol habitual, el moll d'os (Robinson et al., 2006). Els autors que han aplicat aquestes estratègies d'expansió defensen que el contacte cèl·lula-cèl·lula és de vital importància pel creixement de les CMH, doncs en facilita tant l'autorenovació com la diferenciació. En base a aquesta estratègia de cultiu s'ha realitzat un estudi clínic fase 1, en que se n'ha demostrat tant la seguretat com l'eficàcia (De Lima et al., 2010). Els resultats d'aquest estudi posen de manifest que es produeix una reducció en el temps d'aplàsia (temps mig de recuperació dels neutròfils i plaquetes de 15 i 40 dies, respectivament), però tot i així no s'assoleixen les velocitats d'empelt obtingudes al trasplantar SPM.

Per altra banda, s'han assajat estratègies d'expansió utilitzant agents químics que afecten de forma indirecta les vies de regulació de l'hematopoesi, com ara quelants del coure, prostaglandines, nicotinamida o inhibidors de CD26/DPPIV (Norkin et al., 2012). Concretament, i en referència als quelants del coure (TEPA), el cultiu amb aquest agent promou un retard en la diferenciació, resultant en una expansió de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU (Peled et al., 2002). A partir d'aquesta aproximació, s'ha realitzat un assaig clínic amb 10 pacients als que se'ls hi co-infonia una única unitat de SCU que prèviament havia estat dividida en dos fraccions: 20% de la SCU destinada a l'expansió, i el 80% restant sense manipular. Com a resultat del trasplantament, 9 pacients van recuperar els nivells normals de neutròfils i plaquetes en sang als 30 i 48 dies, respectivament (De Lima et al., 2008).

Per últim, els estudis més recents s'han centrat en la utilització de factors que actuen sobre vies de senyalització cel·lular, més concretament en la via del Notch. Estudis basats en enginyeria genètica han demostrat que aquesta via de senyalització juga un paper molt important en la regulació de l'expansió i la diferenciació de les CMH/CPH (Varnum-Finney et al., 2000). L'any 2010, el grup de la Dra. Colleen Delaney va publicar els resultats d'un estudi clínic fase I amb 10 pacients, en el que s'avaluava la seguretat i l'eficàcia del trasplantament de SCU expandida en presència del lligand del Notch, el factor Delta1 (Delaney et al., 2010). Com a resultat, els pacients trasplantats amb la SCU expandida reduïen el període d'aplàsia fins als 16 dies, en comparació dels 26 dies d'aplàsia dels pacients trasplantats amb dues unitats de SCU.

Aquesta reducció en el període d'aplàsia, juntament amb la observada en l'assaig clínic del Dr. De Lima, han estat els resultats més significatius obtinguts fins el moment

en el camp de l'expansió *in vitro* de SCU. Probablement, aquests èxits es deuen al fet d'haver trasplantat dosis clínicament significatives, comparables a les de SPM i MO. No obstant, malgrat els importants avenços, encara s'està lluny dels períodes d'aplàsia assolits al trasplantar SPM. Això pot venir donat per diversos motius, des de la incapacitat per expandir la població cel·lular d'interès, fins a la pèrdua de funcionalitat derivada del cultiu. De fet, hi ha autors que apunten que les CMH/CPH expandides tenen alterada la seva capacitat d'empelt i repoblació degut a una alteració en el patró d'expressió de les proteïnes d'adhesió al nínxol hematopoètic adquirits durant el cultiu d'expansió (Güenechea et al., 1999, Szilvassy et al., 2001).

Paral·lelament, diversos grups han treballat en la cerca del millor suport i estratègies de cultiu que permetin l'expansió a gran escala, evitant els processos inhibitoris típics que es produeixen al llarg del cultiu i afavorint l'intercanvi de gasos i nutrients. La dificultat d'aquests cultius rau en l'heterogeneïtat de les poblacions cel·lulars, que canvien de forma dinàmica al llarg del cultiu, secretant factors que tenen un efecte inhibitori sobre les CMH/CPH (Kirouac and Zandstra, 2006). És per aquest motiu que un bioprocés per a l'expansió de CMH/CPH requereix d'estratègies que permetin mantenir un balanç òptim entre els factors estimuladors i inhibidors de les CMH/CPH (Cabrita et al., 2003). Fins al moment s'han assajat diversos models de bioreactors: cambres de perfusió (Palsson et al., 1993), que posteriorment van servir de base pel disseny del reactor Aastrom Biosciences, reactors de tanc agitat (Jelinek et al., 2002), de llit fix (Meissner et al., 1999) i rotatoris (Liu et al., 2006), entre d'altres.

En resum, tot i els nombrosos esforços que s'han fet fins al moment, a dia d'avui no es disposa d'una estratègia que permeti que amb el trasplantament de la SCU



s'assoleixin unes velocitats d'empelt comparables al trasplantament de SPM. Sembla que el principal problema recau en el desconeixement de la biologia de les CMH, i en la incapacitat de reproduir *in vitro* el que succeeix *in vivo*. És per això que a nivell biològic, encara es necessita conèixer amb més detall els mecanismes que governen els processos d'autorenovació i diferenciació de les CMH i CPH. A més, també és necessari conèixer quin és el tipus cel·lular d'interès per tal que faci la funció desitjada. Aquesta qüestió porta a la necessitat d'estudiar amb més profunditat les diferències que existeixen entre les CMH/CPH de la SCU respecte les de la SPM, a més del seu mecanisme d'acció en el repoblament d'un organisme aplasiat.

Arribats a aquest punt, i en base als resultats obtinguts fins al moment, sembla evident que l'abordatge en el disseny d'una nova teràpia cel·lular centrada únicament en l'increment de la dosi cel·lular és insuficient. És per això que en aquest treball experimental es planteja una aproximació basada en l'expansió de la població de CMH/CPH i en la modificació del seu estat de maduresa dirigint-lo cap a llinatge granulocític. D'aquesta manera, es formula com a hipòtesis de treball que un producte de teràpia cel·lular obtingut a partir de l'expansió de SCU en el qual s'obtinguin dosis cel·lulars comparables a les de les fonts cel·lulars adultes, i amb un estat maduratiu més avançat respecte al de les CMH/CPH de la SCU original, pot tenir un efecte positiu pel què fa a l'escurçament dels períodes d'aplàsia.

Per tant, en aquest treball experimental no només es pretén abordar la dosi cel·lular com a factor limitant del trasplantament de SCU, sinó que es pretén incidir sobre l'estat maduratiu de les CMH/CPH del producte generat.



2

Objectius



L'objectiu principal d'aquest treball es centra en el desenvolupament d'un producte de teràpia cel·lular avançada basat en l'expansió i diferenciació selectiva de progenitors hematopoètics de sang de cordó umbilical pel tractament de l'aplàsia mieloide.

Per tal d'aconseguir aquest objectiu principal, es plantegen els següents objectius secundaris:

- Definir una estratègia bàsica de cultiu que permeti l'expansió de progenitors hematopoètics de SCU dirigits a llinatge neutrofilic per tal d'assolir dosis cel·lulars clínicament significatives de forma robusta i reproduïble.
- Caracteritzar, tant *in vitro* com *in vivo*, el producte cel·lular generat en base a la comprensió dels mecanismes d'acció de cadascuna de les poblacions cel·lulars que l'integren.
- Avaluar el producte cel·lular obtingut en termes de seguretat: descartar l'adquisició de defectes cromosòmics com a conseqüència del procés d'expansió *in vitro*, i estudiar la seva biodistribució i seguretat en model animal.
- Escalar el procés productiu i definir la totalitat del bioprocés operant segons els estàndard de qualitat definits per les normes de correcta fabricació (GMP, de l'anglès *Good Manufacturing Practices*) per tal de fer possible la transició del producte desenvolupat a un eventual assaig clínic.



# 3

Desenvolupament d'una  
estratègia d'expansió





## 3.1 INTRODUCCIÓ

---

Tal com s'ha comentat anteriorment, una de les aproximacions més àmpliament assajades per tal d'incrementar la dosi de CMH per unitat de SCU i d'aquesta manera, superar la principal limitació que presenta com a font cel·lular, és l'expansió *in vitro* de les cèl·lules CD34<sup>+</sup>. Seguint en aquesta línia d'investigació, en treballs anteriors del grup de recerca, s'ha desenvolupat una estratègia d'expansió *in vitro* de CMH de SCU que permet assolir dosis cel·lulars comparables a les obtingudes amb MO o SPM (Pla, 2011). No obstant, aquesta estratègia de cultiu únicament està dirigida a l'expansió de la subpoblació de CMH més primitiva, la qual cosa pot actuar en detriment de l'escurçament dels períodes d'aplàsia, doncs es postula que aquesta variable pot tenir un paper rellevant en el temps d'aparició de neutròfils i plaquetes en sang (Broxmeyer et al., 1995, Gluckman, 2000, Shpall et al., 2002).

És per aquest motiu que en aquest treball es planteja, no tant sols l'expansió de les CMH/CPH de SCU, sinó que també se'n pretén modificar les seves característiques funcionals a partir de la modulació del seu estat de maduresa, per tal de generar un elevat nombre de progenitors hematopoètics dirigits a llinatge neutrofilic que, un cop trasplantats, siguin capaços de donar lloc a neutròfils madurs amb un lapse de temps molt reduït.

Les eines de les que es disposa per tal de modular l'estat de maduresa d'un cultiu *in vitro* dirigit a un llinatge en particular consisteix en l'ús de citoquines com a complement del medi de cultiu. En aquest cas en particular, la combinació de citoquines d'elecció és la formada per *stem cell factor* (SCF), interleuquina 3 (IL-3) i el factor estimulador de les colònies granulocítiques (G-CSF). L'elecció d'aquestes es

basa en l'efecte sinèrgic que tenen aquestes citoquines en l'estimulació de la proliferació i la maduració a llinatge neutrofílic de les CMH/CPH en cultiu *in vitro* (Thomson and Lotze, 2003).

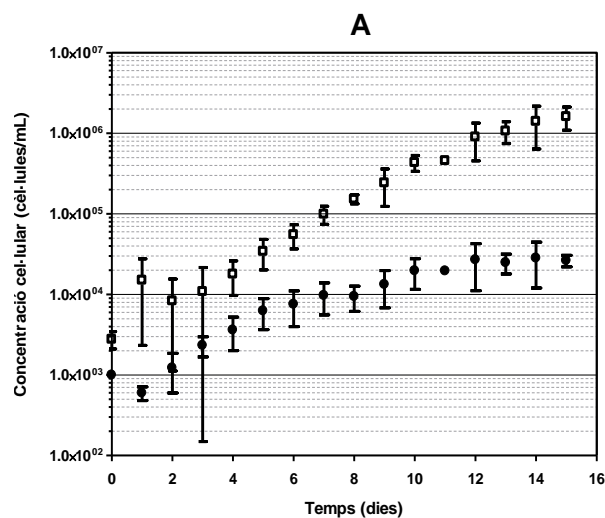
Així doncs, aquest primer capítol del treball experimental es planteja amb l'objectiu de definir les condicions de cultiu que afavoreixin l'expansió de progenitors hematopoètics de SCU fresca orientats a llinatge neutrofílic. És per aquest motiu que inicialment, i amb l'objectiu de determinar quins fenòmens governen el procés d'expansió/maduració de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> sota les condicions de cultiu estudiades, es duu a terme la caracterització de les cinètiques de creixement de cultius discontinus. De forma complementària, s'estudien les subpoblacions de llinatge neutrofílic aparegudes durant el transcurs del cultiu. Posteriorment, una vegada determinats quins són els possibles mecanismes inhibitoris del cultiu, es dissenya una estratègia d'expansió amb capacitat d'expandir i madurar parcialment la població CD34<sup>+</sup>, així com de generar un ventall de progenitors neutrofílics en diferents estats de maduració que acompanyen a la població CD34<sup>+</sup>.

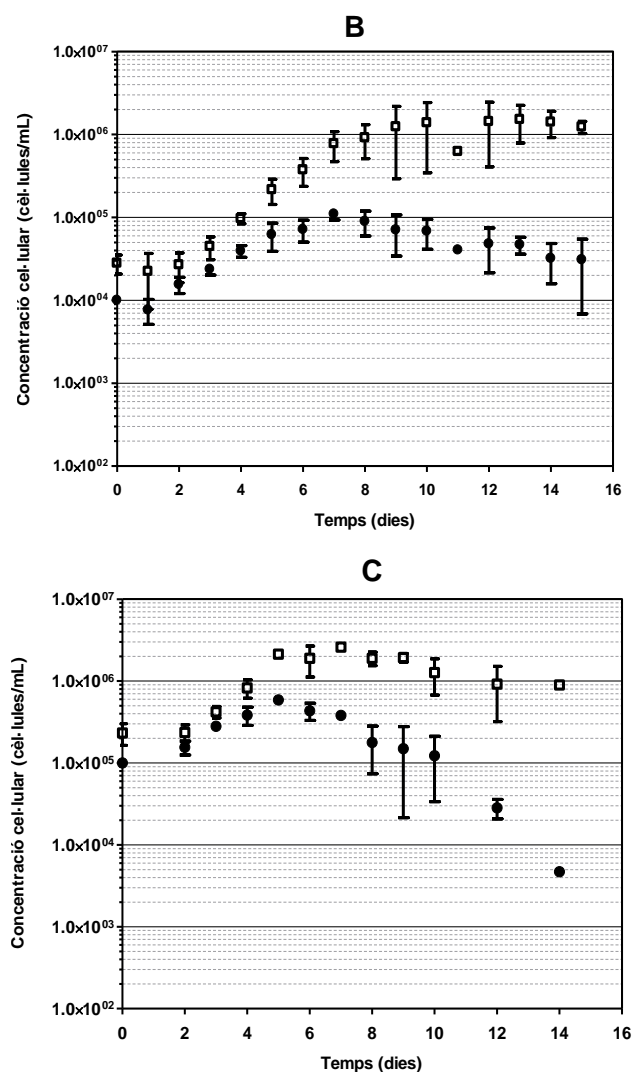
## 3.2 RESULTATS

### 3.2.1 Estudi de la cinètica de creixement de la població cel·lular CD34<sup>+</sup> i de les cèl·lules nucleades totals en cultiu en discontinu

L'estudi de la cinètica de creixement de les CMH en cultiu *in vitro* permet determinar quins són els factors que en condicionen la seva proliferació. Aquest coneixement és indispensable pel disseny i optimització d'una estratègia d'expansió *in vitro* de les CMH que permeti assolir factors d'expansió compatibles amb la generació dosis cel·lulars clínicament significatives.

Aquest estudi es realitza en base a un conjunt de cultius amb diferents inòculs ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL) en els quals no es realitza cap addició ni recanvi de medi fresc. Els cultius s'inicien a partir de cèl·lules CD34<sup>+</sup> purificades de SCU amb una puresa mitjana de  $37\% \pm 8\%$  i tenen una durada d'entre 14 i 15 dies. El medi de cultiu utilitzat és un medi químicament definit lliure de sèrum complementat amb els factors de creixement SCF, IL3 i G-CSF (8.2.1). Diàriament, s'extreu mostra de cadascun dels cultius i, mitjançant la plataforma citomètrica ISHAGE, es determina la concentració de cèl·lules CD34<sup>+</sup> i de cèl·lules nucleades totals (CNT).





**Figura 3.1:** Evolució de les concentracions cel·lulars de les cèl·lules CD34+ (●) i de les CNT (□) en els cultius iniciats a tres inòculs diferents: 1x10<sup>3</sup> CD34+/mL (A), 1x10<sup>4</sup> CD34+/mL (B) i 1x10<sup>5</sup> CD34+/mL (C). Els cultius es mantenen en medi lliure de sèrum complementat amb 50 ng/mL de SCF, IL3 i G-CSF. La durada dels cultius és de 15 dies i no es realitza cap addició ni recanvi de medi fresc. Els cultius es mantenen a 37°C i a 5% CO<sub>2</sub>. Els resultats es representen com a mitjanes amb les desviacions estàndards corresponents. A: n=7, B: n=6, C: n=3.

Els resultats obtinguts mostren que en els cultius iniciats a l'inòcul d'1x10<sup>3</sup> CD34+/mL (Figura 3.1.A), tant les cèl·lules CD34<sup>+</sup> com les CNT es mantenen en fase de creixement exponencial durant els 15 dies de durada del cultiu, assolint una concentració mitjana final de  $2,6 \times 10^4 \pm 4,3 \times 10^3$  CD34+/mL i  $1,6 \times 10^6 \pm 5,2 \times 10^5$  CNT/mL,

respectivament. En canvi, els cultius iniciats a un inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL (Figura 3.1, B) es mantenen en fase de creixement exponencial fins el setè dia de cultiu, moment en el qual la concentració de CD34<sup>+</sup> comença a decreixer progressivament, i la de CNT es manté constant a l'entorn d' $1 \times 10^6$  cèl·lules/mL fins a finalitzar el cultiu. De la mateixa manera, en els cultius iniciats a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL (Figura 3.1.C) s'observa una discreta etapa d'expansió de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> (5 dies), a la que la segueix una etapa en que tant la concentració de cèl·lules CD34<sup>+</sup> com la de CNT decreix. Ambdós cultius comparteixen el llindar de concentració de CNT a partir del qual es produeix l'aturada en l'expansió:  $1-2 \times 10^6$  CNT/mL.

Aquesta limitació en la capacitat d'expansió que mostren els cultius amb els inòculs més elevats es tradueix en una menor taxa d'expansió total, de manera que, en aquestes condicions, l'inòcul esdevé un factor inversament proporcional a la capacitat d'expansió del cultiu (Taula 3.1). Així, la capacitat d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> en el cultiu iniciat a  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL és de  $26,4 \pm 3,4$  vegades, mentre que en els cultius iniciats a  $1 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL és de  $11 \pm 1,7$  i  $5,9$  vegades, respectivament.

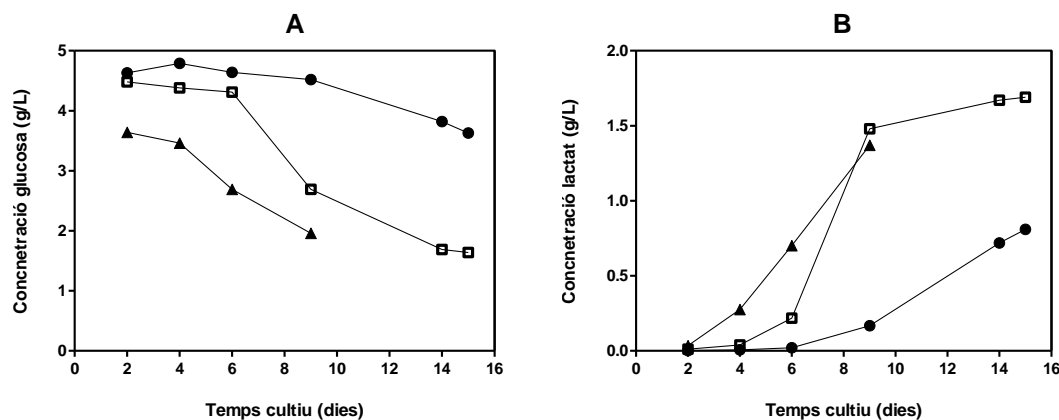
	Durada fase exponencial (dies)*	EpT CD34 <sup>+</sup>	EpT CNT
$1 \times 10^3$ CD34 <sup>+</sup> /mL (n=7)	14-15	$26,4 \pm 3,4$	$607,4 \pm 396,3$
$1 \times 10^4$ CD34 <sup>+</sup> /mL (n=6)	7	$11 \pm 1,7$	$34,1 \pm 24,3$
$1 \times 10^5$ CD34 <sup>+</sup> /mL (n=3)	5	5,9	12

\*Durada de la fase de creixement exponencial de cadascun dels inòculs. Els càlculs dels factors d'expansió es realitzen sobre aquesta etapa dels cultius.

**Taula 3.1:** Factors d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> i de les CNT durant l'etapa de creixement exponencial de cadascun dels inòculs. El factor d'expansió es calcula a partir del quocient de la concentració cel·lular final entre la concentració cel·lular inicial. Els resultats es representen com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard.

Paral·lelament al seguiment de l'evolució de les concentracions cel·lulars, es duu a terme la determinació de les concentracions de lactat i glucosa en el medi durant el transcurs del cultiu. L'objectiu d'aquest seguiment consisteix en determinar si es produeix un esgotament dels nutrients i/o una acumulació de subproductes del metabolisme cel·lular que puguin ser la causa de l'aturada en la capacitat proliferativa observada. L'acumulació de lactat en el medi condueix a una acidificació del cultiu, fet que està àmpliament descrit com una causa de la inhibició del creixement cel·lular (Cabrita et al., 2003, Nielsen, 1999, Patel et al., 2000).

Tal com s'observa a la Figura 3.2, el cultiu amb l'inòcul d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL és el que mostra uns nivells de lactat elevats de forma més precoç, seguit del cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL. Al seu torn, la concentració de glucosa en el medi també decreix a major velocitat en els inòculs més elevats. Contràriament, el cultiu iniciat a  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL no assoleix en cap moment els nivells de concentració de lactat i glucosa en el medi que assoleixen els cultius amb un inòcul superior. Aquest fenomen es correspon amb les densitats cel·lulars de cadascun dels cultius, de manera que a major densitat, major és el consum i producció de glucosa i lactat, respectivament.



**Figura 3.2:** Evolució de les concentracions de glucosa (A) i lactat (B) en el medi durant el transcurs dels cultius. ● correspon al cultiu iniciat a  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL, ◻ correspon al cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i ▲ correspon al cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL.

A continuació, i amb l'objectiu de determinar si l'aturada en la progressió del cultiu es deu a una inhibició de la capacitat de duplicació de les CMH o, senzillament, a la mort d'aquesta població a causa de la presència prolongada en el temps de subproductes del metabolisme, es duu a terme un estudi del cicle cel·lular i de la viabilitat de la població CD34<sup>+</sup>.

Tal com s'observa a la

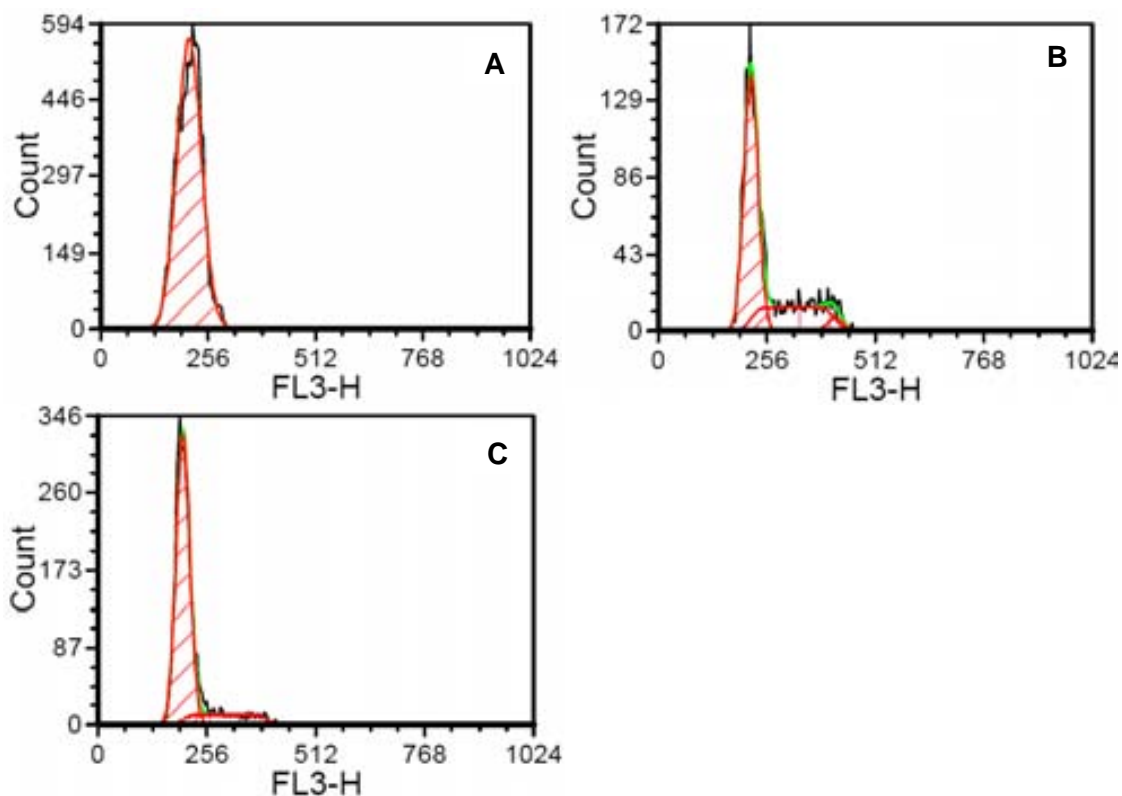
Taula 3.2 i a la Figura 3.3, a l'inici del cultiu (post-purificació de CD34<sup>+</sup> de SCU), i tal com està reportat en la bibliografia (Alvarado-Moreno et al., 2010, Traycoff et al., 1994), les cèl·lules CD34<sup>+</sup> es caracteritzen per trobar-se, en la seva majoria, en un estat de quiescència ( $97,4 \pm 3,2\%$  en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) (Figura 3.3, A). La determinació del cicle cel·lular que es realitza el segon dia de cultiu en els inòculs d' $1 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, posa de manifest que aproximadament un terç de la població CD34<sup>+</sup> ha entrat en fase G<sub>2</sub>/S, és a dir, ha començat a duplicar-se. Aquest fet es deu a l'efecte estimulador que tenen les citoquines presents en el medi de cultiu sobre les cèl·lules CD34<sup>+</sup> (Alvarado-Moreno et al., 2010, Traycoff et al., 1994).

Resulta interessant observar que el dia 7 de cultiu, al cultiu amb un inòcul d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, una fracció de les CMH que estaven ciclant han retornat en l'estat de quiescència, mentre que en l'inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL el percentatge de cèl·lules ciclant es manté igual que el segon dia de cultiu. Aquest fet coincideix amb la fase estacionària en la que es troba el cultiu d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL en aquell moment. En canvi, en el cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, l'entrada en la fase estacionària queda reflectida en l'anàlisi del cicle del dia 9, en que el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> en fase G<sub>2</sub>/S decreix fins al  $15\% \pm 1,6\%$ . En canvi, en aquest punt temporal, el cultiu iniciat a  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL es troba en plena fase exponencial tal com evidencia el fet que un terç de les CMH estiguin ciclant (30,5% en la fase G<sub>2</sub>/S). No és fins al final del cultiu que s'observa un retorn a l'estat de quiescència, situant-se el percentatge de cèl·lules en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en un  $83\% \pm 2,5\%$ . És precisament en aquest punt en que s'assoleix la concentració d' $1 \times 10^6$  CNT/mL.

Temps cultiu (dies)	$1 \times 10^3$ CD34 <sup>+</sup> /mL		$1 \times 10^4$ CD34 <sup>+</sup> /mL		$1 \times 10^5$ CD34 <sup>+</sup> /mL	
	%G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	%G <sub>2</sub> /S	%G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	%G <sub>2</sub> /S	%G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	%G <sub>2</sub> /S
0	97,4 ± 3,2	2,6 ± 3,2	97,4 ± 3,2	2,6 ± 3,2	97,4 ± 3,2	2,6 ± 3,2
2	-	-	68,7 ± 3,7	31,3 ± 3,7	71,8 ± 1,4	28,2 ± 1,4
7	-	-	66,9	33,1	76,9	23,1
9	69,5	30,5	85 ± 1,6	15 ± 1,6	85,4	14,6
13	-	-	82,3	17,7	-	-
15	83 ± 2,5	17 ± 2,5	-	-	-	-

**Taula 3.2:** Percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> en cadascuna de les fases del cicle cel·lular a diferents temps de cultiu i per a cadascun dels inòculs. La determinació del cicle cel·lular es realitza per citometria de flux mitjançant el reactiu DRAQ5. S'indica amb un guió els punts experimentals en que no s'ha realitzat l'estudi del cicle cel·lular per falta de mostra. N=2.





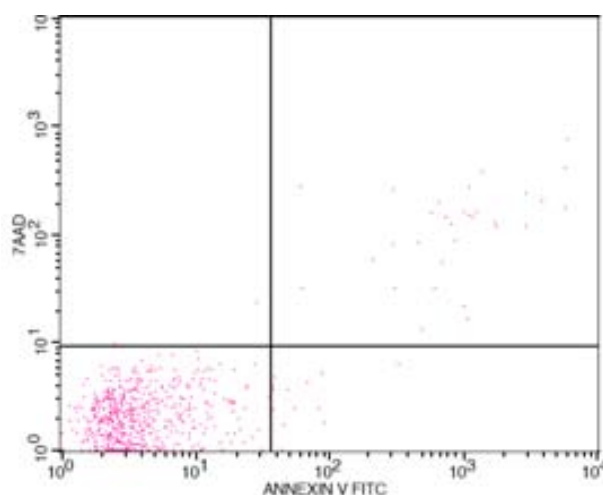
**Figura 3.3:** Representació gràfica de les anàlisis del cicle cel·lular de la població CD34<sup>+</sup>. **A:** cicle cel·lular corresponent a l'inici del cultiu, moment en el qual el percentatge de cèl·lules en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> és del 97,4±3,2%. **B:** cicle cel·lular corresponent al dia 7 de cultiu de l'inòcul d'1 x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL, moment en el qual els percentatges de cèl·lules en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>/S és del 66,9% i 33,1%, respectivament. **C:** cicle cel·lular corresponent al dia 9 de cultiu de l'inòcul d'1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL, moment en el qual el percentatge de cèl·lules en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> és del 85,4%. FL3-H: tercer canal de fluorescència en el que s'observa el contingut de DNA cel·lular mitjançant el seu marcatge amb DRAQ5.

Pel que fa a la viabilitat de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> al llarg del cultiu, determinada a partir del percentatge de cèl·lules negatives pels marcadors de necrosi (7-Amino-actinomicina D, 7AAD) i apoptosi (Anexina V), s'observen diferències entre els tres cultius efectuats a diferent inòcul. Tal com es mostra en la Taula 3.3, en el cultiu iniciat a 1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL, el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> viables es manté superior al 90% fins al dia 9-10 de cultiu. No és fins al final del cultiu (dia 14-15) en que s'observa una disminució en la viabilitat de la població CD34<sup>+</sup>, situant-se entorn del 70%. En canvi,

en el cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, aquesta disminució en la viabilitat es produeix abans, doncs a partir del dia 6 de cultiu, moment en que la viabilitat és superior al 90%, el percentatge de cèl·lules viables comença a decreixer fins al final del cultiu, en que únicament el 49,28% de les CD34<sup>+</sup> es mantenen negatives pels marcadors de necrosi i apoptosi. Pel què fa al cultiu iniciat a  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>, únicament es disposa de la dada de la viabilitat al final del cultiu, moment en que el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> viables és del 80,5%.

Temps de cultiu (dies)	Percentatge de cèl·lules CD34 <sup>+</sup> viables		
	$1 \times 10^3$ CD34 <sup>+</sup> /mL	$1 \times 10^4$ CD34 <sup>+</sup> /mL	$1 \times 10^5$ CD34 <sup>+</sup> /mL
2	-	95,7%	94,2%
6	-	93%	91,4%
7	-	95%	79,9%
14-15	80,5%	70%	49,28%

**Taula 3.3:** Percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> viables a diferents temps de cultiu i per a cadascun dels inòculs. La viabilitat cel·lular mitjançant citometria de flux es determina a partir del número de cèl·lules negatives pels marcadors d'apoptosi i necrosi, Annexina V i 7-Amino-actinomycina D (7AAD), respectivament. S'indica amb un guió els punts experimentals en que no es realitza la determinació de la viabilitat cel·lular per falta de mostra.



**Figura 3.4:** Citometria tipus de l'anàlisi de la viabilitat dut a terme. A l'eix d'abscisses es representen les cèl·lules positives per Annexina V, marcador indicador d'apoptosi cel·lular. A l'eix d'ordenades es representen les cèl·lules positives per 7AAD, marcador indicador de necrosi cel·lular.

Així doncs, les dades obtingudes mostren que la limitació en la capacitat d'expansió que pateix el cultiu es deu a un bloqueig en la capacitat de duplicació de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> i no a una disminució de la seva viabilitat, donat que la disminució de la viabilitat és posterior al retorn a la quiescència d'una fracció de les CD34<sup>+</sup>, i en conseqüència, a l'aturada en la progressió del cultiu (Figura 3.1,

Taula 3.2, Taula 3.3).

Aquest bloqueig que pateixen les cèl·lules CD34<sup>+</sup> sembla coincidir amb el punt en el qual s'assoleix el valor de concentració de  $1-2 \times 10^6$  CNT/mL i, esdevé més aviat com major és l'inòcul ja que amb un període més curt de temps, el cultiu assoleix la concentració inhibidora. En el cas del cultiu iniciat a  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL, aquesta concentració inhibidora s'assoleix al final del cultiu, impedit que es pugui observar el

bloqueig del cultiu. No obstant, aquest bloqueig és previsible a partir de les dades obtingudes de l'anàlisi del cicle cel·lular.

### 3.2.2 Estudi del grau maduratiu de les poblacions cel·lulars generades en cultiu en base a la seva caracterització fenotípica

Tal com s'ha descrit anteriorment, el còctel de citoquines emprat en el cultiu està orientat a la maduració parcial a llinatge neutrofilic. És per aquest motiu que s'especula que al llarg del cultiu és possible que es generin precursors neutrofílics en diferent grau de maduració. Amb l'objectiu d'avaluar-ne la seva presència i relacionar-la amb la capacitat d'expansió de cadascun dels cultius, es realitza una caracterització fenotípica mitjançant citometria de flux a diferents intervals de temps. Tal com es mostra a la Taula 3.4, el fenotip característic de cadascuna de les etapes de diferenciació del llinatge neutrofilic s'ha realitzat en base als marcadors CD11b, CD15 i CD16, que han estat definits com a característics d'aquestes cèl·lules (Elghetany, 2002, Elghetany et al., 2004, Fujimoto et al., 2000, Lund-Johansen and Terstappen, 1993, Unverzagt et al., 1997, Van Lochem et al., 2004):

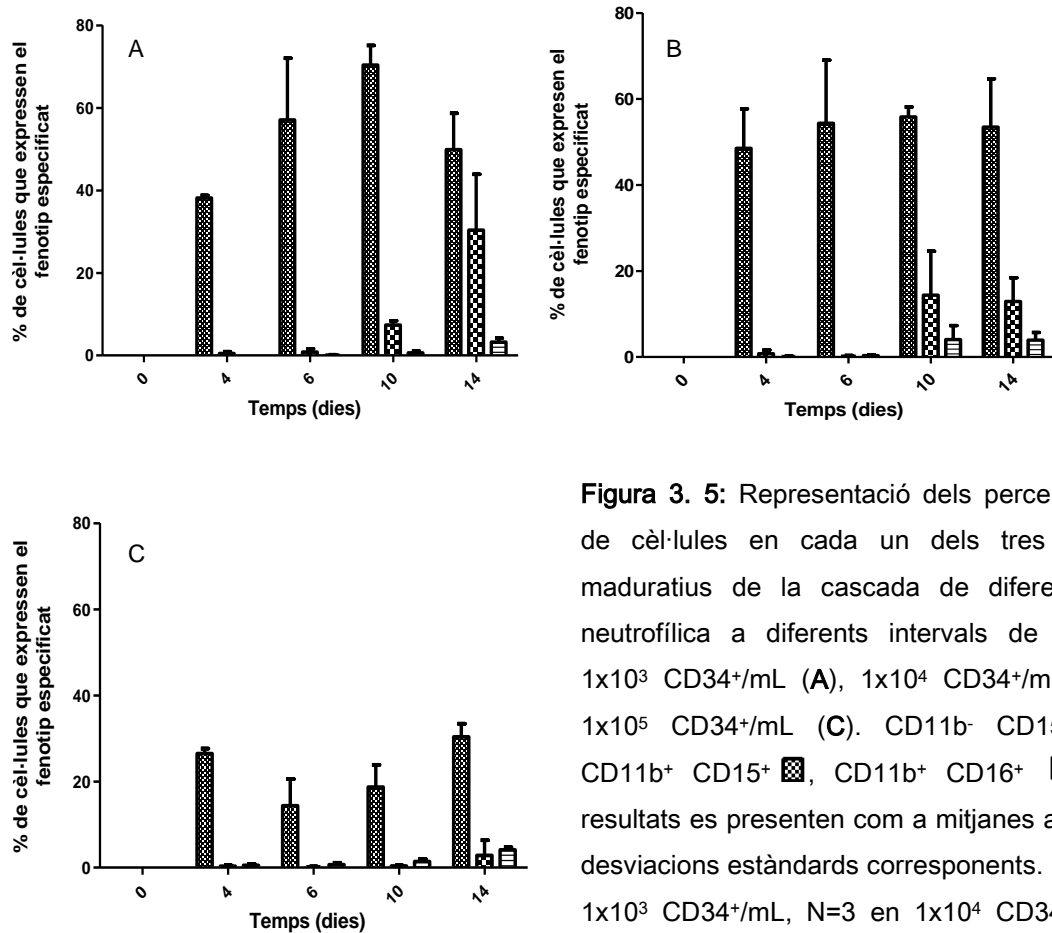
Promielòcit / Mielòcit	Metamielòcit / <i>Band cell</i>	Neutròfil segmentat
CD11b <sup>-/low</sup> CD15 <sup>+</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>

**Taula 3.4:** Relació de les proteïnes de membrana expressades en cadascuna de les etapes de la diferenciació neutrofilica.

Els resultats obtinguts (Figura 3. 5) mostren que pels cultius d' $1 \times 10^3$  i  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL el perfil inicial de maduració a llinatge neutrofilic és similar: als 4 dies de cultiu

s'observa la presència d'un  $38,2\pm 0,7\%$  (en  $1\times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL) i d'un  $48,5\pm 9,2\%$  (en  $1\times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL) de cèl·lules en el primer estadi maduratiu (CD11b<sup>-low</sup> CD15<sup>+</sup>). No és fins als 10 dies de cultiu quan es comença a apreciar un augment en el percentatge de metamielòcits:  $7,4\pm 1\%$  en  $1\times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL i  $14,4\pm 10,2\%$  en  $1\times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL. A partir d'aquest punt, els perfils maduratius d'ambdós cultius divergeixen: les cèl·lules del cultiu d' $1\times 10^3$  CD34<sup>+</sup>/mL continuen madurant fins a assolir uns valors de  $49,9\pm 8,8\%$ ,  $30,4\pm 13,5\%$  i  $3,2\pm 1\%$  de les poblacions CD11b<sup>-low</sup> CD15<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, respectivament. Contràriament en el cultiu d' $1\times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL no s'observen canvis notables en el perfil de maduració entre els dies 10 i 14. Aquesta aturada en la progressió madurativa coincideix amb el bloqueig en la capacitat de duplicació que pateix el cultiu.

A diferència dels inòculs inferiors, en el cultiu d' $1\times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL únicament s'observa una progressió en el grau maduratiu de les cèl·lules el dia 4 de cultiu, moment en el qual el percentatge de cèl·lules amb el fenotip característic de la primera etapa madurativa (CD11b<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup>) és del  $26,5\pm 1,2\%$ . A partir d'aquest punt, el percentatge de cèl·lules en aquest estat maduratiu es manté fins al final del cultiu, oscil·lant entre un  $14,4\%$  i un  $30,4\%$ . De la mateix forma que succeeix en el cultiu iniciat a  $1\times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, aquesta limitació en la capacitat de maduració del cultiu s'atribueix a l'absència d'activitat duplicativa que pateix el cultiu a partir del dia 4.



És important apuntar que l'augment al llarg del temps de les cèl·lules parcialment madures de llinatge neutrofílic es deu únicament a la capacitat madurativa de les CPH ja que, en les condicions de cultiu estudiades, i degut a les característiques pròpies d'aquestes cèl·lules, les cèl·lules madures romanents de la purificació acabaran morint transcorregudes les primeres hores de cultiu.

### **3.2.3 Disseny d'una estratègia d'expansió/diferenciació de les CPH a llinatge neutrofilic**

De l'anàlisi del conjunt de resultats obtinguts dels cultius en discontinu, se'n desprèn que existeix una concentració de CNT ( $1 \times 10^6$  CNT/mL) a partir de la qual es produeix un bloqueig en la capacitat de duplicació de les cèl·lules CD34<sup>+</sup>. Tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior, aquest bloqueig condiciona negativament l'expansió i la maduració del conjunt del cultiu cap a cèl·lules de llinatge neutrofilic.

En concordança amb nombrosos treballs centrats en determinar quins són els fenòmens inhibitoris que governen aquests cultius (Kirouac and Zandstra, 2006, Madlambayan et al., 2005), estudis previs realitzats pel grup de recerca (Pla, 2011) han permès determinar que el bloqueig de l'activitat duplicativa que pateixen les cèl·lules CD34<sup>+</sup> en les condicions de cultiu estudiades, és conseqüència de la presència de factors solubles inhibitoris secretats per les CNT (amb fenotip CD34<sup>-</sup>), sota certes condicions.

Amb l'objectiu d'estudiar si la dilució del cultiu amb medi fresc permet evitar l'acumulació d'agents inhibitoris de manera que s'eviti el bloqueig de la capacitat de duplicació de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> i, per tant, s'afavoreixi l'expansió i maduració global del cultiu, es duu a terme el disseny d'una estratègia de cultiu consistent en dilucions periòdiques al llarg del cultiu. Es tracta, per tant, d'un cultiu discontinu alimentat.

Els inòculs assajats en aquesta tanda experimental són els que han patit la inhibició en els cultius discontinus: els iniciats a  $1 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL. Els cultius s'inicien a partir de cèl·lules CD34<sup>+</sup> purificades de SCU a una puresa mitjana del  $41\% \pm 12,1\%$  i tenen una durada d'entre 14 i 15 dies. De la mateixa manera que en els experiments

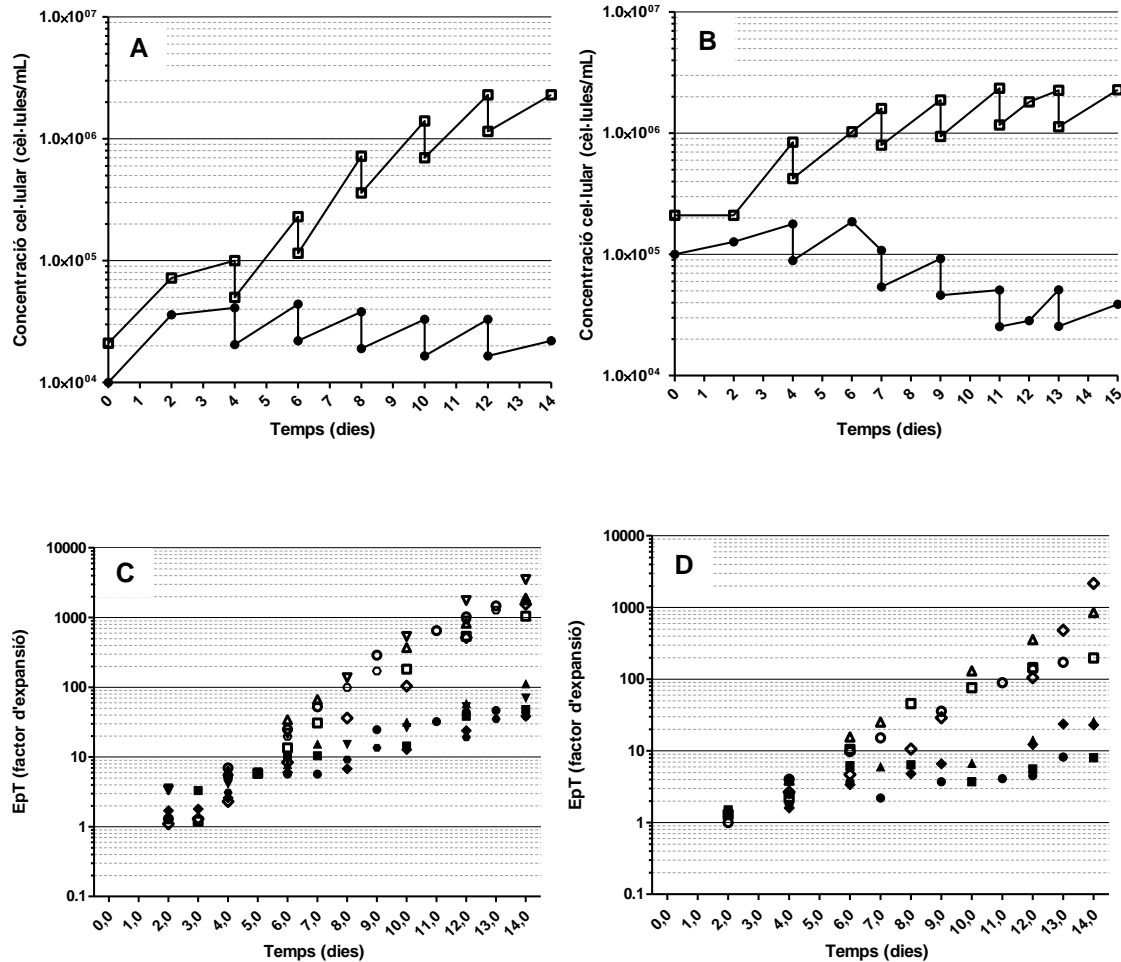
anterior, el medi de cultiu utilitzat és un medi químicament definit lliure de sèrum complementat amb els factors de creixement SCF, IL3 i G-CSF (8.2.1). L'estratègia de cultiu seguida consisteix en una primera dilució 1:1 (volum cultiu:volum medi fresc) el dia 4 de cultiu i, posteriorment, dilucions 1:1 consecutives cada 2-3 dies (mètode de cultiu que d'ara en endavant s'anomena com a discontinu alimentat). Prèviament a l'addició de medi fresc, s'extreu mostra de cadascun dels cultius i, mitjançant la plataforma citomètrica ISHAGE, es determina la concentració de cèl·lules CD34<sup>+</sup> i de CNT.

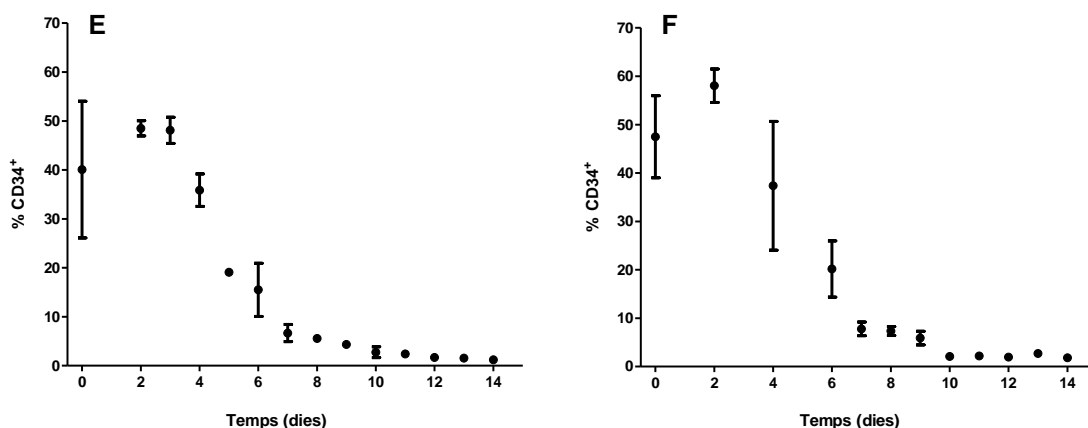
Tal com s'observa a la Figura 3. 6, els resultats obtinguts mostren que pel cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, l'estratègia d'addicions seguida permet una expansió cel·lular sostinguda en el temps, assolint uns factors d'expansió de  $61,4 \pm 31,1$  per a la població CD34<sup>+</sup> i de  $1943,4 \pm 928,6$  per a les CNT. Pel què fa al perfil del cultiu, l'estratègia seguida permet mantenir la població CD34<sup>+</sup> en una concentració constant entre  $2 \times 10^4$  i  $4 \times 10^4$  cèl·lules/mL a partir del dia 4 de cultiu. De forma contrària, la concentració de CNT augmenta de forma progressiva fins a establir-se el dia 12 de cultiu, amb valors de concentració cel·lular entre  $1 \times 10^6$  i  $2 \times 10^6$  cèl·lules/mL.

Per altra banda, i pel què fa al cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, els factors d'expansió assolits són menors:  $18,9 \pm 9,5$  i  $1073,8 \pm 1004,3$  per a les CD34<sup>+</sup> i les CNT, respectivament. A diferència del cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, en l'iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, la concentració de cèl·lules CD34<sup>+</sup> no es manté constant, sinó que decreix de forma progressiva a partir del dia 6 i fins a finalitzar el cultiu. Contràriament, en aquest cas, la concentració de les CNT es manté constant a partir del dia 7 i fins al final del cultiu a  $1-2 \times 10^6$  cèl·lules/mL.



En ambdós cultius, el perfil de puresa de la població CD34<sup>+</sup> respecte les CNT és molt semblant: el segon dia de cultiu, el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> experimenta un lleuger increment respecte el percentatge present en l'inòcul, ja que algunes de les cèl·lules madures residuals de la purificació de la SCU acaben morint transcorregudes les primeres hores de cultiu. Seguidament, la puresa de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> pateix una davallada progressiva fins a establitzar-se en valors entre el 4% i el 0,8% a partir dels 10 dies de cultiu.





**Figura 3. 6:** A, B: Perfil de les concentracions cel·lulars durant els 14 dies de cultiu per a l'inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, respectivament. □ Correspon a les CNT i ● correspon a les CD34<sup>+</sup>. Es grafica, de forma representativa, un únic lot d'expansió. C, D: Factors d'expansió assolits al llarg del cultiu pel cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, respectivament. Es grafiquen tots els lots d'expansió realitzats. E, F: Perfil de puresa de la població CD34<sup>+</sup> durant els 14 dies de cultiu. Els valors es grafiquen com a mitjanes  $\pm$  desviació estàndard. Els cultius es mantenen en medi lliure de sèrum complementat amb 50 ng/mL de SCF, IL3 i G-CSF. La durada dels cultius és de 14 dies. Al dia 4 de cultiu, es realitza una dilució  $\frac{1}{2}$  amb medi fresc i, posteriorment, es realitza la mateixa actuació cada 2 dies. Els cultius es mantenen a 37°C i a 5% CO<sub>2</sub>. N=6 per a l'inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i N=4 per a l'inòcul d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL.

### 3.2.4 Estudi del grau maduratiu en base a la caracterització funcional dels progenitors mieloides obtinguts a partir del cultiu discontinu alimentat

Per tal d'avaluar l'efectivitat de l'estratègia de cultiu seguida, es realitza un assaig clonogènic a diferents intervals de temps. Aquest assaig funcional resulta útil per estudiar les variacions en la capacitat clonogènica de les CPH al llarg del cultiu, així com per avaluar el grau d'expansió d'aquesta població cel·lular sota les condicions de cultiu d'estudi.

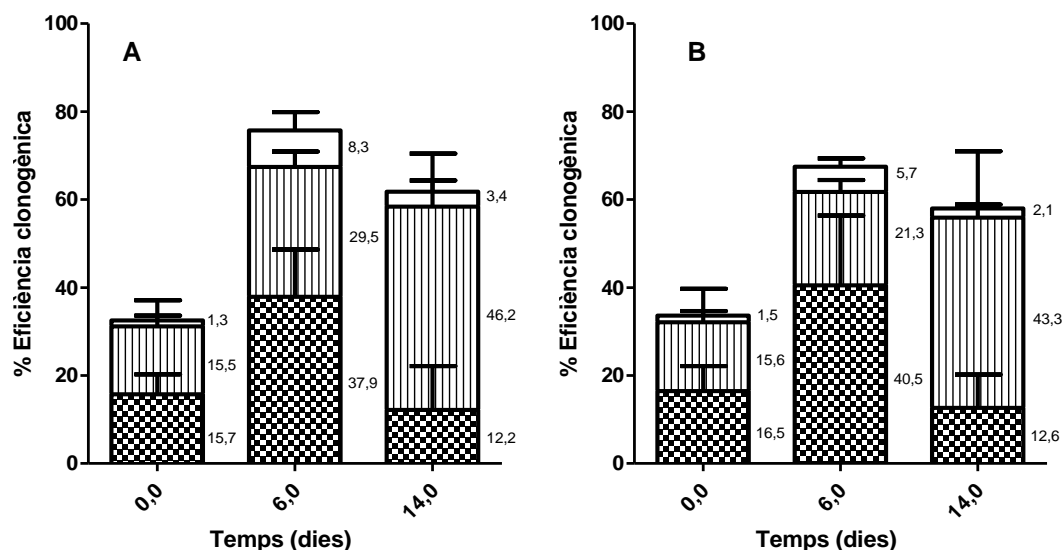
Tal com es descriu a l'apartat de Materials i Mètodes (8.4.1), la sembra dels cultius clonogènics es realitza a partir d'un nombre fixat de cèl·lules CD34<sup>+</sup> als diferents intervals de temps estudiats: a l'inici, a la meitat (6 dies) i al final del cultiu. La

determinació del nombre de colònies, així com la seva classificació, es realitza transcorreguts 14 dies posteriors a la sembra.

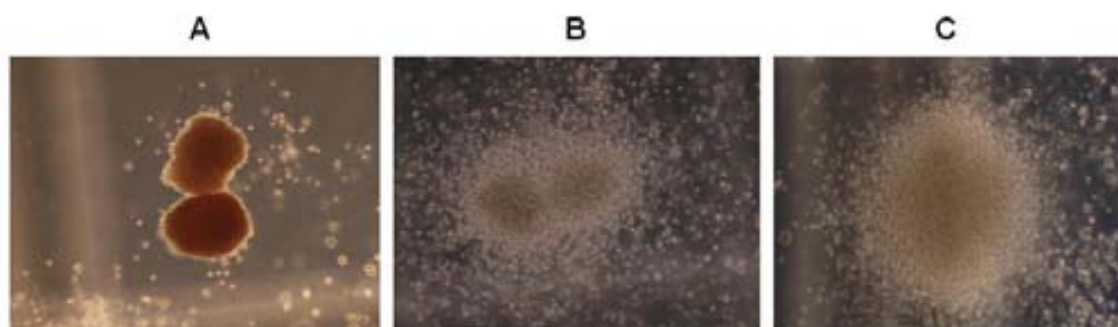
Els resultats obtinguts mostren que, tal i com s'observa en la Figura 3.7, el perfil de l'evolució de l'eficiència clonogènica al llarg del temps és igual pels cultius iniciats als dos inòculs d'estudi:  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL. Inicialment, l'eficiència clonogènica total d'ambdós cultius és del  $32,5\% \pm 9,9\%$ . Transcorreguts els primers 6 dies de cultiu, s'observa un increment molt notable en el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> amb potencial clonogènic, doncs s'assoleixen eficiències clonogèniques totals del  $73,1\% \pm 9,9\%$  i del  $63,3\% \pm 21,9\%$  pels cultius d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, respectivament. Al finalitzar el cultiu, aquesta tendència creixent es veu truncada ja que l'eficiència clonogènica global del final del cultiu és lleugerament inferior a l'observada als 6 dies de cultiu:  $61,8\% \pm 18,8\%$  pels cultius d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i  $58\% \pm 10,4\%$  pels cultius d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL.

En referència al potencial clonogènic específic de les CPH de llinatge granulocític (colònies del tipus CFU-GM), convé destacar que es produeix un augment molt significatiu des de l'inici del cultiu fins a dia 14. Aquest augment contrasta amb la davallada de les colònies de tipus BFU-E. Així doncs, als 14 dies de cultiu, les colònies de tipus CFU-GM representen un  $76,9\% \pm 14,8\%$  i un  $73,4\% \pm 16,8\%$  del total de les colònies recomptades dels cultius d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, respectivament. Contràriament, als 6 dies de cultiu, la proporció d'aquest tipus de colònies és inferior respecte les de tipus BFU-E. Això demostra que, en les condicions de treball, no és fins al final del cultiu que els progenitors dirigits a llinatge mieloide es

veuen afavorits respecte els dirigits a llinatge eritroide, produint-se, per tant, una especialització selectiva.

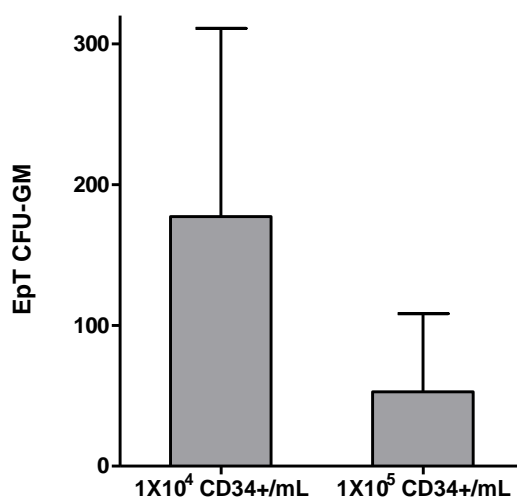


**Figura 3.7:** Representació de les eficiències clonogèniques a diferents intervals de temps dels dos cultius d'estudi:  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL (A) i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL (B). Les eficiències clonogèniques específiques es representen com a: BFU-E ; CFU-GM ; CFU-Mix . Per a cada representació, s'especifica el percentatge que en representa. Els resultats es presenten com a mitjanes amb les desviacions estàndards corresponents. N=5 en  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i N=4 en  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL.



**Figura 3.8:** Imatges preses d'algunes de les colònies observades (200X). A: colònia del tipus BFU-E. B-C: colònies del tipus CFU-GM. Per a cadascun dels cultius,  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, es duu a terme la determinació del potencial clonogènic de les cèl·lules a l'inici, meitat (6 dies) i final del cultiu (14 dies). Per a la sembra de l'assaig clonogènic s'utilitza un nombre fix de 100 cèl·lules CD34<sup>+</sup>. Aquests es mantenen durant 14 dies a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i posteriorment es realitza el recompte i classificació de les colònies aparegudes.

Com ja s'ha comentat anteriorment, tant les eficiències clonogèniques totals com les específiques de llinatge granulocític (CFU-GM) són molt semblants pels cultius d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL. No obstant, degut a la diferència en el potencial d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> d'ambdós cultius, el factor d'expansió total de les eficiències clonogèniques és notablement diferent. Així, i degut a l'elevada taxa d'expansió de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> aconseguida en el cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, és en aquestes condicions quan es produeix una expansió superior de les colònies de tipus CFU-GM:  $177,4 \pm 133,6$ . En canvi, el factor d'expansió assolit en el cultiu d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL és de  $52,74 \pm 55,51$  (Figura 3.9).



**Figura 3.9:** Representació de la taxa d'expansió total de les colònies de tipus CFU-GM als 14 dies de cultiu. El càlcul del factor d'expansió total consisteix en el producte del factor d'expansió específic de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> pel factor d'expansió específic de les colònies CFU-GM. Els resultats es representen com a mitjanes amb la desviació estàndard corresponent. N=4 en  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i N=3 en  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL.

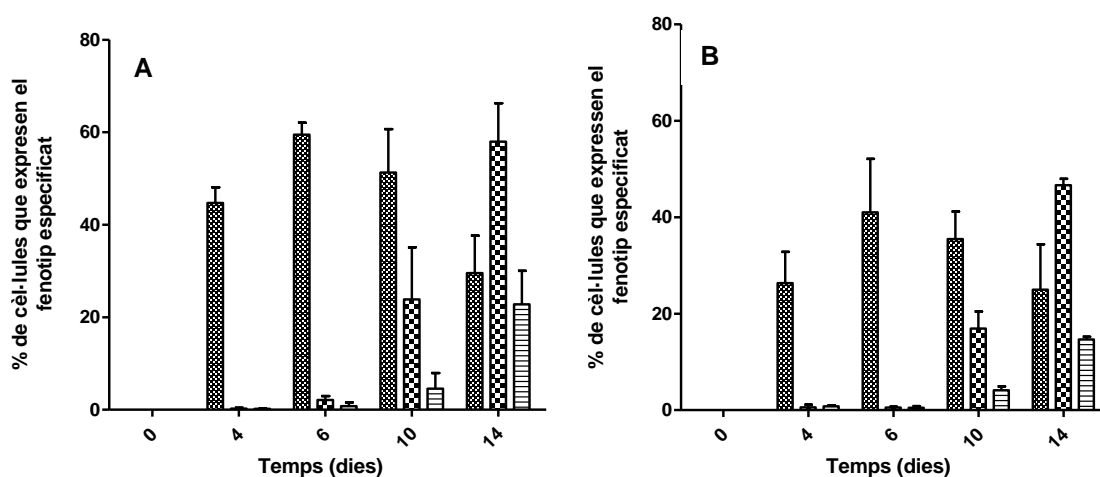
### 3.2.5 Estudi del grau maduratiu de les poblacions cel·lulars generades en cultiu discontinu alimentat en base a la seva caracterització fenotípica

De la mateixa manera que en els cultius en discontinu, es realitza una determinació fenotípica mitjançant citometria de flux a diferents intervals de temps al llarg del cultiu per tal de caracteritzar el procés de maduració de les CPH a cèl·lules de llinatge neutrofilic.

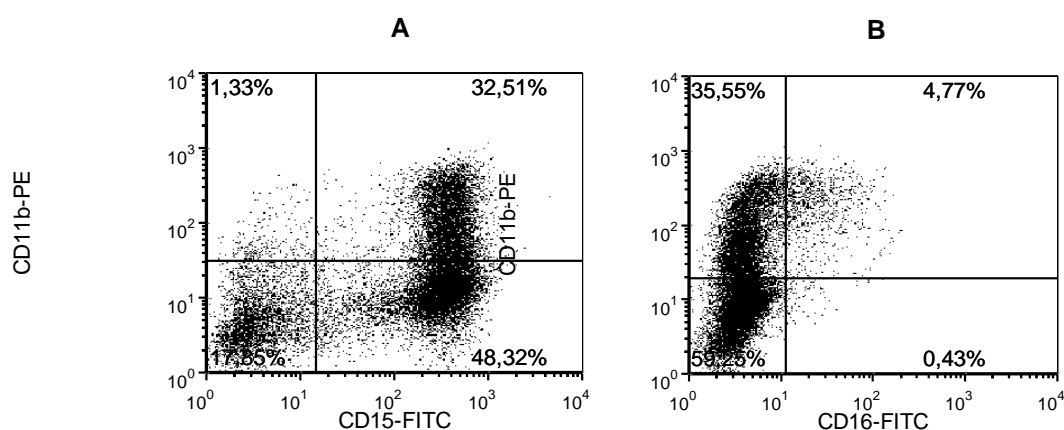
Tal com s'observa a la Figura 3.10, els resultats obtinguts mostren que, en tots els dies estudiats, el percentatge de cèl·lules amb el fenotip especificat és lleugerament superior en el cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL respecte en el d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL. Així, transcorreguts els primers 4 dies de cultiu, un  $44,7\% \pm 3,4\%$  de les cèl·lules del cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL presenten el fenotip característic del primer estadi maduratiu: CD11b<sup>-/low</sup> CD15<sup>+</sup>. En canvi, en el cultiu d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, aquest percentatge és del  $26,3\% \pm 6,5\%$ . En ambdós cultius, el percentatge de cèl·lules en aquest estadi maduratiu augmenta fins el sisè dia de cultiu, moment en el qual s'assoleixen valors de  $59,5\% \pm 2,6\%$  i de  $41\% \pm 11,1\%$  en els cultius d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, respectivament. Aquesta tendència s'inverteix a partir del dia 10 de cultiu, ja que part de les cèl·lules que presenten fenotip de promielòcits/mielòcits maduren per a donar lloc a cèl·lules amb fenotip propi de metamielòcits i neutròfils segmentats. Així, al desè dia del cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, el percentatge de cèl·lules amb el fenotip CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> és del  $23,9\% \pm 11,3\%$ , mentre que el de cèl·lules CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> és de  $4,6\% \pm 3,4\%$ . Al seu torn, pel cultiu d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, aquests percentatges són de  $16,9\% \pm 3,6\%$  i de  $4,1\% \pm 0,8\%$ , respectivament. Finalment, l'últim dia de cultiu és quan s'aprecia un percentatge major de cèl·lules amb els fenotips característics dels estadis maduratius més avançats: en el cultiu d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, un  $58\% \pm 8,3\%$  de

les cèl·lules són CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> i un 22,8% ± 7,2% són CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>. Per la seva banda, els percentatges d'aquestes poblacions cel·lulars en el cultiu d'1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL són de 46,7% ± 1,3% i de 14,7% ± 0,5%, respectivament.

Per tant, es pot afirmar que les condicions de cultiu que afavoreixen una major maduració dels progenitors neutrofílics cap a neutròfils madurs són les que es donen en el cultiu iniciat a 1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL. Aquest fet correlaciona amb la major capacitat d'expansió que mostra aquest cultiu respecte l'iniciat a 1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL.



**Figura 3.10:** Representació dels percentatges de cèl·lules en cadascun dels tres estats maduratius de la cascada de diferenciació neutrofílica a diferents intervals de temps. 1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL (A) i 1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL (B). CD11b<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> ■, CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> ▨, CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> ▩. Els resultats es presenten com a mitjanes amb les desviacions estàndards corresponents. N=4 en 1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL i N=2 en 1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL.



**Figura 3. 11:** Citometries tipus de l'anàlisi fenotípic dut a terme. **A:** determinació del percentatge de cèl·lules CD11b<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> (quadrant inferior-dret) i de cèl·lules CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> (quadrant superior-dret). **B:** determinació del percentatge de cèl·lules CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> (quadrant superior-dret). Les adquisicions citomètriques es realitzen amb l'equip FACSCalibur i l'anàlisi posterior es realitza amb el software FCS Express.

### 3.3 DISCUSSIÓ

El treball realitzat en aquest capítol s'ha centrat en el desenvolupament d'una estratègia de cultiu destinada a l'expansió i maduració selectiva a llinatge neutrofílic de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU. Pel desenvolupament d'un cultiu d'aquestes característiques, en primer lloc és imprescindible la identificació de les condicions de cultiu que permeten una major expansió de la població cel·lular d'interès (Kirouac and Zandstra, 2006, Zandstra and Nagy, 2001), i això passa per conèixer quins són els fenòmens inhibitoris que governen el cultiu.

És per aquest motiu que en primer lloc s'han realitzat una sèrie de cultius en discontinu iniciats a diferents densitats cel·lulars i se n'ha estudiat la cinètica de creixement tant



de la població CD34<sup>+</sup>, com la de les CNT. S'ha observat que quan la concentració de CNT assoleix un valor entre  $1-2 \times 10^6$  CNT/mL, es produeix un bloqueig en la capacitat replicativa de la població CD34<sup>+</sup> i, per extensió, una limitació en la capacitat d'expansió del cultiu. A partir de l'anàlisi del cicle cel·lular en combinació amb la determinació de la viabilitat cel·lular, s'ha pogut concloure que aquesta inhibició del cultiu és producte de l'entrada a la quiescència d'un percentatge de les cèl·lules CD34<sup>+</sup>, i no a una possible mort cel·lular. Així doncs, el comportament descrit sembla indicar l'existència d'algun fenomen inhibitori associat a la densitat cel·lular, tenint en compte que aquesta limitació en la capacitat proliferativa del cultiu s'ha produït de forma més primerenca com més elevat ha estat l'inòcul de partida, ja que el cultiu ha tardat menys temps en assolir la concentració d' $1-2 \times 10^6$  CNT/mL. Aquesta observació es correspon amb treballs en els quals s'ha demostrat que les cèl·lules madures generades en un cultiu d'aquesta tipologia són les responsables de l'alliberació en el medi de factors solubles que actuen inhibint la capacitat proliferativa de les CMH/CPH (Madlambayan et al., 2005, Majka et al., 2001). Per tant, l'estratègia de cultiu dissenyada ha de considerar el fet que es tracta d'un tipus de cultiu amb una composició de les poblacions cel·lulars altament canviant, i en conseqüència, de la composició del medi de cultiu (Kirouac and Zandstra, 2006).

Tenint en compte aquest fenomen, s'ha dissenyat una estratègia de cultiu basada en la dilució periòdica del medi de cultiu mitjançant l'addició de medi fresc per tal de, no tant sols oferir nou medi a les cèl·lules, sinó diluir els possibles agents inhibitoris per sota del seu llindar d'acció. Així doncs, seguint aquesta estratègia d'addicions, s'ha obtingut un factor d'expansió de  $61,4 \pm 31,1$  per a la població CD34<sup>+</sup> en els cultius iniciats a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, de manera que, efectivament, s'ha evitat la inhibició en la

capacitat proliferativa del cultiu. Pel què fa al cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL, el factor d'expansió assolit per la població CD34<sup>+</sup> ha estat notablement inferior:  $18,9 \pm 9,5$  vegades. Aquesta dada posa de manifest que l'estratègia d'addicions aplicada no ha estat suficient per a evitar la inhibició del cultiu amb una densitat cel·lular més elevada, evidenciant una vegada més que els possibles factors inhibitoris estan associats a la densitat cel·lular.

Aquesta estratègia de cultiu no ha estat únicament dissenyada per tal d'ampliar el nombre de cèl·lules CD34<sup>+</sup>, sinó que també es pretén induir una maduració d'aquestes cèl·lules cap a llinatge neutrofílic. Aquest objectiu es fonamenta amb el fet que es creu que a banda de la dosi cel·lular, el grau d'immaduresa de les CMH de SCU respecte al de les de SPM i MO, pot ser en part responsable dels llargs períodes d'aplàsia, doncs les CMH necessitaran més temps per a arribar a generar les cèl·lules madures efectores (Broxmeyer et al., 1995, Gluckman, 2000, Shpall et al., 2002). En línia amb aquesta hipòtesis, alguns autors han proposat la utilització d'un suplement de citoquines que permeti la maduració parcial de les CMH/CPH a llinatge neutrofílic (De Bruyn et al., 2003, Shpall et al., 2002). En aquest treball s'ha utilitzat un còctel d'aquestes característiques i, efectivament, s'han generat precursors neutròfils en diferent estat de maduració, que eventualment, en el context d'un trasplantament hematopoètic, es creu que podrien generar la primera "onada" de neutròfils en sang perifèrica amb un lapse de temps molt reduït (De Bruyn et al., 2003). Així doncs, durant el transcurs del cultiu s'ha observat l'aparició progressiva de precursors neutròfils en diferents estats de maduració, assolint uns valors finals de  $29,5\% \pm 8,1\%$  promielòcits/mielòcits,  $58\% \pm 8,3\%$  metamielòcits i  $22,8\% \pm 7,2\%$  neutròfils segmentats.

Per altra banda, l'efecte d'aquesta combinació de citoquines de perfil neutrofilic ha quedat palès en l'especialització selectiva de les CPH cap a llinatge granulocític, tal com evidencia el fet que la majoria de colònies aparegudes en els cultius clonogènics del producte final de l'expansió són del tipus CFU-GM. Aquest fet, juntament amb l'increment en l'eficiència clonogènica del producte final expandit respecte a la SCU inicial, ha portat a la expansió de les CPH formadores de llinatge granulocític de  $183 \pm 125,7$  vegades. Aquesta dada és especialment rellevant, tenint en compte que alguns autors determinen que la dosi de CFU-GM és directament proporcional a l'èxit del trasplantament (Boiron et al., 2006).

En resum, s'ha aconseguit aproximar una estratègia d'expansió iniciant el cultiu a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i realitzant dilucions periòdiques. El producte resultant obtingut es caracteritza per tenir entre un 4% i un 0,8% de cèl·lules CD34<sup>+</sup> amb activitat clonogènica específica de llinatge granulocític. La fracció cel·lular restant correspon a progenitors neutròfils en diferent estat de diferenciació. Els resultats obtinguts conviden a seguir treballant en el marc del desenvolupament d'un producte de teràpia cel·lular avançada orientat a reduir els períodes d'aplàsia mieloide. És per aquest motiu que el següent pas d'aquest treball experimental consisteix en caracteritzar cadascuna de les poblacions cel·lulars aparegudes per tal d'aproximar-ne el seu mecanisme d'acció en el context d'un trasplantament.



# 4

Estudi dels mecanismes d'acció  
de la població CD34<sup>-</sup> a partir  
d'assajos *in vitro*

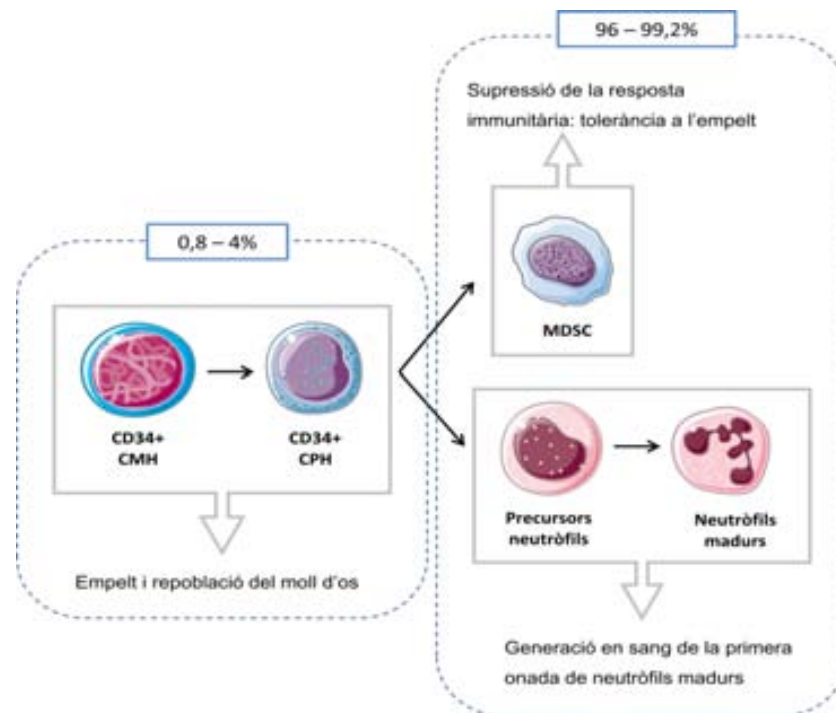


## 4.1 INTRODUCCIÓ

---

En el capítol anterior s'ha definit una estratègia de cultiu que permet l'expansió/diferenciació de les CMH/CPH a llinatge neutrofílic, la qual cosa ha permès establir les bases pel desenvolupament d'un futur producte de teràpia cel·lular dirigit a reduir els períodes d'aplàsia. Arribats a aquest punt, el següent pas en el context del desenvolupament consisteix en la caracterització funcional dels elements cel·lulars que el conformen. Més concretament, i en base als aspectes regulatoris que regeixen la indústria farmacèutica, la definició dels mecanismes d'acció de les diferents poblacions cel·lulars esdevé fonamental, amb l'objectiu final de poder aproximar el seu comportament en una eventual aplicació clínica.

Els resultats obtinguts en el Capítol 3 mostren que a la finalització del cultiu, i en consonància amb el fet que les citoquines utilitzades presenten un perfil d'acció tardana, únicament entre el 4% i el 0,8% són cèl·lules CD34<sup>+</sup>, essent la població cel·lular majoritària CD34<sup>-</sup>. Tal com han evidenciat els estudis citomètrics duts a terme, aquesta fracció cel·lular més madura està composta bàsicament per precursors neutròfils en diferent estat de diferenciació. Per altra banda, tenint en compte la naturalesa mieloide del producte cel·lular generat, es considera que aquesta fracció també pot estar integrada per cèl·lules mieloides supressores, tal com s'esquemmatitza a la Figura 4.1. És precisament en la caracterització de les dues subpoblacions de perfil més madur sobre les quals es centra l'objectiu del present capítol: les seves característiques biològiques bàsiques i la potencial aplicació en el context d'un trasplantament hematopoètic. Aquests estudis es duen a terme a partir d'assajos funcionals *in vitro*.

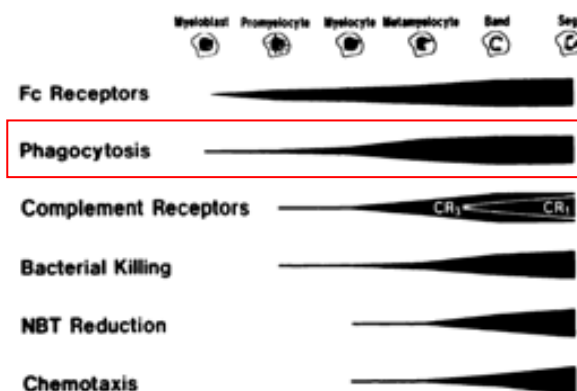


**Figura 4.1.** Hipòtesi generada sobre la composició cel·lular del producte final. Els resultats citomètrics obtinguts en el Capítol 3 han evidenciat que la població CD34<sup>+</sup> a la finalització del cultiu suposa únicament un 0,8 - 4% del total de les cèl·lules obtingudes. Al seu torn i mitjançant la caracterització immunofenotípica, s'ha determinat que la fracció cel·lular restant i majoritària (96 - 99,2%) està composta per precursors neutròfils en diferent estat de maduració. Addicionalment es considera que aquesta fracció cel·lular també pot estar integrada per cèl·lules mieloides supressores.

En referència als precursors neutròfils generats, de la mateixa manera que han defensat d'altres autors (De Bruyn et al., 2005, Haylock et al., 1992, McNiece et al., 2000, Paquette et al., 2000, Scheduling et al., 2000, Zimmerman et al., 2000, Miles Prince et al., 2004), s'especula que el seu possible mecanisme d'acció podria consistir en que, una vegada trasplantats, acabin de madurar i donin lloc a neutròfils madurs en sang en un període de temps reduït. D'aquesta manera, aquestes cèl·lules actuarien escurçant el període d'aplàsia en els primers estadis posteriors al trasplantament. Per



tant, si aquesta hipòtesi de treball és correcta, per tal de corregir la neutropènia, aquests precursors haurien de ser capaços de diferenciar *in vivo* de forma terminal i d'adquirir les seves propietats funcionals característiques (De Bruyn et al., 2005). Una d'elles és la capacitat fagocítica, una característica funcional típica dels estadis finals de la diferenciació granulocítica (Glasser and Fiederlein, 1987). Tal com s'observa a la Figura 4.2, aquesta augmenta a mesura que les cèl·lules maduren, essent els neutròfils segmentats els que assoleixen la màxima activitat fagocítica. La importància en l'adquisició d'aquesta capacitat funcional, juntament amb la resta de canvis associats al procés de maduració, radica en la seva funció principal a l'organisme com a part del sistema immunitari innat: eliminació d'agents infecciosos de forma inespecífica (Janeway Jr et al., 2003). Així doncs, un test que permeti estudiar l'activitat fagocítica *in vitro* pot ser utilitzat com a indicador funcional d'aquest tipus cel·lular. En base a això, en el present capítol s'empra un assaig consistent en determinar l'activitat fagocítica a partir de la utilització d'unes microesferes fluorescents i mitjançant la utilització del citòmetre de flux.



**Figura 4.2:** Esquema on es representa l'adquisició de les diferents propietats característiques dels neutròfils durant el seu procés de diferenciació. El requadre vermell assenyalava l'activitat fagocítica, característica funcional que s'estudia en el present capítol (Glasser and Fiederlein, 1987).

Per altra banda, i tal com s'ha comentat anteriorment, una segona característica rellevant de la suspensió cel·lular generada podria ser la presència de cèl·lules mieloides supressores (MDSC, de l'anglès *myeloid-derived suppressor cells*). La propietat funcional característica d'aquest tipus cel·lular és la seva capacitat d'inhibir la proliferació dels limfòcits T, actuant com a reguladors negatius de la resposta immunitària en situacions de càncer, infeccions, septicèmies... (Fujimura et al., 2010, Gabilovich and Nagaraj, 2009). Les dades de les que es disposa actualment semblen indicar que les MDSC no són una població definida, sinó que són un grup cel·lular d'origen mioide fenotípicament heterogeni amb una activitat biològica comú (Gabilovich and Nagaraj, 2009). Aquestes cèl·lules van ser descrites per primera vegada fa aproximadament 25 anys en pacients amb càncer (Buessow et al., 1984, Seung et al., 1995, Young et al., 1987), però no ha estat fins als últims anys que s'ha posat de manifest la seva importància com a reguladors del sistema immunitari. L'any 2008, el grup de Bernard Vanhove va generar la primera evidència del possible paper de les MDSC en la tolerància en el context d'un trasplantament (Dugast et al., 2008). Precisament, en un trasplantament hematopoètic, el rebuig és una causa important de fracàs de l'empelt, i aquest fenomen es produeix degut a una resposta immunitària del receptor contra el donant. Aquesta resposta està mediada per la presència de limfòcits del receptor, preferentment limfòcits T (Mattsson et al., 2008). És per aquest motiu que s'especula que la possible presència de MDSC en el producte cel·lular resultant de l'expansió podria generar una tolerància a l'empelt a partir de la immunomodulació dels limfòcits T del receptor en un eventual trasplantament, la qual cosa suposaria un valor afegit.

És raonable suposar que en el producte final de l'expansió hi hagi MDSC ja que està descrit que la producció d'aquest tipus cel·lular està associat a algunes de les citoquines utilitzades en aquest treball (Gabilovich and Nagaraj, 2009), i és que precisament, les MDSC es caracteritzen per ser cèl·lules de llinatge mieloide que no han madurat completament. Amb l'objectiu d'estudiar la possible presència i funcionalitat d'aquest tipus cel·lular, en el present capítol s'empra un test *in vitro* consistent en mesurar la seva activitat immunomoduladora sobre limfòcits T activats.

En resum, l'objectiu principal d'aquest capítol consisteix en aproximar el possible mecanisme d'acció de les cèl·lules que conformen la fracció CD34<sup>-</sup> resultant del cultiu d'expansió, i això es duu a terme en base a la seva caracterització funcional mitjançant la utilització de tests *in vitro*. La informació obtinguda és especialment rellevant per poder seguir avançant en el desenvolupament del producte de teràpia cel·lular avançada orientat a la reducció dels períodes d'aplàsia.

## 4.2 RESULTATS

En base a la metodologia d'expansió desenvolupada en el capítol anterior consistent en addicions periòdiques de medi fresc, s'inicien una sèrie de cultius a partir de cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU fresca a una puresa inicial de  $48,4 \pm 13,8\%$  i a un inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL. El medi de cultiu emprat és un químicament definit lliure de sèrum complementat amb les citoquines SCF, IL-3 i G-CSF (8.2.1). Els cultius es mantenen a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant 14 dies, i la fracció cel·lular CD34<sup>-</sup> resultant d'aquests processos d'expansió és sotmesa a l'estudi del seu mecanisme d'acció. Per a tal efecte, en

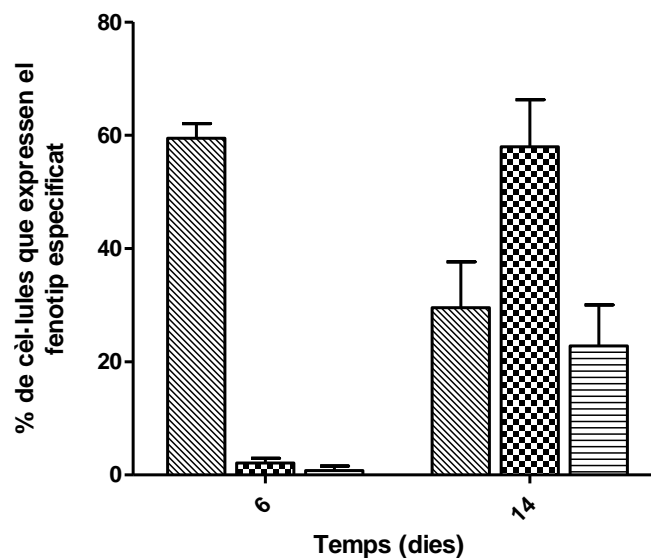
primer lloc, es duu a terme una caracterització fenotípica mitjançant citometria de flux i, posteriorment, es realitzen els assajos funcionals *in vitro*, tant per la població de progenitors neutrofílics com per la de MDSC.

#### **4.2.1. Caracterització funcional *in vitro* dels precursors neutrofílics**

Els estudis citomètrics duts a terme en el capítol anterior han posat de manifest que, seguint la metodologia d'expansió desenvolupada, al llarg del cultiu es produeix una maduració progressiva dels precursors neutrofílics generats. Aquest fet té com a conseqüència que a diferents punts de cultiu, el perfil de les poblacions en diferent grau de maduració és molt divers. Per aquesta raó es planteja la realització dels estudis funcionals no tant sols sobre les cèl·lules obtingudes a la finalització del cultiu, sinó també sobre la població cel·lular obtinguda a un punt intermedi. L'objectiu d'aquesta doble caracterització se centra en determinar quin impacte té el grau maduratiu dels precursors neutrofílics sobre el seu mecanisme d'acció en el context d'un trasplantament hematopoètic. Els punts d'estudi escollits són les cèl·lules obtingudes a dia 6 (anomenades com a *Producte A*) i a la finalització del cultiu, a dia 14 (anomenades com a *Producte B*).

En primer lloc es duu a terme la caracterització citomètrica per tal de determinar quin és el perfil fenotípic en cadascun dels punts de mostreig. Aquest estudi fenotípic es realitza en base a la detecció de les proteïnes de membrana característiques del procés de diferenciació neutrofílic: CD11b, CD15 i CD16, tal com es descriu a la Taula 3.4.

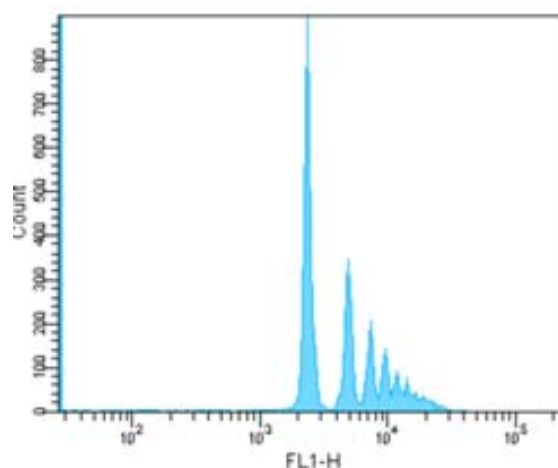
Els resultats obtinguts mostren que efectivament, entre els dos punts de mostreig (Producte A i Producte B) existeixen diferències notables en la distribució de les poblacions en diferent grau de maduració, essent el Producte B el que presenta un perfil més madur. Així, tal com s'observa a la Figura 4.3, mentre a dia 6 de cultiu la fracció majoritària de precursors neutrofilics està integrada per la població més immadura, la de promielòcits/mielòcits ( $59,5 \pm 2,6\%$ ), a la finalització del cultiu la població majoritària correspon a la de metamielòcits ( $58 \pm 8,3\%$ ). A més, destaca el fet que transcorreguts 14 dies de cultiu (Producte B), un  $22,8 \pm 7,2\%$  de les cèl·lules obtingudes presenten el fenotip característic dels neutròfils segmentats ( $CD11b^+ CD16^+$ ), els quals corresponen a l'etapa final de la diferenciació neutrofilica. Contràriament, aquesta població està absent a la fracció cel·lular corresponent al Producte A (6 dies de cultiu).



**Figura 4.3:** Representació dels percentatges de cèl·lules en cadascun dels tres estats maduratiu de la cascada de diferenciació neutrofilica a diferents intervals de temps. CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>. T=6 dies correspon al Producte A i t=14 dies correspon al Producte B. Els resultats es presenten com a mitjanes amb les desviacions estàndards corresponents. N=4.

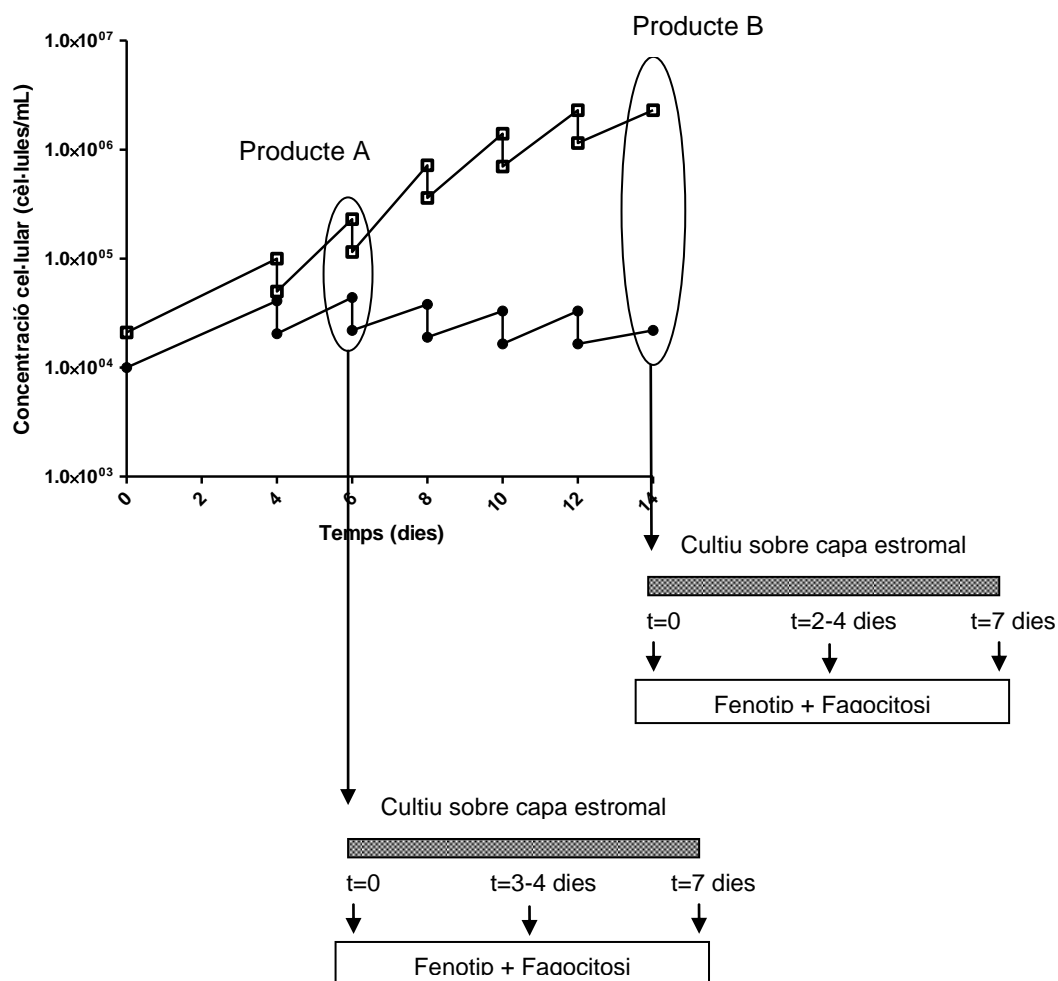
Una vegada determinat quin és el perfil de distribució dels precursors neutrofílics per a cadascuna de les fraccions d'estudi, s'inicien els estudis funcionals *in vitro*. Tal com s'ha esmentat anteriorment, una de les característiques funcionals més rellevants de la diferenciació neutrofílica és l'adquisició gradual de la capacitat fagocítica.

Així doncs, per a l'estudi de l'activitat funcional dels precursors neutrofílics generats al llarg del cultiu, s'empra un test *in vitro* consistent en mesurar l'activitat fagocítica mitjançant citometria de flux. Aquest assaig està basat en unes microesferes carboxilades grogues-verdes de 2 µm de diàmetre que, al ser fagocitades per les cèl·lules, poden ser detectades mitjançant citometria de flux, tal com es mostra a la Figura 4.4 (Lehmann et al., 2000, Steinkamp et al., 1982, van Eeden et al., 1999). A més, de forma complementària, les cèl·lules fagocítiques han estat observades mitjançant microscòpia confocal per tal de determinar si les microesferes simplement han quedat unides a la membrana cel·lular o efectivament han estat fagocitades a l'interior de la cèl·lula.



**Figura 4.4.** Determinació citomètrica del percentatge de cèl·lules fagocítiques en un punt concret del cultiu. La senyal emesa per les microesferes és captada pel canal FL1 del citòmetre de flux.

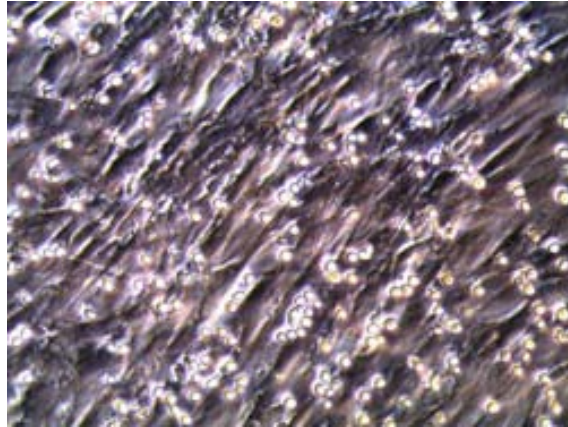
A tal efecte, les cèl·lules obtingudes transcorreguts 6 i 14 dies de cultiu (Producte A i Producte B, respectivament), es sembren sobre una capa estromal confluent (Figura 4.6), amb l'objectiu de promoure'n la seva diferenciació terminal i, posteriorment, avaluar-ne la seva activitat fagocítica a diferents punts del cocultiu, tal com s'esquematitza a la Figura 4. 5. Complementàriament, s'estudien els canvis fenotípics associats al procés de maduració.



**Figura 4. 5.** Esquema experimental per a la caracterització funcional dels precursors neutròfílics obtinguts a dia 6 (Producte A) i a dia 14 (Producte B) de cultiu. A tal efecte, les cèl·lules obtingudes a aquests dos punts temporals són sembrades sobre una capa estromal per tal de promoure'n la seva maduració i, posteriorment es determina l'activitat fagocítica de les cèl·lules resultants.

Tal com s'observa a la Figura 4.7, els resultats obtinguts mostren que l'activitat fagocítica inicial del Producte A és molt reduïda ( $4,6 \pm 3,1\%$  cèl·lules amb capacitat fagocítica), la qual cosa correlaciona amb el fet que la població cel·lular majoritària en aquest punt del cultiu és la més immadura de la cascada de diferenciació neutrofílica (promielòcits/mielòcits). Transcorreguts els 3-4 primers dies posteriors a la sembra sobre la capa estromal, s'observa una clara diferència en el perfil de maduració: un  $36,7 \pm 12,8\%$  de les cèl·lules presenten el fenotip propi dels metamielòcits ( $CD11b^+ CD15^+$ ), a la vegada que es comencen a generar els primers neutròfils segmentats ( $2,9 \pm 2\%$  de cèl·lules amb fenotip  $CD11b^+ CD16^+$ ). En consonància amb aquests resultats, l'activitat fagocítica augmenta de forma considerable, situant-se al  $17,9 \pm 10,5\%$ . Finalment, i transcorreguts 7 dies de cultiu del Producte A sobre la capa estromal, la població de metamielòcits ( $CD11b^+ CD15^+$ ) esdevé la majoritària, a la vegada que disminueix el percentatge de cèl·lules en un estat més immadur i augmenta la proporció de les cèl·lules amb el fenotip característic dels neutròfils segmentats ( $CD11b^+ CD16^+$ ). De la mateixa manera, l'activitat fagocítica ha continuat augmentant respecte els dies anteriors, fins al punt de que un  $28,9 \pm 13\%$  de les cèl·lules tenen la capacitat de fagocitar.



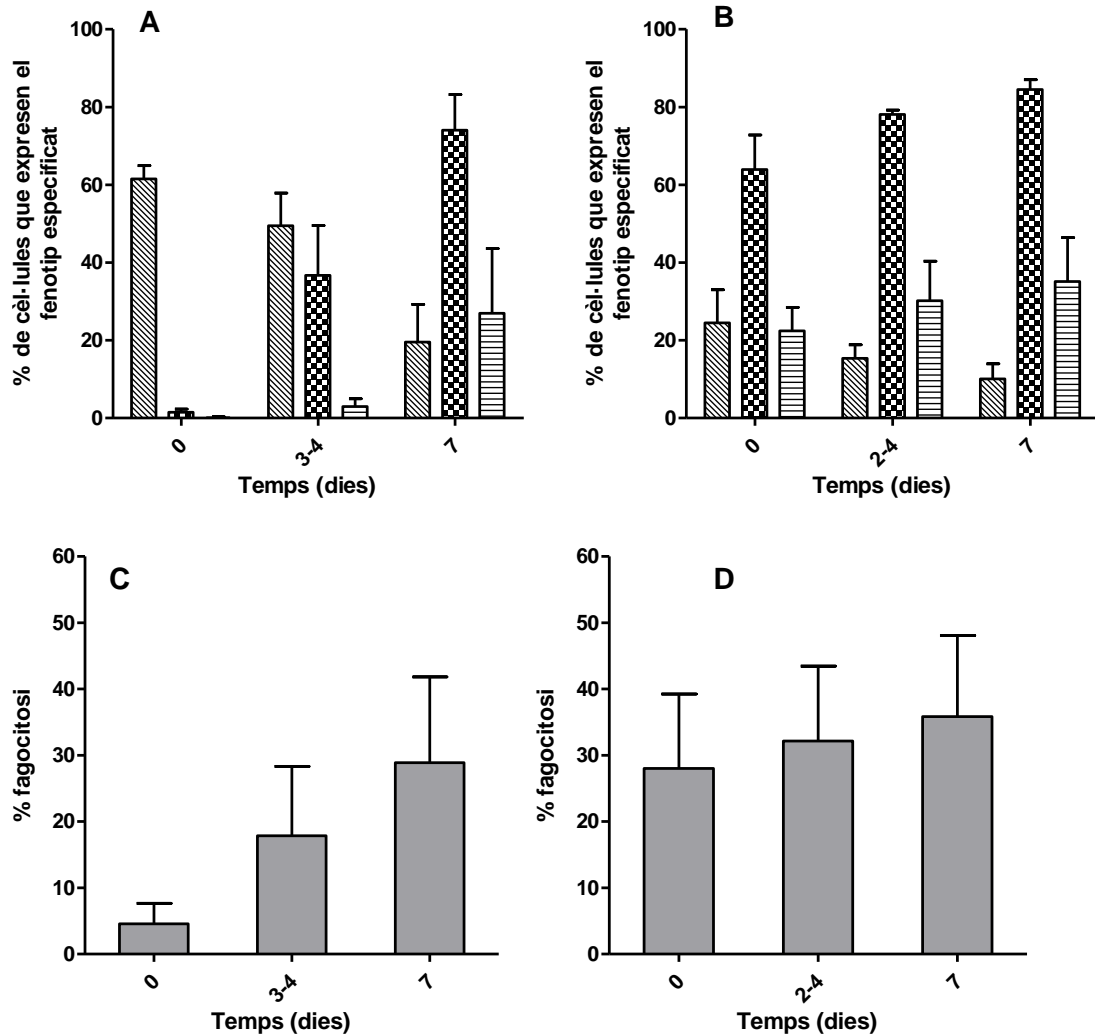


**Figura 4.6:** Imatge presa mitjançant microscòpia del cocultiu format en base a una capa estromal confluent irradiada a 15 Gy sobre la qual es sembren les cèl·lules obtingudes a partir del cultiu d'expansió. L'objectiu d'aquest cocultiu és afavorir la maduració de les precursors neutrofilics.

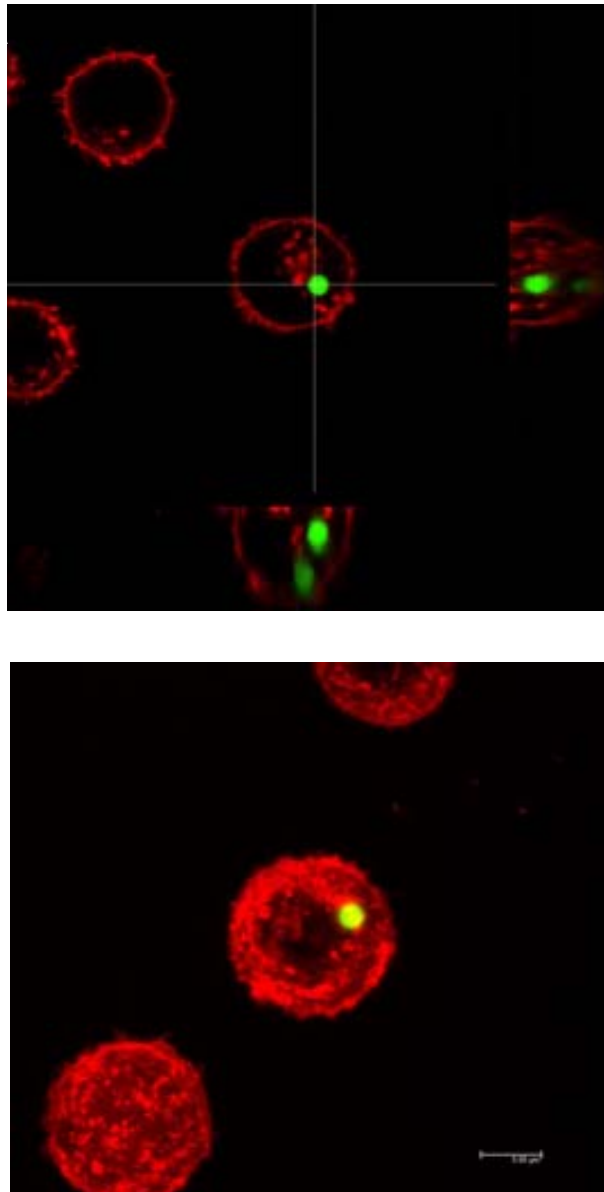
Per altra banda, i en referència al Producte B, en aquest cas no s'observa un canvi substancial pel què fa a la proporció de les poblacions cel·lulars en diferent estat de maduració durant el seu cultiu sobre la capa estromal. De fet, en aquest cas, a diferència del Producte A, ja es parteix d'un producte en un estat de maduresa més avançat, en el qual la població de metamielòcits (CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup>) és la població cel·lular majoritària. De la mateixa manera, el percentatge de cèl·lules fagocítiques tampoc experimenta un increment significatiu, essent del  $28 \pm 11,2\%$  a  $t=0$  i del  $35,8 \pm 12,2\%$  a  $t=7$  dies.

Complementàriament, l'observació de les cèl·lules fagocítiques mitjançant microscòpia confocal ha permès concloure que, efectivament, la gran majoria de cèl·lules internalitzen les microesferes sense retenir-les a l'exterior de la seva membrana cel·lular. Això s'ha pogut demostrar a partir de la realització de captures fotogràfiques de les cèl·lules a diferents plans, tant de l'eix X, Y com Z (Figura 4.8).

Així doncs, els resultats obtinguts evidencien que els precursors neutrofilics generats al llarg del cultiu d'expansió presenten una de les seves propietats funcionals característiques: activitat fagocítica.



**Figura 4.7:** Representació dels resultats obtinguts en la sembra sobre una capa confluent de cèl·lules mesenquimals. **A** i **B**: Perfils fenotípics del Producte A i del Producte B, respectivament, durant el cocultiu sobre cèl·lules mesenquimals. CD11b<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup> ▨, CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> ▩, CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> ▨. **C** i **D**: Representació del percentatge de cèl·lules fagocítiques del Producte A i B, respectivament, durant els diferents intervals temporals de cocultiu sobre mesenquimals. Els resultats es presenten com a mitjanes amb les desviacions estàndards corresponents. N=4



**Figura 4.8:** Imatges de les cèl·lules fagocítiques preses mitjançant microscòpia confocal. El perfil cel·lular s'observa de color vermell gràcies a la tinció de la membrana cel·lular realitzada amb el colorant CellMask Red. Les microesferes fagocitades s'observen de color verd. **A:** Representació d'un dels talls fotogràfics longitudinal i transversal que permet demostrar que la microesfera ha estat fagocitada a l'interior de la cèl·lula. **B:** Composició de tots els talls fotogràfics realitzats sobre un grup de cèl·lules, que permet reconstruir la imatge en 3 dimensions.

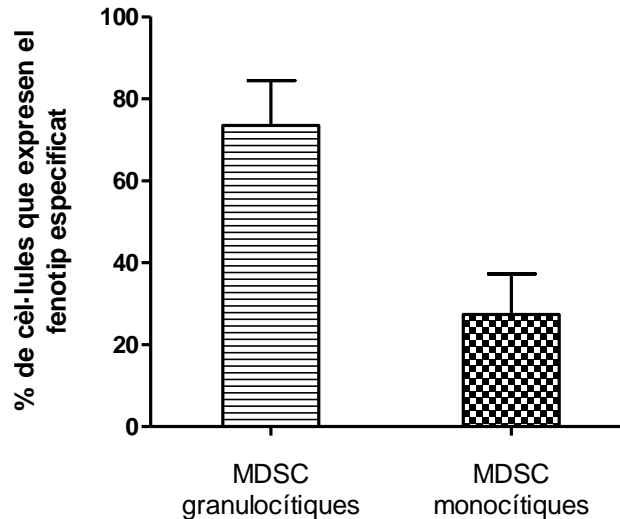
#### 4.2.2. Caracterització funcional *in vitro* de les MDSC

A continuació, i amb l'objectiu de determinar el mecanisme d'acció de les MDSC resultants del procés d'expansió cel·lular, es duu a terme l'estudi funcional basat en la determinació de les propietats immunomodulatòries pròpies d'aquest tipus cel·lular.

En primer lloc, i amb l'objectiu de determinar quin percentatge del total de les cèl·lules obtingudes a la finalització del cultiu presenten el fenotip propi de les MDSC, es realitza una caracterització citomètrica. Aquestes cèl·lules es classifiquen en MDSC granulocítiques i MDSC monocítiques, i l'estudi fenotípic es realitza en base a l'expressió de les següents proteïnes de membrana (Gimeno and Barquinero, 2011):

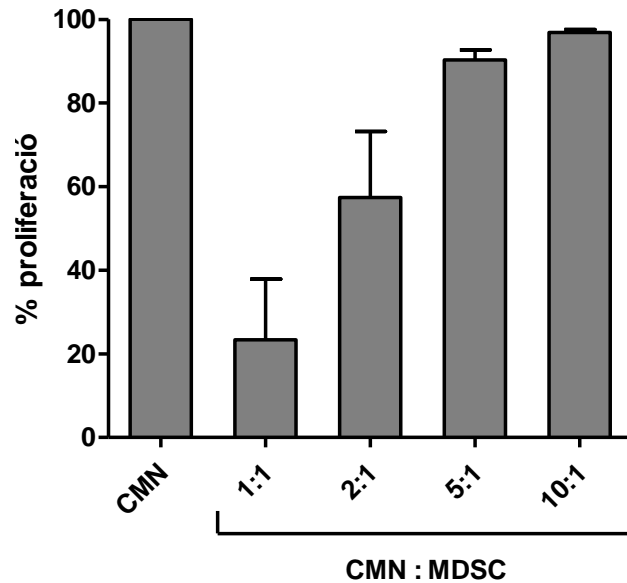
- I. MDSC-granulocítiques: CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup>
- II. MDSC-monocítiques: CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup>

Tal com es pot observar a la Figura 4.9, un  $73,5 \pm 10,9$  % de les cèl·lules obtingudes al final del cultiu presenten el fenotip característic de les MDSC granulocítiques. En canvi, el percentatge de MDSC monocítiques és del  $27,2 \pm 10$  %. Aquesta diferència entre ambdós tipus de MDSC està en consonància amb la principal citoquina utilitzada en el medi de cultiu: G-CSF, ja que aquesta citoquina, en combinació amb la SCF i IL-3 presents en el medi, actua promovent la diferenciació a llinatge neutrofilic (Thomson and Lotze, 2003). Així, i tal com s'ha observat en la caracterització dels precursors neutrofílics, la diferenciació a llinatge granulocític queda afavorida en detriment del llinatge monocític.



**Figura 4.9:** Percentatge de cèl·lules obtingudes al final del cultiu que compleixen el fenotip característic de les MDSC granulocítiques (N=5) i de les MDSC monocítiques (N=3). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard.

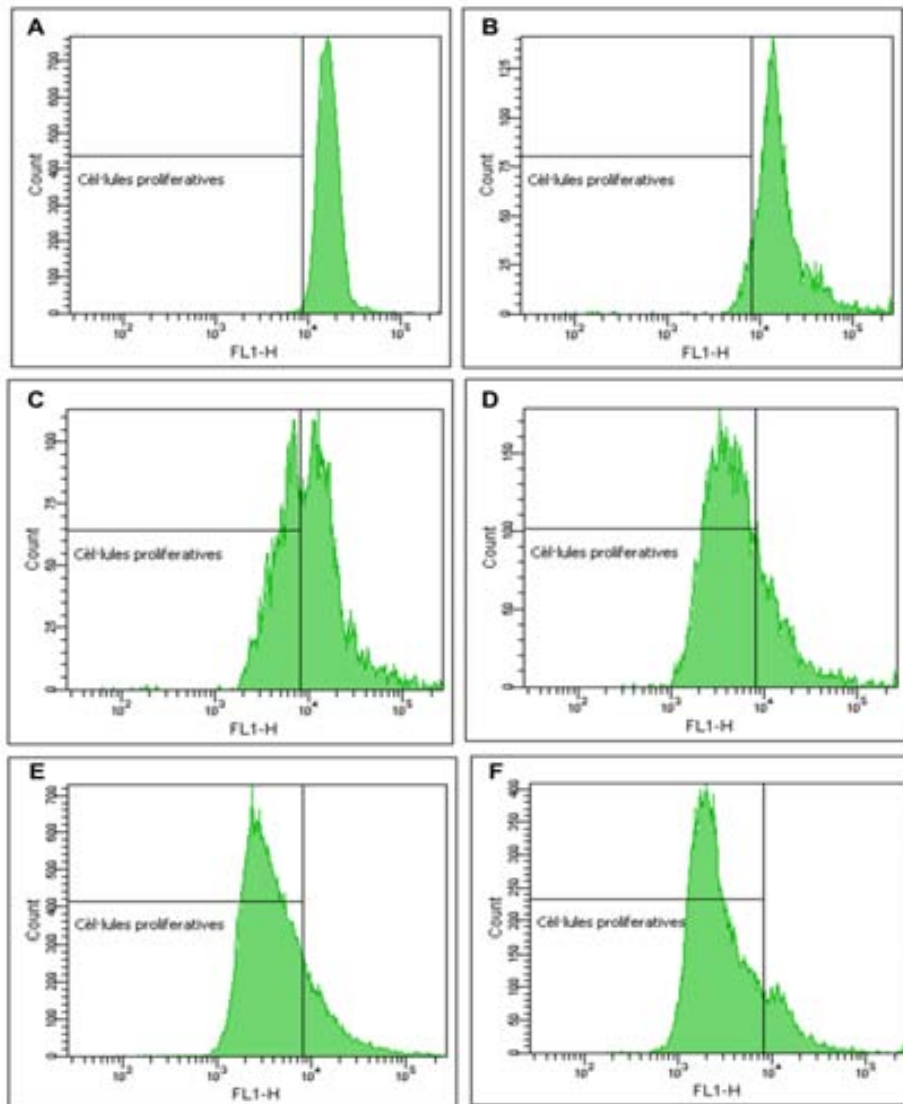
Tal com s'ha descrit anteriorment, la caracterització funcional de les MDSC es determina en base a l'estudi de la seva capacitat per inhibir la proliferació limfocitària d'una fracció de cèl·lules mononucleades (CMNs) obtinguda a partir d'una donació de sang. L'assaig *in vitro* dut a terme consisteix en un cocultiu de les MDSC obtingudes a la finalització del procés d'expansió juntament amb les cèl·lules mononucleades, els limfòcits de les quals han estat prèviament activats mitjançant la utilització d'un estímul policlonal (PMA/ionomicina) i tenyits amb el marcador citoplasmàtic CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). El cocultiu és dut a terme en diferents proporcions d'ambdós tipus cel·lulars amb l'objectiu de determinar si el possible efecte immunomodulador és dosi-dependent. Transcorreguts 6 dies posteriors a la sembra, es determina de nou el contingut de CFSE dels limfòcits mitjançant citometria de flux (Figura 4.10), la disminució del qual és indicatiu de proliferació cel·lular.



**Figura 4.10:** Representació gràfica dels resultats obtinguts en el cocultiu de CMNs amb les MDSC obtingudes a la finalització del cultiu. Els resultats s'expressen com a % de proliferació, valor que es calcula a partir de la pèrdua de la quantitat de CFSE del citoplasma limfocitari. S'han assajat 4 proporcions cel·lulars diferents, i com a control s'han utilitzat CMNs activades. CMN: fracció mononuclear aïllada d'un residu leucocitari, en la qual la població limfocitària representa la majoria de les cèl·lules. MDSC: cèl·lules mieloides supressores. Els resultats es representen com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard. N= 4.

Tal com s'observa a la Figura 4.10, els resultats obtinguts mostren que en els casos en els quals s'ha sembrat la mateixa proporció de CMNs i MDSCs, el percentatge de proliferació limfocitària ha estat únicament del  $23,4 \pm 14,5\%$ . A mesura que s'ha anat incrementat la proporció de les CMNs en front de les MDSC, la capacitat proliferativa ha augmentat progressivament, fins a situar-se a un valor del  $96,9 \pm 0,7\%$  de limfòcits proliferatius quan la proporció de sembra ha estat 1:10 (MDSC:CMN), valor molt similar al control (CMNs activades). Així doncs, aquests resultats semblen indicar que efectivament les MDSC obtingudes a la finalització del cultiu d'expansió presenten l'activitat immunomoduladora que les caracteritza (Fujimura et al., 2010, Gabrilovich

and Nagaraj, 2009). A més, els resultats obtinguts en les diferents proporcions cel·lulars utilitzades semblen indicar que aquesta capacitat per inhibir la proliferació limfocitària és dosi-dependent.



**Figura 4.11:** Anàlisi citomètric per a la determinació del percentatge de proliferació en base als nivells de CFSE del citoplasma cel·lular. La pèrdua d'intensitat del marcatge per CFSE és indicatiu de proliferació cel·lular, ja que per a cada procés de duplicació, la tinció citoplasmàtica es redueix a la meitat. **A:** CMNs cultivades sense estímul policlonal (control negatiu). **B:** Cocultiu de CMNs estimulades i MDSC, a una proporció 1:1. **C:** Cocultiu de CMNs estimulades i MDSC, a una proporció 2:1. **D:** Cocultiu de CMNs estimulades i MDSC, a una proporció 5:1. **E:** Cocultiu de CMNs estimulades i MDSC, a una proporció 10:1. **F:** CMNs cultivades amb estímul policlonal (control positiu).

## 4.3 DISCUSSIÓ

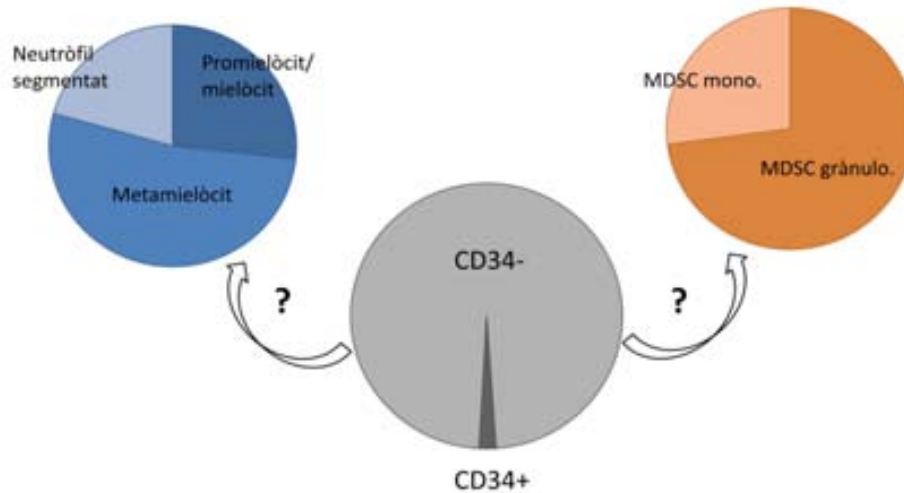
---

Un element clau en el desenvolupament d'un producte de teràpia cel·lular avançada és la definició dels seus possibles mecanismes d'acció en el context de l'aplicació clínica pel qual ha estat concebut. És per aquest motiu que el present capítol s'ha plantejat amb l'objectiu de dur a terme la caracterització funcional, a partir d'assajos *in vitro*, de les poblacions cel·lulars que conformen la fracció majoritària del producte, la fracció CD34<sup>+</sup>.

En primer lloc s'ha dut a terme una caracterització fenotípica, la qual ha posat de manifest que aquesta fracció cel·lular està integrada bàsicament per cèl·lules mieloides supressores (MDSC) i per precursors neutrofílics en diferent grau de maduració. D'aquests resultats destaca el fet que en ambdós determinacions, s'obté com a resultat que la totalitat de les cèl·lules pertanyen a un o altre tipus cel·lular, tal com es mostra a la Figura 4.12. Això es pot atribuir al fet que els marcadors utilitzats per a la caracterització de les MDSC no són suficientment específics. De fet, en aquest sentit, no existeix un consens en la comunitat científica a l'hora de definir un fenotip específic per a les MDSC degut a que es tracta d'una població cel·lular molt heterogènia (Filipazzi et al., 2012, Poschke and Kiessling, 2012). Aquesta dificultat en la definició d'un fenotip específic recau en el fet que no s'ha aconseguit establir de forma molt clara la frontera entre els precursors neutrofílics i les MDSC granulocítiques (Pillay et al., 2013). A priori, la diferència fonamental entre els dos tipus cel·lulars és la capacitat d'immunomodulació que presenten les MDSC, però recentment s'han publicat treballs en els quals es presenten nous avenços en la definició de la biologia dels neutròfils, com ara la presentació d'antígens, la inhibició de la resposta immunitària, o la inducció



en la commutació de classe de les cèl·lules B (Ostanin et al., 2012, Pillay et al., 2013, Puga et al., 2011). En base a aquests resultats, hi ha qui postula que les MDSC granulocítiques no són res més que un subtipus de neutròfils (Pillay et al., 2013).



**Figura 4.12.** Esquema de la composició cel·lular de la fracció CD34<sup>-</sup> del producte obtingut a la finalització del procés d'expansió, en base a la seva caracterització fenotípica. Segons els resultats citomètrics obtinguts, aquesta fracció cel·lular està integrada, en la seva totalitat, per precursors neutrofilítics o per MDSC. Aquesta falta de coherència en els resultats posa en evidència que els marcadors utilitzats per a la caracterització de les MDSC no són suficientment específics.

No obstant, els estudis funcionals duts a terme han evidenciat que en el producte final de l'expansió hi ha cèl·lules amb capacitat d'inhibir la proliferació limfocitària (Figura 4.10). Aquesta troballa obre les portes a plantejar un possible efecte immunomodulador per part del producte expandit que indueixi una tolerància a l'empelt. En aquest sentit, existeixen diversos treballs en que s'ha demostrat el potencial paper immunomodulador de les MDSC per tal d'induir tolerància en un context de trasplantament (Adeegbe et al., 2011, Marigo et al., 2010, Zhang et al., 2008, Garcia et al., 2010). Així doncs, tenint en compte que el rebuig és una de les

principals causes de fracàs en l'empelt (Mattsson et al., 2008), en cas de que aquest efecte quedés confirmat *in vivo*, suposaria un valor afegit al producte de teràpia cel·lular desenvolupat, ja que aquest no tan sols podria actuar sobre la reducció dels períodes d'aplàsia, sinó que també podria tenir un efecte facilitador de l'empelt de la unitat de SCU no expandida.

Per altra banda, i en referència a la determinació del mecanisme d'acció dels precursors neutrofílics generats, s'ha dut a terme la seva caracterització funcional en base a l'estudi de la progressiva adquisició de l'activitat fagocítica durant els successius estadis de diferenciació. Tenint en compte que una de les hipòtesis plantejades en aquest treball es fonamenta en el fet que els precursors neutrofílics generats puguin ser els responsables de la generació dels primers neutròfils en sang, és imprescindible que aquests precursors siguin capaços d'adquirir les seves propietats funcionals característiques (De Bruyn et al., 2005). L'estudi funcional realitzat ha consistit en la sembra de les cèl·lules obtingudes del procés d'expansió sobre una capa estromal, per tal d'induir la seva maduració terminal, i a continuació se n'ha determinat la seva activitat fagocítica. Els resultats obtinguts han posat de manifest que efectivament els precursors neutrofílics produïts presenten una activitat fagocítica associada al seu grau de maduresa. No obstant, en les condicions experimentals assajades, únicament  $35,1 \pm 11,3\%$  dels precursors neutrofílics obtinguts a la finalització del cultiu d'expansió han estat capaços de madurar de forma terminal. Aquests resultats es corresponen amb els publicats per l'equip de De Bruyn (De Bruyn et al., 2003) ja que també s'observa que efectivament es produeix una maduració terminal a neutròfils madurs, però no del total de les cèl·lules. Aquestes dades suggereixen que els precursors neutrofílics generats son capaços de diferenciar i

d'adquirir la seva capacitat fagocítica, però que la maduració completa d'aquest tipus cel·lular probablement necessita el contacte amb el microambient del moll d'os (De Bruyn et al., 2003).

Així doncs, les dades de funcionalitat *in vitro* obtingudes en aquest capítol suposen una eina molt valuosa per tal de poder aproximar quin paper podrien jugar les diferents poblacions d'aquesta fracció cel·lular majoritària en un eventual trasplantament de reconstitució hematopoètica. No obstant, amb l'objectiu de tenir una idea més realista del potencial terapèutic del producte, és evident aquestes dades s'han de complementar amb estudis en models animal *in vivo*. A tal efecte, en el Capítol 5 es realitza una caracterització del producte cel·lular en model murí immunodeficient.



# 5

Estudi de la capacitat d'empelt i  
re població en model murí NOD-  
*Scid*



## 5.1 INTRODUCCIÓ

---

Una vegada realitzada la caracterització funcional *in vitro* del capítol anterior, el següent pas consisteix en la caracterització dels productes cel·lulars *in vivo*. Aquesta caracterització permetrà, per una banda, determinar la capacitat d'empelt i repoblació de les cèl·lules generades i, per altra banda, avaluar-ne la seguretat.

Una CMH funcionalment activa es defineix com aquella cèl·lula amb capacitat d'autorenovació que és capaç d'empeltar i repoblar el moll d'os, generant cèl·lules madures de tots els llinatges sanguinis de forma estable i duradora (Greiner et al., 1998, Kobari et al., 2000, Shultz et al., 2007, Shultz et al., 2005). L'assaig funcional més àmpliament acceptat per a la caracterització de les CMH està basat en el model murí NOD-*Scid* (Greiner et al., 1998, Shultz et al., 2005). Aquest assaig consisteix en el trasplantament de les CMH d'estudi a ratolins prèviament irradiats, i en la posterior determinació del grau de quimerisme humà en moll d'os i sang perifèrica per tal d'avaluar-ne la capacitat de repoblament. La idoneïtat d'aquest model animal recau en la immunodeficiència severa que presenta al permetre el xenotrasplantament de cèl·lules humanes sense que es produeixi rebuig (Brehm et al., 2010). Des del descobriment de la mutació responsable de la immunodeficiència al 1983, s'han estat generant diverses soques que han permès aplicar aquest model animal en diverses disciplines biomèdiques per a l'estudi de l'hematopoesi i la immunobiologia humana (Brehm et al., 2010).

Recentment, s'ha desenvolupat la soca NOD-*scid IL2ry<sup>null</sup>*, que es caracteritza per l'absència de limfòcits i cèl·lules NK, a més d'altres deficiències en la immunitat. Aquestes característiques afavoreixen que els nivells d'empelt de les CMH

trasplantades siguin 6 vegades superiors respecte els ratolins NOD-*scid* convencionals sotmesos al mateix tractament (Brehm et al., 2010, Giassi et al., 2008, Shultz et al., 2007, Shultz et al., 2005). A més, aquesta soca de ratolins presenta una resistència a la formació de timomes, que té com a conseqüència una prolongació de l'esperança de vida dels ratolins, permetent així la realització d'estudis de més duració respecte els realitzats amb ratolins NOD-*scid* convencionals (Shultz et al., 2005).

La utilització d'aquest model animal ofereix la possibilitat de caracteritzar la capacitat repobladora de les CMH estudiades, segons si són cèl·lules repobladores de curt o de llarg termini (Güenechea et al., 1999). Les CMH amb capacitat de repoblació a curt termini (rSRC, de l'anglès *rapid SCID repopulating cells*), descrites per primera vegada per Mazurier l'any 2003, es caracteritzen per a la seva capacitat de repoblació del moll d'os dels ratolins transcorregudes 2-3 setmanes del seu trasplantament (Mazurier et al., 2003). Per altra banda, les cèl·lules amb capacitat repobladora a llarg termini (LT-SRC, de l'anglès *long-term SCID repopulating cells*) són aquelles que repoblen el moll d'os a partir de les 8 setmanes del seu trasplantament.

En el desenvolupament de productes de teràpia cel·lular basats en CMH/CPH, determinar les característiques de les cèl·lules en base a la seva capacitat de repoblació esdevé un punt bàsic en l'estudi per tal de predir el seu potencial en la seva aplicació clínica (Piacibello et al., 1999). A més, a banda de determinar l'eficàcia del producte, els estudis *in vivo* són imprescindibles per tal d'avaluar-ne la seguretat (en els aspectes de toxicitat, tumorigenèicitat i farmacologia) com a possible producte de teràpia cel·lular.



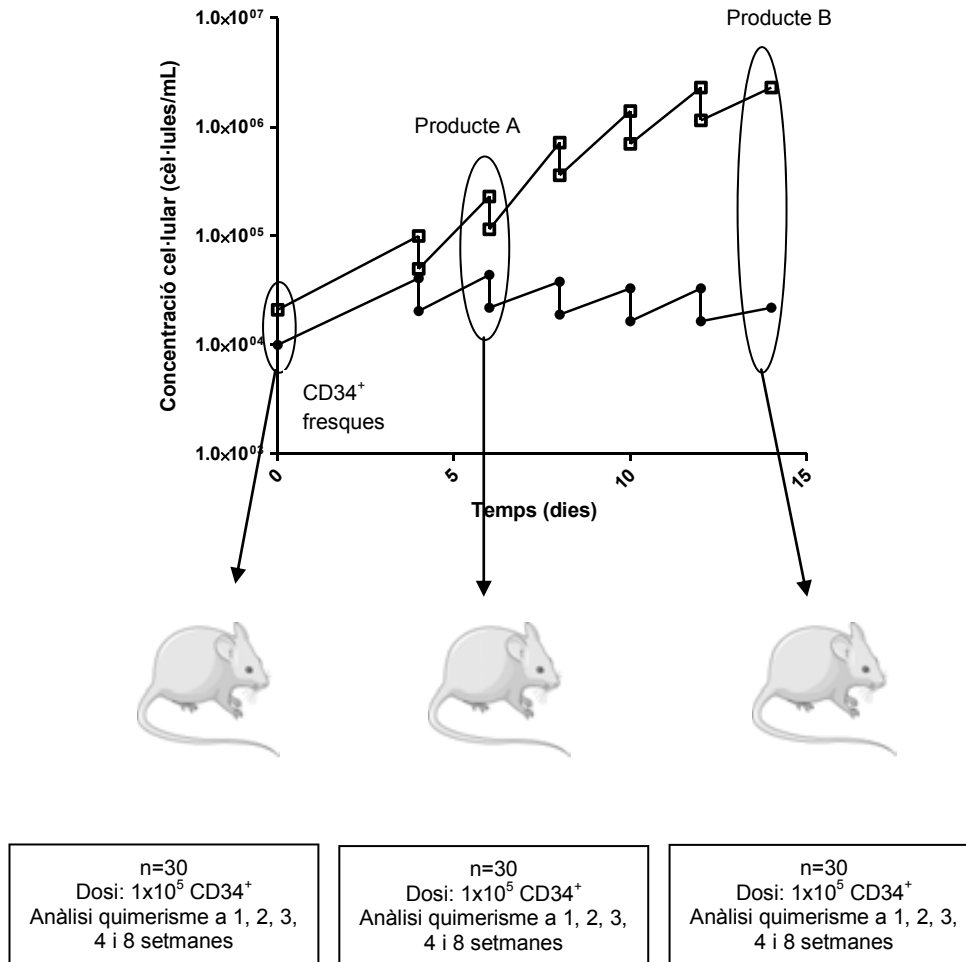
En aquest capítol, i de forma complementària al treball presentat en el capítol anterior, es duu a terme la determinació de la funcionalitat *in vivo* de les cèl·lules generades en cultiu. Així, de la mateixa manera que s'ha realitzat en el Capítol 4, les cèl·lules sotmeses a aquest estudi provenen de dos punts diferents del cultiu: transcorreguts 6 dies des de l'inici de l'expansió (Producte A) i transcorreguts 14 dies des de l'inici de l'expansió (Producte B). Així, mitjançant la utilització del model murí NOD-*scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>*, s'avalua la capacitat de repoblament del moll d'os a curt i llarg termini dels productes d'estudi en comparació amb les CMH de SCU no expandides. Amb aquestes dades afegides a les presentades en el Capítol 4, es pretén determinar en quin moment del cultiu es troba el producte cel·lular amb les característiques funcionals per a esdevenir un fàrmac cel·lular orientat al tractament de l'aplàsia mieloide. Per altra banda, aquest estudi es complementa amb un de seguretat consistent en un seguiment veterinari durant tot el transcurs de l'estudi i en una necròpsia completa final amb una avaluació macroscòpica i microscòpica dels òrgans per a determinar la presència de possibles formacions neoplàsiques.

## 5.2 RESULTATS

### 5.2.1. Producció dels tres productes cel·lulars a trasplantar al model murí NOD-*scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>*

Amb l'objectiu de determinar la capacitat de repoblament hematopoètic dels dos productes cel·lulars d'estudi (Producte A i Producte B) en comparació amb les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides de SCU, es duu a el trasplantament i posterior determinació

dels nivells de quimerisme humà en moll d'os i sang perifèrica del model murí NOD-*scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>*.



**Figura 5.1:** Esquema del procediment experimental seguit. Es trasplanten un total de 30 ratolins amb cadascun dels productes cel·lulars d'estudi a una dosi d'1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/ratolí. De forma prèvia al trasplantament, els ratolins són sotmesos a una irradiació subletal de 2 Gy. El Producte A s'obté transcorreguts 6 dies de cultiu i el Producte B s'obté als 14 dies de cultiu. Com a control s'utilitzen cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU purificades i no expandides.

De la mateixa manera que en el Capítol 5, la preparació del Producte A i Producte B es realitza mitjançant el cultiu d'expansió/diferenciació descrit en el Capítol 3. El cultiu s'inicia a partir de cèl·lules CD34<sup>+</sup> purificades de SCU a una puresa mitjana de 41±12,1% i a un inòcul d'1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL, i es manté en un medi químicament definit lliure

de sèrum i complementat amb els factors de creixement SCF, IL-3 i G-CSF (8.2.1). Tal com s'observa a la Figura 5.1, el Producte A s'obté transcorreguts 6 dies de cultiu, mentre que el Producte B s'obté als 14 dies de cultiu. Per últim, les CD34<sup>+</sup> no expandides (fresques) s'obtenen directament de la seva purificació de SCU, a una puresa mitja de  $31,5 \pm 5,2\%$ , i no es sotmeten a cap procés d'expansió. Aquestes cèl·lules serveixen per a establir la línia basal del nivell d'empelt respecte el qual es comparará l'obtingut amb el trasplantament del Producte A i del Producte B. Per a cadascun dels productes cel·lulars assajats, es trasplanten un total de 30 ratolins a una dosi d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/ratolí.

Durant el procés de preparació, les cèl·lules CD34<sup>+</sup> del Producte A s'expandeixen un total de  $7,5 \pm 2$  vegades, mentre que el conjunt total de cèl·lules del cultiu s'expandeix una mitja de  $21,9 \pm 7,6$  vegades. En aquest punt, la puresa de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> que conformen el Producte A és del  $14,9 \pm 4,6\%$ . Per altra banda, les cèl·lules CD34<sup>+</sup> del Producte B s'expandeixen  $61,6 \pm 26,9$  vegades, i el total de cèl·lules del cultiu ho fan  $1935,9 \pm 726$  vegades (Taula 5.1). En aquest cas, la puresa de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> és del  $1,23 \pm 0,5\%$ .

Degut a que la dosi de cèl·lules CD34<sup>+</sup> a trasplantar es fixa a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/ratolí i donada la diferència en el grau de puresa entre els Productes A i B, el nombre de cèl·lules madures (CD45<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>) és radicalment diferent entre cadascun dels productes trasplantats. Pel què fa a les CD34<sup>+</sup> fresques, el nombre de cèl·lules madures per cada  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> és de  $1,4 \times 10^5$ . En el cas del Producte A, el nombre de cèl·lules madures és de  $5,7 \times 10^5$  per cada  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>, i en el Producte B és de  $8 \times 10^6$ . Tal com s'ha determinat en el Capítol 4, i es descriu novament en l'apartat 5.2.2.2, en

el cas del Producte A i del Producte B, aquest conjunt de cèl·lules consisteix en precursors neutrofílics en diferent grau de maduració. En canvi, en el cas de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> fresques no expandides, aquestes cèl·lules són romanents de la purificació.

	Producte A (t=6 dies cultiu)	Producte B (t=14 dies cultiu)
EpT CD34 <sup>+</sup>	7,5 ± 2	61,6 ± 26,9
EpT cèl·lules totals	21,9 ± 7,6	1935,9 ± 726
EpT CFU-GM	12,49 ± 4,7	87,81 ± 25,05
EpT CFU totals	15,6 ± 5,93	72,28 ± 14,94

**Taula 5.1:** Factors d'expansió assolits al finalitzar la producció dels Productes A i B. EpT: factor d'expansió total. El càlcul del factor d'expansió total per a les cèl·lules CD34<sup>+</sup> o per a les cèl·lules totals es realitza a partir del quocient entre el nombre de cèl·lules obtingut al final del cultiu i el nombre de cèl·lules a l'inici del cultiu. Pel què fa al factor d'expansió del potencial clonogènic, aquest es calcula a partir del producte entre el factor d'expansió específic de l'eficiència clonogènica i el factor d'expansió específic de la població CD34<sup>+</sup>.

### 5.2.2. Caracterització *in vitro* dels tres productes cel·lulars a trasplantar al model murí NOD-*scid* IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>

De forma prèvia a la infusió als ratolins, es fa una caracterització de cadascun dels productes a trasplantar. Aquesta caracterització consisteix en un assaig clonogènic *in vitro* i en un conjunt de determinacions fenotípiques.

### 5.2.2.1. Determinació de la capacitat clonogènica dels progenitors hematopoètics

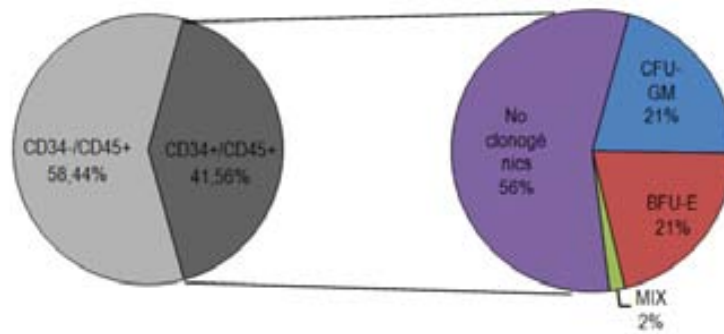
Els assajos clonogènics *in vitro* resulten útils per a determinar la proporció de CPH dirigides a llinatge granulocític presents en la població CD34<sup>+</sup>. Tal com es descriu a l'apartat de Materials i Mètodes (apartat 8.4.1), es sembren un total de 100 cèl·lules CD34<sup>+</sup> per a cada cultiu clonogènic i, transcorreguts 14 dies posteriors a la sembra, es realitza el recompte i classificació de les colònies presents.

Els resultats obtinguts mostren que existeixen diferències en l'eficiència clonogènica global de cadascun dels productes cel·lulars. En termes generals, tant el Producte A com el Producte B presenten una eficiència clonogènica global major que les cèl·lules CD34<sup>+</sup> fresques ja que, mentre que l'eficiència clonogènica del Producte A i del Producte B és de  $86,2\% \pm 22,8\%$  i  $66,7\% \pm 19,2\%$ , respectivament, la de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> fresques és del  $42,1\% \pm 3,5\%$  (Figura 5.2). Pel què fa a les eficiències clonogèniques específiques de llinatge, s'observen diferències molt evidents entre els tres productes cel·lulars obtinguts (Figura 5.2). En les CD34<sup>+</sup> fresques, el percentatge de progenitors de llinatge eritroide i de llinatge granulocític és aproximadament el mateix: 21%. Pel què fa al producte obtingut als 6 dies de cultiu (Producte A), aquest mostra una proporció de progenitors eritroides de  $49,2 \pm 21,1\%$ , caracteritzats per la presència de colònies del tipus BFU-E. En aquest mateix producte, el contingut de progenitors granulocític-macròfag, caracteritzats per la generació de colònies del tipus CFU-GM, és del  $31,7 \pm 3,5\%$ . No existeixen per tant diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) entre les poblacions de progenitors presents, fet que posa de manifest que, fins al moment, no s'ha produït una maduració selectiva a llinatge granulocític.

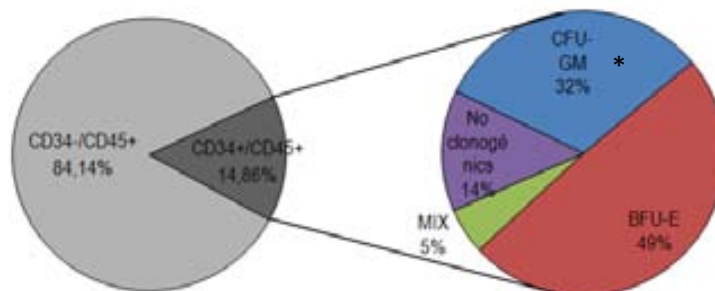
En contrast, als 14 dies de cultiu (Producte B), la presència de cèl·lules progenitores amb capacitat clonogènica CFU-GM és del  $48,6 \pm 14,2\%$ , i les formadores de colònies del tipus BFU-E és del  $22,9 \pm 3,3\%$ . Per tant, en aquest cas, les diferències observades són estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ). Així doncs, tot i que el Producte B mostra una menor capacitat clonogènica respecte el Producte A, guanya en especificitat.

Aquestes dades, conjuntament amb les taxes d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> assolides durant el transcurs del cultiu, permeten determinar el factor d'expansió del potencial clonogènic assolit en la producció tant del Producte A com del Producte B (Taula 5.1). Així, quan finalitza la fabricació del Producte A (6 dies de cultiu), el potencial clonogènic específic de llinatge granulocític-macròfag s'ha expandit  $12,5 \pm 4,7$  vegades, mentre que el potencial clonogènic global del cultiu ho ha fet  $15,6 \pm 5,9$ . Al seu torn, quan finalitza la fabricació del Producte B (14 dies de cultiu), el potencial clonogènic s'ha expandit  $87,8 \pm 25$  i  $72,3 \pm 14,9$  vegades, pels progenitors de llinatge granulocític-macròfag i pel global de progenitors del cultiu, respectivament.

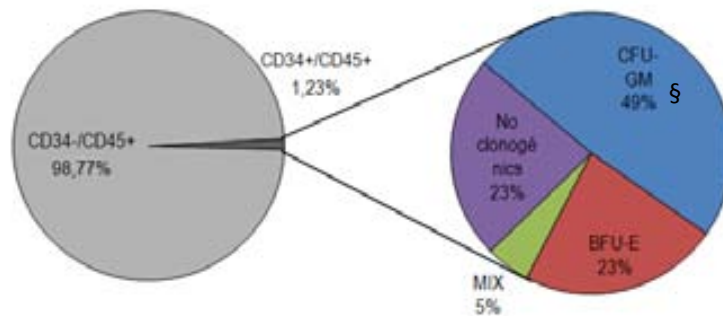
Així doncs, en les condicions de cultiu emprades, la diferenciació dels progenitors hematopoètics cap a progenitors de llinatge granulocític no es fa evident fins al final del cultiu, essent el Producte B el que està compost per una majoria de progenitors granulocítics-macròfags.

CD34<sup>+</sup> fresques (n=7)

Producte A (n=5)



Producte B (n=7)



**Figura 5.2:** Eficiències clonogèniques específiques de llinatge per a cadascuna de les fraccions cel·lulars d'estudi. Per a la determinació de l'eficiència clonogènica es sembren 100 cèl·lules CD34<sup>+</sup> en plaques de petri de 35 mm de diàmetre amb un medi comercial compost per metilcel·lulosa i factors de creixement. Transcorreguts 14 dies posteriors a la sembra, es recompten i classifiquen les colònies aparegudes. Per altra banda, pel càlcul de la puresa de la població CD34<sup>+</sup>, es realitza el quocient entre el nombre de cèl·lules CD34<sup>+</sup> i el número de cèl·lules CD34<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>. \* La diferència en l'eficiència clonogènica de llinatge granulocític-macròfag respecte la de llinatge eritroide no es considera estadísticament significativa ( $p=0,151$ ). § La diferència en l'eficiència clonogènica de llinatge granulocític-macròfag respecte la de llinatge eritroide sí que es considera estadísticament significativa ( $p=0,029$ ).

### 5.2.2.2. Caracterització fenotípica dels progenitors hematopoètics

Amb l'objectiu de determinar les diferències fenotípiques entre els tres productes cel·lulars d'estudi de forma prèvia al trasplantament, s'analitzen per citometria les cèl·lules CD34<sup>+</sup> mitjançant la combinació de marcadors característics dels progenitors més immadurs (CD133, CD90 i HLA-DR) i, la combinació de marcadors específics de llinatge característics dels progenitors més madurs (CD13, CD19, CD33, CD41a i CD71).

L'estudi immunofenotípic dels productes cel·lulars mostra que les proporcions de cèl·lules que expressen el fenotip més immadur es mantenen en les tres fraccions cel·lulars trasplantades. Per una banda, el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> que coexpressen la glicoproteïna CD133 es manté en torn del 95% tant en els productes A i B, com en les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides. Per altra banda, i de la mateixa manera, el percentatge de cèl·lules CD34<sup>+</sup> que presenten les proteïnes CD133 i CD90 en la seva membrana és d'entre el 80 i el 90% en els tres productes d'estudi. Finalment, les cèl·lules amb el fenotip CD133<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> i HLA-DR<sup>-</sup> representen el 4-7% de la població CD34<sup>+</sup> (Taula 5.2).

Pel què fa als marcadors específics de llinatge, la coexpressió dels marcadors mieloides CD13 i CD33, en pràcticament la totalitat de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> evidencia que la majoria dels progenitors hematopoètics són de llinatge mieloide, independentment de la fracció cel·lular estudiada (Producte A, Producte B i CD34<sup>+</sup> no expandides). Per altra banda, els nivells de coexpressió del marcador eritroide CD71 es situen per sobre del 90% en les tres fraccions cel·lulars d'estudi. Aquest fet no evidencia una possible diferenciació a llinatge eritroide, sinó que al tractar-se del



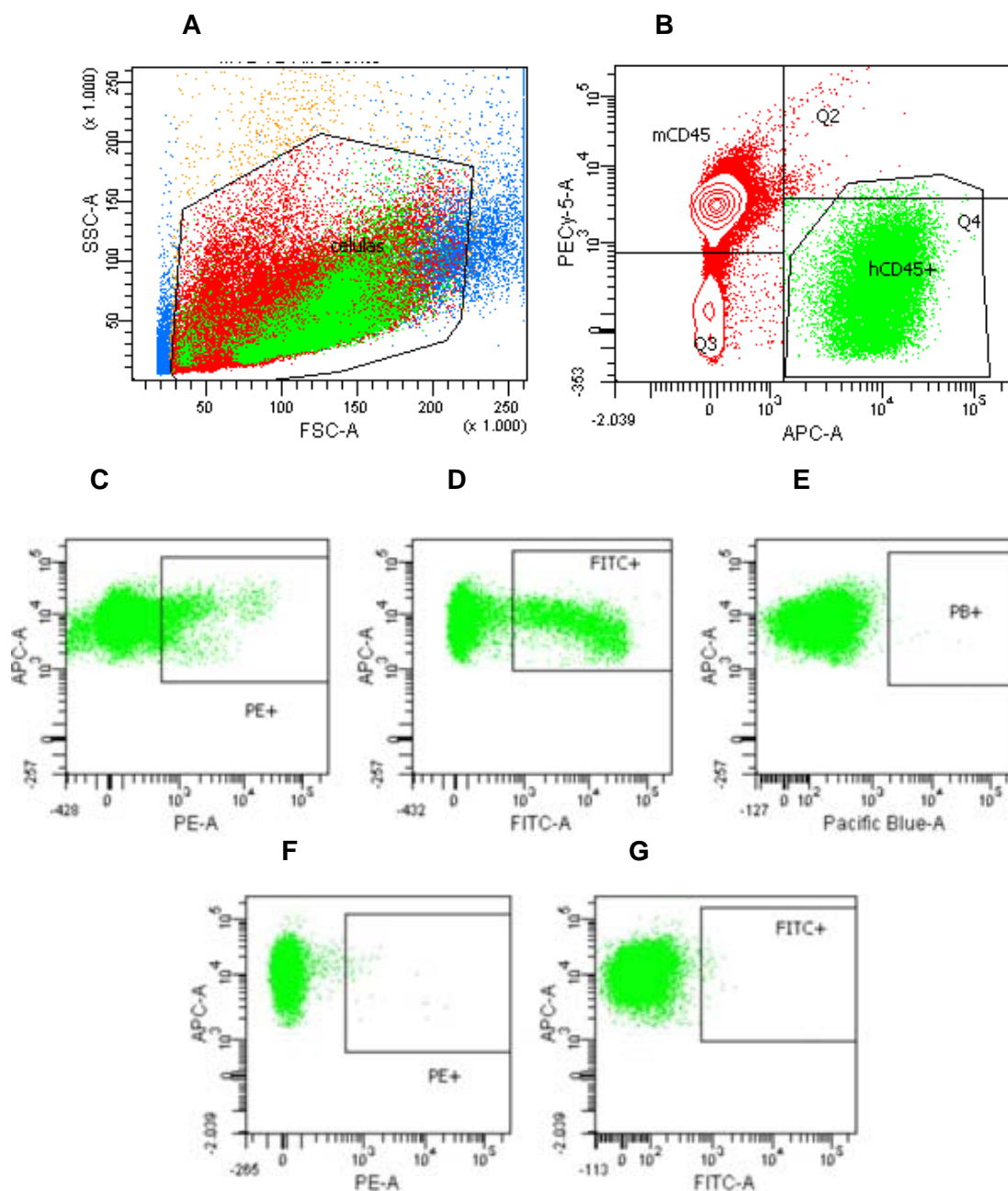
receptor de la transferrina, la seva expressió és comuna en totes les cèl·lules proliferatives amb la necessitat d'incorporar ferro [<http://prow.nci.nih.gov>]. Pel què fa al llinatge megacariocític, les cèl·lules CD34<sup>+</sup> de les tres fraccions cel·lulars presenten uns nivells reduïts del marcador CD41a en les seves membranes, fet que denota que en aquestes condicions de cultiu, els progenitors hematopoètics no s'estan diferenciant cap a llinatge megacariocític. Per últim, en cap de les tres fraccions cel·lulars d'estudi es detecta la coexpressió del marcador CD19, característic dels limfòcits B.

		Producte A (t=6 dies cultiu) n=2	Producte B (t=14 dies cultiu) n=4	CD34 <sup>+</sup> fresques n=3
<b>Fenotip madur</b>	CD13 <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	99,96 ± 0,06	99,92 ± 0,11	96,72 ± 4,72
	CD19 <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	0	0	0
	CD33 <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	99,86 ± 0,87	100 ± 0	93,56 ± 5,25
	CD41a <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	7,41 ± 7,08	4,51 ± 5,66	1,6 ± 1,18
	CD71 <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	97,78 ± 0,92	95,77 ± 0,77	87,11 ± 15,21
<b>Fenotip immadur</b>	CD133 <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	94,56 ± 4,67	97,27 ± 1,18	95,62
	CD133 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> en CD34 <sup>+</sup>	78,36 ± 15,72	89,58 ± 3,35	89,21
	CD133 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> HLA- DR <sup>-</sup> en CD34 <sup>+</sup>	4,36 ± 0,75	3,97 ± 0,78	6,91

**Taula 5.2:** Patró d'expressió fenotípic de cadascuna de les fraccions cel·lulars d'estudi. Per a totes les fraccions cel·lulars es duu a terme una exhaustiva caracterització fenotípica tant de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> compromeses als diferents llinatges sanguinis com de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> més immadures. En tots els casos, la tècnica utilitzada ha estat citometria de flux. Els resultats s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard.

### 5.2.3. Caracterització *in vivo* dels productes cel·lulars: estudi de la capacitat d'empelt i repoblació en el model murí NOD-*scid IL2r<sup>null</sup>*

Per tal d'estudiar la resposta biològica *in vivo* dels productes generats a partir del cultiu d'expansió en comparació amb les CD34<sup>+</sup> de SCU sense expandir, es duu a terme un assaig de repoblació en el model murí NOD-*scid IL2r<sup>null</sup>*. Es trasplanten un total de 30 ratolins per a cada producte cel·lular d'estudi (Producte A, Producte B i cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides) a una dosi de  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/ratolí. El trasplantament es realitza en ratolins prèviament irradiats (a una dosi subletal de 2Gy) mitjançant injecció realitzada en una vena de la cua. La determinació de la capacitat de repoblació es realitza en base a l'anàlisi del grau de quimerisme humà assolit tant en moll d'os com en sang perifèrica transcorregudes 1, 2, 3, 4 i 8 setmanes des del trasplantament. En cada punt temporal, es sacrifiquen 6 ratolins per a cada producte cel·lular estudiat. L'estudi del grau de quimerisme es realitza mitjançant citometria de flux i consisteix en la determinació del nombre de cèl·lules marcades amb l'anticòs anti-CD45 humà respecte el nombre de cèl·lules marcades amb l'anticòs anti-CD45 murí. A banda d'això, també es determinen les subpoblacions mieloides, neutròfiles, megacariocítiques i limfoides dins la població CD45<sup>+</sup> humana amb els marcadors CD13, CD15 i CD16, CD41a i CD3, respectivament (Figura 5.3).



**Figura 5.3:** Exemple de citometria per a la determinació del grau de quimerisme i de les subpoblacions presents tant en sang perifèrica com en moll d'os. **A:** representació de totes les cèl·lules segons la seva mida i complexitat. **B:** la població seleccionada en el gràfic **A** es sotmet a una discriminació de possibles doblats cel·lulars (no mostrat) i a continuació es representa en el gràfic **B**, en el qual es pot distingir la població de cèl·lules CD45<sup>+</sup> humanes. Aquesta població seleccionada en el gràfic **B** és representada en els gràfics **C**, **D**, **E**, **F** i **G** per tal de determinar-ne la subpoblació a la qual pertanyen.

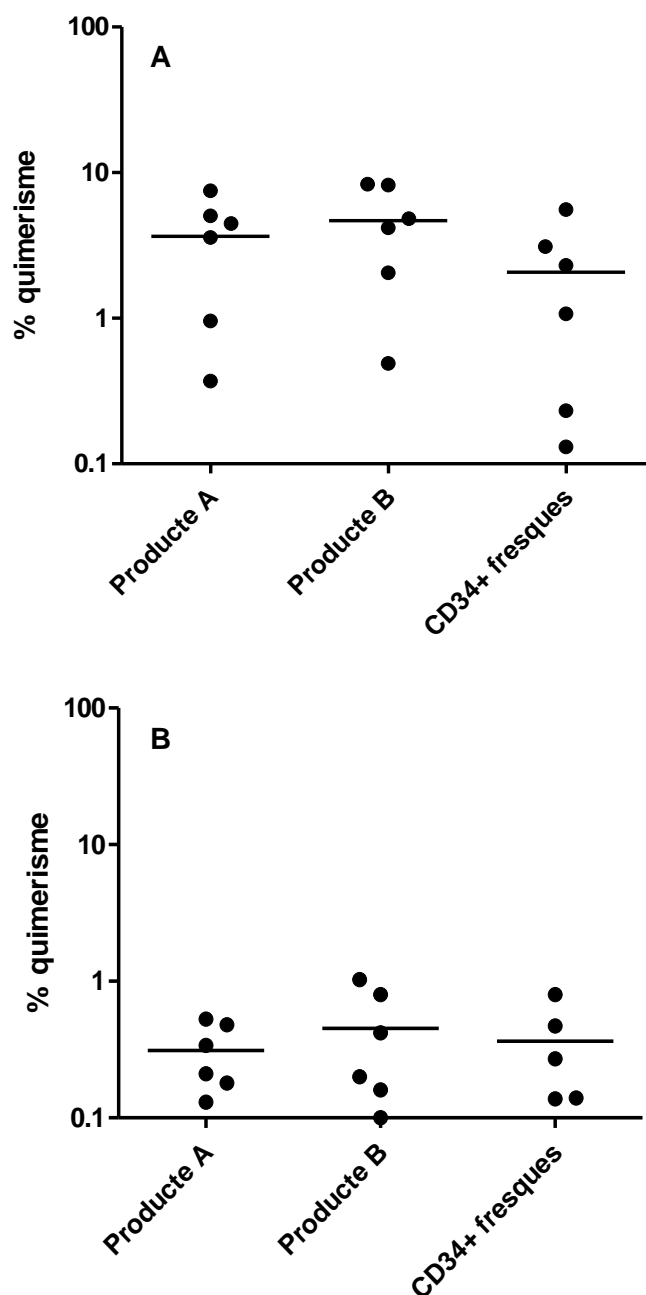
### 5.2.3.1. Reconstitució hematopoètica a curt termini

Per tal de determinar l'activitat repobladora a curt termini (rSRA) que tenen els Productes A i B en comparació amb les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides, es sacrifiquen un total de 18 ratolins i se n'estudia el grau de quimerisme transcorregudes 2 setmanes del trasplantament.

En primer lloc convé destacar que l'efectivitat de l'empelt no es veu condicionada pel producte cel·lular trasplantat ja que els tres productes cel·lulars han empeltat a tots els ratolins (nivell de quimerisme >0,1), fet que fixa una taxa d'empelt del 100%.

Pel què fa als nivells de quimerisme assolits en el moll d'os, tal com s'observa a la Figura 5.4.A, són del  $3,7 \pm 2,7\%$ ,  $4,7 \pm 3,2\%$  i  $2,1 \pm 2,1\%$  pel Producte A, Producte B i cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandies, respectivament. Així doncs, el grau de quimerisme assolit en els ratolins trasplantats amb el Producte B és lleugerament superior a la resta, essent els ratolins trasplantats amb CD34<sup>+</sup> no expandides els que mostren uns nivells de quimerisme més reduïts. No obstant, en cap cas les diferències entre els tres productes cel·lulars d'estudi es poden considerar estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ).

Pel què fa als nivells de quimerisme en sang perifèrica (Figura 5.4.B), els resultats mostren que, a l'igual que en el moll d'os, els nivells d'empelt són molt semblants pels tres productes cel·lulars d'estudi. En aquest cas però, els percentatges de cèl·lules humanes respecte les cèl·lules murines són inferiors en comparació al moll d'os:  $0,3 \pm 0,2\%$  pel Producte A,  $0,5 \pm 0,4\%$  pel Producte B i  $0,4 \pm 0,3\%$  per les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides. Les diferències entre els tres productes tampoc es consideren estadísticament significatives.

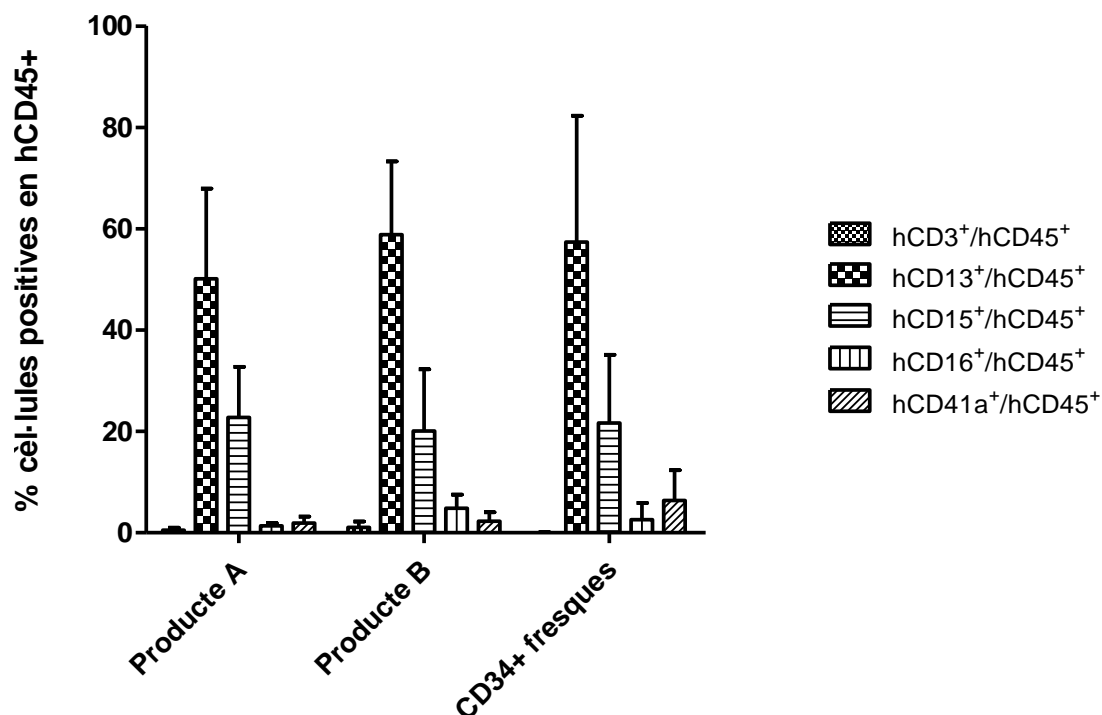


**Figura 5.4:** Determinació dels nivells d'empelt a curt termini (2 setmanes post-trasplantament). Es sacrifiquen un total de 6 ratolins trasplantats amb cadascun dels productes cel·lulars d'estudi. El nivell d'empelt es mesura a partir del grau de quimerisme ( $hCD45^+/mCD45^+ + hCD45^+$ ) tant en moll d'os (A), com en sang perifèrica (B) mitjançant citometria de flux. En moll d'os (A), tant els ratolins trasplantats amb el Producte A com amb el Producte B mostren uns nivells de quimerisme lleugerament superiors als tractats amb les CD34<sup>+</sup> fresques, tot i que les diferències no són estadísticament significatives. En sang perifèrica (B), els nivells de quimerisme dels tres grups experimentals són molt similars. En tots els casos, el grau de quimerisme en sang perifèrica és menor al del moll d'os.

De forma complementària a l'anàlisi del grau de quimerisme, s'estudia la presència de diverses subpoblacions dins la població CD45<sup>+</sup> humana en moll d'os amb l'objectiu de determinar el llinatge de les cèl·lules humanes repobladores. Tal com s'observa a la Figura 5.5, independentment del producte cel·lular transfós, transcorregudes 2 setmanes del trasplantament, la majoria de cèl·lules humanes del moll d'os dels ratolins són de llinatge mieloide (CD13<sup>+</sup>): 50,1 ± 17,8% en ratolins trasplantats amb el Producte A, 58,8 ± 14,5% en ratolins trasplantats amb Producte B i 57,4 ± 24,9% en ratolins trasplantats amb cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides. Tot i que en menor mesura, la subpoblació CD15<sup>+</sup> (precursors neutrofilics) també està present en el moll d'os dels ratolins trasplantats amb qualsevol dels tres productes: 22,7 ± 10%, 20,1 ± 12,2 % i 21,7 ± 13,5% en ratolins trasplantats amb el Producte A, amb el Producte B i amb les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides, respectivament.

Contràriament, pel que fa a la resta de subpoblacions, l'anàlisi dels nivells d'expressió d'antígens identificatius de llinatge limfoide T, megacariocític i de neutròfils madurs (CD3, CD41a i CD16, respectivament) posa de manifest que rarament els progenitors hematopoètics, transcorregudes 2 setmanes post-trasplantament, diferencien cap als llinatges esmentats, doncs en cap cas es supera el 5%, independentment del producte cel·lular transfós.

Per tant, aquests resultats semblen indicar que el procés d'expansió *in vitro*, independentment de la seva durada, no altera l'activitat repobladora a curt termini que tenen els progenitors hematopoètics de la sang de cordó umbilical sobre un hoste aplasiat.



**Figura 5.5:** Sub poblacions humanes presents en el moll d'os dels ratolins immunodeficients a les 2 setmanes posteriors al trasplantament. Per a cada ratolí, s'estudien 5 sub poblacions cel·lulars humanes mitjançant marcadors específics dels diversos llinatges. Independentment del producte cel·lular transfós, la població majoritària en moll d'os és de llinatge mieloide (CD13), seguida del llinatge neutrofilic (CD15). Per a cada producte i per a cada sub població, N=6. Els resultats s'expressen com a mitjanes  $\pm$  desviació estàndard.

### 5.2.3.2. Reconstitució hematopoètica a llarg termini

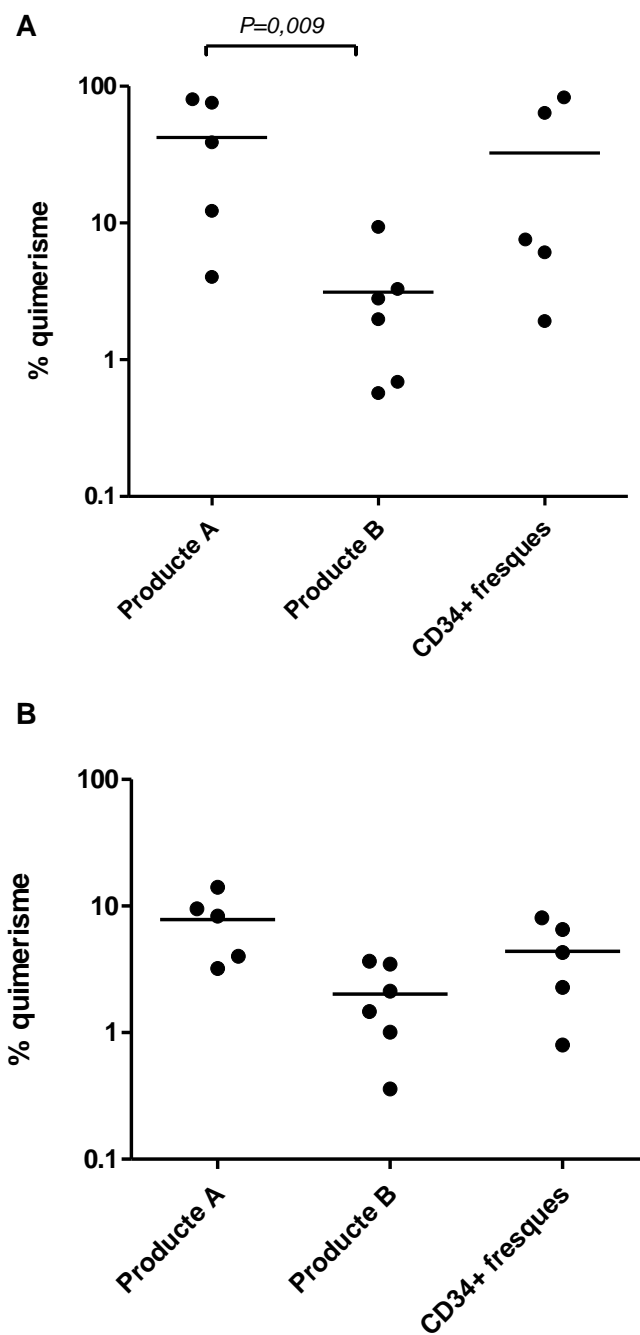
Pel què fa a l'activitat repobladora a llarg termini (LT-SRA), aquesta es determina mitjançant l'anàlisi del nivell de quimerisme transcorregudes 8 setmanes post-trasplantament.

Tal com s'observa a la Figura 5.6, els resultats obtinguts mostren que els ratolins trasplantats amb el Producte B presenten un grau de quimerisme molt inferior als

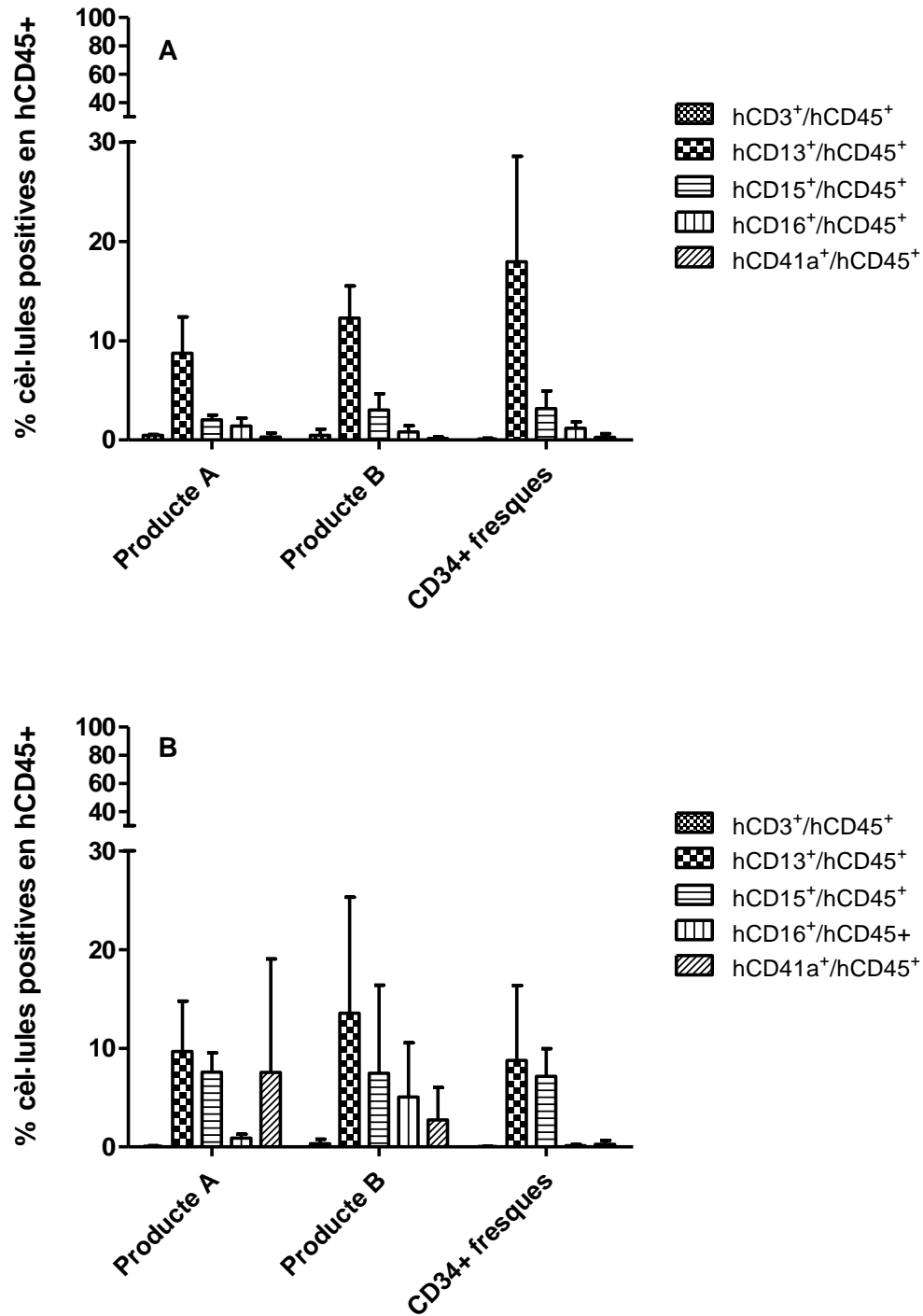
trasplantats amb el Producte A i amb les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides, tant en moll d'os com en sang perifèrica. És en el moll d'os (Figura 5.6.A) on aquesta diferència es fa més evident: mentre que el percentatge de quimerisme dels ratolins receptors del Producte B és del  $3,1 \pm 3,2\%$ , el dels ratolins receptors del Producte A i de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides és del  $42,3 \pm 35,2\%$  i  $32,5 \pm 38\%$ , respectivament. Pel que fa a la sang perifèrica (Figura 5.6.B), tot i que menors, les diferències també són rellevants: el nivell de quimerisme és de  $2 \pm 1,3\%$  pels ratolins trasplantats amb el Producte B i de  $7,8 \pm 4,4\%$  i  $4,4 \pm 3\%$  pels trasplantats amb el Producte A i amb les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides, respectivament. Tant en moll d'os com en sang perifèrica, la diferència del nivell d'empelt entre el Producte A i el Producte B es considera estadísticament significativa ( $p < 0,05$ ). Contràriament, la diferència entre el Producte B i les cèl·lules no expandides no es considera estadísticament significativa.

Pel que fa a les subpoblacions humanes aparegudes a les 8 setmanes post-trasplantament (Figura 5.7), el llinatge majoritari observat tant en SP com en MO ha estat el mioide (CD13<sup>+</sup>), independentment del producte trasplantat. Aquest patró d'expressió, tot i que en menor mesura, és el mateix que l'observat en MO a les 2 setmanes post-trasplantament. És important destacar que a diferència dels resultats obtinguts a les 2 setmanes post-trasplantament, el percentatge de cèl·lules humanes que expressen algun dels marcadors d'estudi és menor en les mostres obtingudes a les 8 setmanes post-trasplantament. Aquest fet posa en evidència que la majoria de les cèl·lules humanes generades a les 8 setmanes post-trasplantament pertanyen a un llinatge cel·lular no inclòs en la bateria d'anticossos utilitzats.





**Figura 5.6:** Determinació dels nivells d'empelt a llarg termini (8 setmanes post-trasplantament). Es sacrifiquen un total de 6 ratolins trasplantats amb cadascun dels productes cel·lulars d'estudi. El nivell d'empelt es mesura a partir del grau de quimerisme ( $hCD45^+/mCD45^++hCD45^+$ ) tant en moll d'os (A), com en sang perifèrica (B). Els ratolins trasplantats amb el Producte B mostren uns nivells de quimerisme molt inferiors, tant en sang perifèrica com en moll d'os, respecte als trasplantats amb el Producte A i amb les cèl·lules CD34+ no expandides. La determinació es realitza mitjançant citometria de flux.



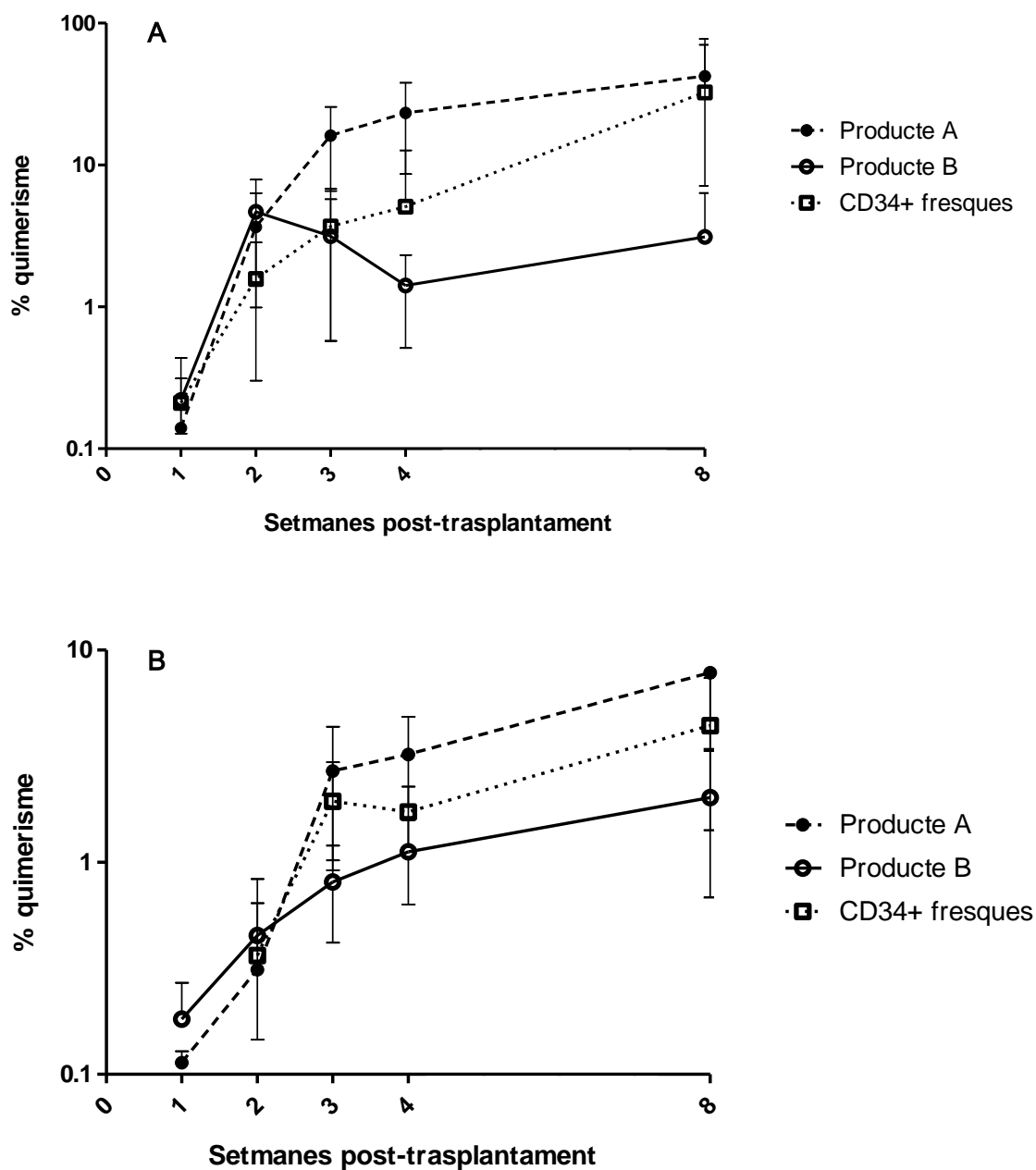
**Figura 5.7:** Subpoblacions humanes presents en el moll d'os i a la sang perifèrica a les 8 setmanes posteriors al trasplantament. Per a cada ratolí, s'estudien 5 subpoblacions cel·lulars humanes mitjançant marcadors específics dels diversos llinatges tant en sang perifèrica (A) com en moll d'os (B). El llinatge majoritari aparegut tant en MO com en SP ha estat el mieloide, independentment del producte cel·lular transfós. Per a cada producte i per a cada subpoblació, N=6. Els resultats s'expressen com a mitjanes  $\pm$  desviació estàndard.

### 5.2.3.3. Estudi de la cinètica de repoblament

Amb l'objectiu de tenir més informació del comportament *in vivo* dels productes estudiats, s'ha avaluat tant la cinètica de repoblament del moll d'os (Figura 5.8.A) com de la sang perifèrica (Figura 5.8.B) per a cadascun dels productes cel·lulars trasplantats.

Tal com s'observa a la Figura 5.8.A, independentment del producte cel·lular implantat, a la primera setmana posterior al trasplantament, els nivells d'empelt en moll d'os són de l'ordre de 0,1-0,2%. A partir d'aquest punt temporal i fins la vuitena setmana post-trasplantament, cadascun dels grups d'estudi té un comportament diferent. Per una banda, els ratolins trasplantats amb el Producte A mostren un augment progressiu molt pronunciat del percentatge de quimerisme humà fins la quarta setmana post-trasplantament, moment en que se situa al  $23,6 \pm 14,3\%$ . A partir d'aquest punt i fins la vuitena setmana, el nivell d'empelt també experimenta un augment progressiu però menys pronunciat que en la primera etapa. Aquesta cinètica contrasta amb la que segueixen els ratolins trasplantats amb el Producte B. De forma paral·lela al Producte A, el nivell d'empelt dels ratolins receptors del Producte B augmenta fins la segona setmana post-trasplantament. A partir d'aquest moment i fins la quarta setmana, el percentatge de quimerisme experimenta una davallada, situant-se a un nivell de  $1,4 \pm 0,9\%$ . Aquest valor augmenta de forma molt suau fins a assolir un  $5,1 \pm 7,6\%$  a la vuitena setmana. Pel que fa a la línia basal de repoblament, es a dir, a les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides, el perfil que presenten és similar al del Producte A però amb uns nivells d'empelt substancialment inferiors. No és fins a la vuitena setmana que els nivells d'empelt d'ambdós productes s'igualen, moment en que s'assoleixen valors compresos entre el 30 i el 40%.

Pel què fa a la cinètica d'aparició de cèl·lules humanes en sang perifèrica (Figura 5.8.B), les diferències més evidents entre els tres productes cel·lulars d'estudi s'observen en la primera setmana post-trasplantament. En aquest punt temporal destaca l'absència de cèl·lules humanes en la sang perifèrica dels ratolins receptors de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> no expandides (0% dels ratolins trasplantats presenten nivells detectables de cèl·lules humanes en sang). En canvi, pel què fa als ratolins trasplantats amb el Producte A, el nivell de quimerisme observat ha estat del  $0,11 \pm 0,02\%$ , i en aquest cas l'eficiència de l'empelt ha estat del 50% dels ratolins. Per últim, en el cas del Producte B, el nivell de quimerisme se situa al  $0,18 \pm 0,1 \%$ , tractant-se així del producte cel·lular amb una eficiència de l'empelt en sang perifèrica major (83,3%) durant la primera setmana post-trasplantament. Transcorregudes dues setmanes post-trasplantament, el percentatge de quimerisme dels tres productes cel·lulars d'estudi s'igualen i a partir d'aquest punt experimenten un augment progressiu, més accentuat en el cas dels ratolins trasplantats amb el Producte A, que se situen en valors de quimerisme superiors a la resta. A partir de la tercera setmana, segueix l'augment suau i progressiu dels nivells de quimerisme dels ratolins trasplantats amb els tres productes cel·lulars d'estudi, essent els receptors del Producte A els que presenten un nivell de quimerisme major i els del Producte B els que el presenten menor. Aquesta tendència es manté fins a la vuitena setmana, moment en que els percentatges de quimerisme se situen a  $7,8 \pm 4,4\%$ ,  $2 \pm 1,3\%$  i  $4,4 \pm 3\%$  en els ratolins receptors del Producte A, Producte B i CD34<sup>+</sup> no expandides, respectivament.



**Figura 5.8:** Cinètica de repoblament en moll d'os (A) i en sang perifèrica (B). Es realitza una determinació del grau de quimerisme a 1, 2, 3, 4 i 8 setmanes post-trasplantament per tal d'obtenir una cinètica de repoblament per a cada producte cel·lular d'estudi. Per a cada punt temporal i per producte trasplantat, es realitza l'anàlisi de 6 ratolins. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard.

#### 5.2.4. Estudis toxicològics i de biodistribució

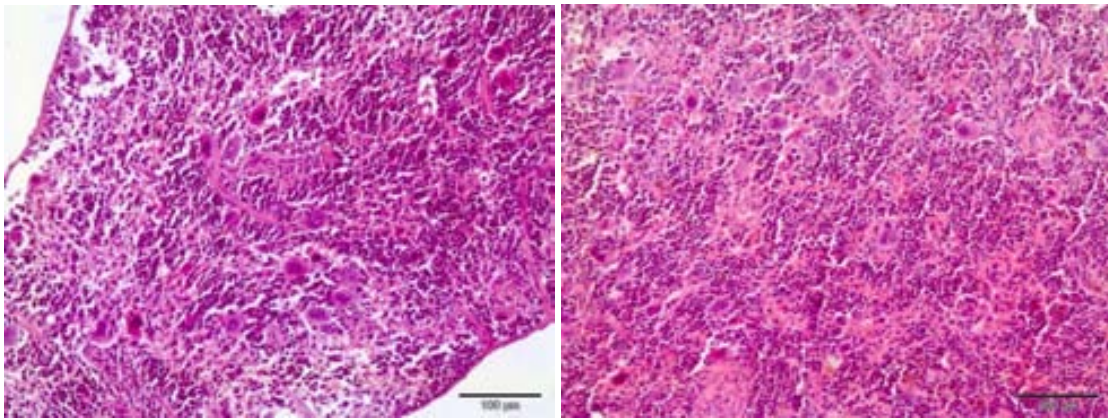
Amb l'objectiu d'avaluar la seguretat dels productes cel·lulars transposos, al llarg de tot l'estudi s'ha dut a terme un seguiment veterinari de la salut dels animals trasplantats en base a una inspecció visual d'aspectes com el comportament (estereotípies) i l'estat del pelatge, entre d'altres. En aquests seguiments no s'han observat complicacions clíniques associades al trasplantament en cap dels animals d'estudi, obtenint unes taxes de supervivència del 96,6%, 100% i 93,3% pels ratolins trasplantats amb el Producte A, Producte B i CD34<sup>+</sup> no expandides, respectivament.

De forma complementària, a les 8 setmanes post-trasplantament s'ha realitzat una necròpsia completa de tres animals de cadascun dels grups d'estudi. A partir d'aquí, s'ha dut a terme un estudi tant macroscòpic com microscòpic dels següents òrgans: intestí prim i gruixut, pàncrees, fetge, melsa, ronyó, úter, pulmons, cor i encèfal. L'examen histològic de la melsa evidencia una severa depleció de les cèl·lules limfoides (absència de fol·licles limfoides), una troballa que es fa evident tant en els ratolins trasplantats amb els productes d'estudi A i B, amb les CD34<sup>+</sup> no expandides, així com en un ratolí tractat únicament amb solució salina. De fet, aquest canvi en l'arquitectura de la melsa és característica de la soca dels ratolins utilitzats en aquest estudi, NOD-*Scid* *IL2Rγ<sup>null</sup>* (Shultz et al., 2005), de manera que en cap cas es pot atribuir al tractament al qual se'ls ha sotmès (Figura 5.9).

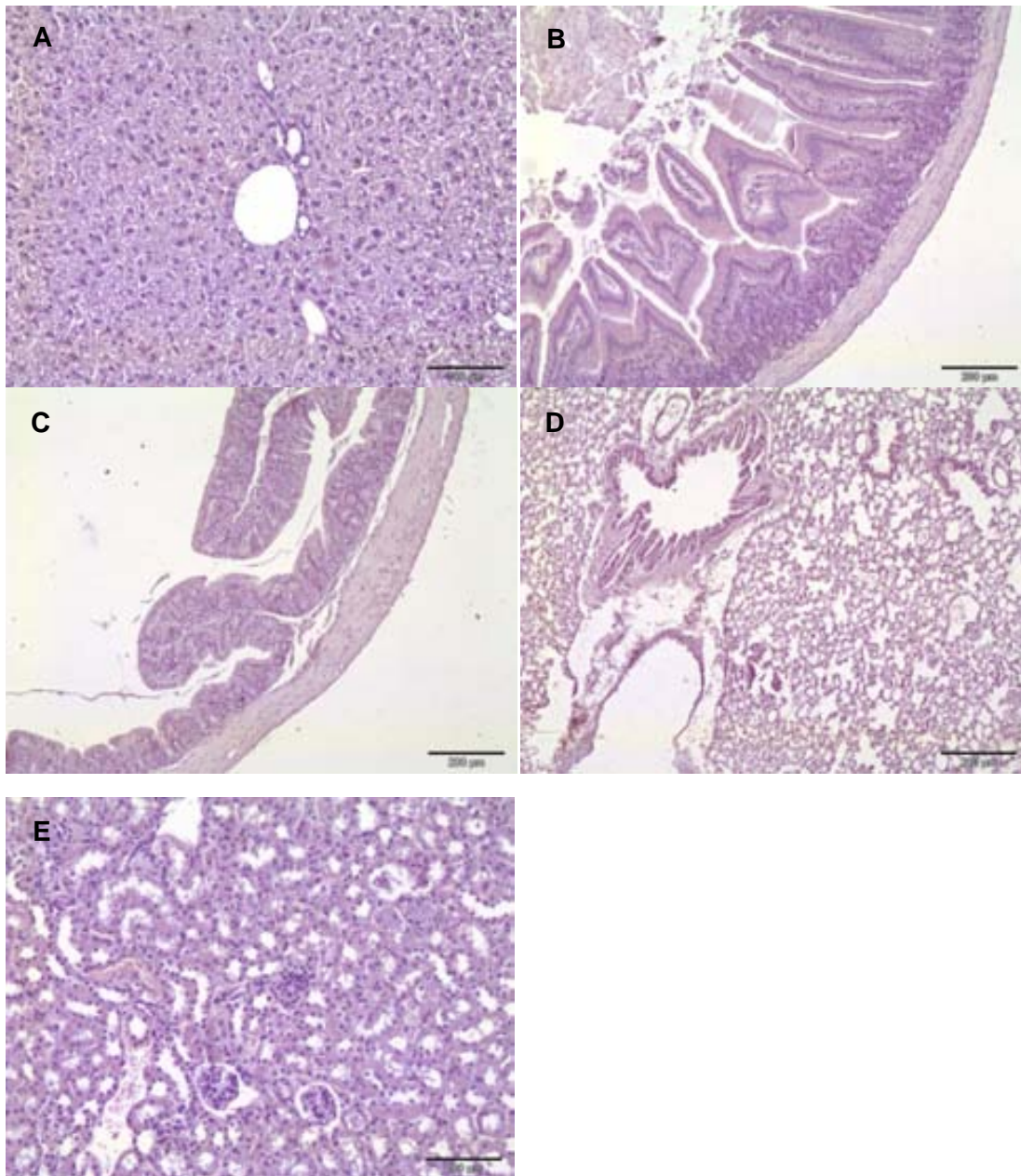
A banda d'aquesta observació, l'estudi histològic revela l'absència de qualsevol anomalia o formació de teixit ectòpic en cap dels ratolins avaluats.

Finalment, i amb l'objectiu d'obtenir dades de biodistribució de les cèl·lules trasplantades pels diferents òrgans, s'ha realitzat una tinció específica de mitocondris

humans mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica (IHQ). Els resultats obtinguts no mostren tinció positiva en cap dels òrgans murins estudiats, de manera que aquests resultats semblen indicar l'absència de cèl·lules humanes en qualsevol dels teixits avaluats (Figura 5.10).



**Figura 5.9:** Talls histològics tenyits amb hematoxilina-eosina corresponents a la melsa. La melsa de tots els ratolins estudiats presenta la morfologia típica del model animal utilitzat: absència de fol·licles limfoides. En cap dels teixits estudiats, i independentment del tractament rebut, no s'observa cap anomalia ni formació de teixit ectòpic.



**Figura 5.10:** Tinció mitjançant la tècnica IHQ de mitocondris humans en els òrgans dels ratolins trasplantats. En cap cas s'observa la presència de cèl·lules humanes en base a la tinció específica mitocondrial dels diferents òrgans. **A:** fetge; **B:** intestí prim; **C:** intestí gruixut; **D:** pulmó; **E:** ronyó.



## 5.3 DISCUSSIÓ

---

El cultiu de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU en un medi lliure de sèrum complementat amb una combinació de citoquines inductores de l'expansió i la diferenciació a llinatge granulocític (SCF, IL3 i G-CSF), permet obtenir dos productes cel·lulars en diferent estat de maduració en funció de la durada del mateix, tal com ha evidenciat l'estudi fenotípic i clonogènic realitzat en els capítols anteriors.

Amb la intenció d'aprofundir en les característiques funcionals d'aquestes cèl·lules i determinar en quin punt del cultiu es troba la composició cel·lular idònia per a la generació del producte de teràpia cel·lular orientat a la reducció dels períodes d'aplàsia, en el present capítol s'ha realitzat la caracterització funcional *in vivo* dels dos productes cel·lulars en base a la seva capacitat d'empelt i repoblació de ratolins NOD-*scid* *IL2γ<sup>null</sup>*. Aquest tipus de xenotrasplantaments són els assajos subrogats més àmpliament utilitzats per a la caracterització funcional de les CMH humanes (Araki et al., 2006, Mazurier et al., 2004).

Els resultats obtinguts mostren que el grau de maduració del producte cel·lular transfós juga un paper determinant en l'activitat repobladora a llarg termini. Així, tal com mostren els nivells de quimerisme obtinguts en moll d'os a les 8 setmanes posteriors al trasplantament, el Producte B presenta una activitat repobladora a llarg termini considerablement menor respecte les CD34<sup>+</sup> de SCU fresques. Aquest fet suggereix que una prolongada exposició a citoquines inductores de la diferenciació granulocítica i, en conseqüència, un major factor d'expansió, provoca una depleció parcial de les cèl·lules amb activitat repobladora a llarg termini (LT-SRC), tal com han descrit d'altres

autors amb anterioritat (McNiece et al., 2002). En canvi, quan el cultiu té una durada únicament de 6 dies (Producte A) i, en conseqüència, el factor d'expansió cel·lular és menor, l'activitat repobladora a llarg termini és molt similar a la de les CD34<sup>+</sup> fresques de SCU.

Aquests resultats obtinguts no estan en concordança amb el fenotip de la població CD34<sup>+</sup> de cadascuna de les fraccions cel·lulars trasplantades, ja que, tot i presentar diferències pel què fa a la seva activitat repobladora a llarg termini, el patró d'expressió dels marcadors considerats propis de les CMH més immadures (CD133<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup>) es manté molt similar. Aquest fet ja ha estat descrit per diversos autors en que a partir d'estudis clonals han conclòs que en les cèl·lules expandides es produeix una dissociació entre el fenotip i la funcionalitat, que en canvi és aplicable a les cèl·lules no manipulades (Danet et al., 2001, Dorrell et al., 2000).

Pel què fa a l'activitat repobladora a curt termini, identificada a partir de l'estudi del grau de quimerisme a les dues setmanes posteriors al trasplantament, no s'han observat diferències significatives entre els ratolins tractats amb els Productes A o B i els tractats amb les CD34<sup>+</sup> de SCU sense manipular. No obstant aquesta uniformitat, convé posar especial atenció als resultats obtinguts durant la primera setmana posterior al trasplantament ja que en aquest cas, sí que es posen de manifest diferències rellevants segons el producte trasplantat. Així, el 83,3% dels ratolins receptors del Producte B presenten cèl·lules humanes en el torrent sanguini, front el 0% dels ratolins receptors de les CD34<sup>+</sup> no expandides. Es considera que aquesta diferència, observada únicament durant la primera setmana en la sang perifèrica, i que no és observable en el moll d'os, pugui venir donada pels precursors neutrofilics més

madurs presents en el Producte B, que en molt poc temps hagin estat capaços de madurar i passar al torrent sanguini en forma de cèl·lula terminalment madura (Shpall et al., 2002, Vanheusden et al., 2007). Aquesta dada és especialment rellevant tenint en compte que el producte de teràpia cel·lular a desenvolupar ha de ser capaç de generar nivells adequats de neutròfils madurs en sang, reduint per tant el període d'aplàsia.

Així doncs, en concordança al que s'ha descrit en d'altres treballs (Delaney et al., 2010, Piacibello et al., 1999), les condicions de cultiu assajades propicien una expansió dels progenitors amb activitat repobladora a curt termini (rSRC). A més, els precursors neutrofílics que acompanyen les rSRC sembla que tinguin un paper destacat en les etapes més primàries de la repoblació.

De forma complementària a l'estudi del grau de quimerisme, a partir de la utilització d'una bateria d'anticossos representatius dels diferents tipus cel·lulars sanguinis, s'ha determinat el llinatge de les cèl·lules humanes aparegudes tant en moll d'os com en sang perifèrica. Els resultats obtinguts mostren que, independentment del producte cel·lular transfós, el llinatge majoritari a les 2 setmanes posteriors al trasplantament és el mieloide. En canvi, a les 8 setmanes post-trasplantament, i en qualsevol dels tres productes d'estudi, el percentatge de cèl·lules humanes en moll d'os que coexpressi algun dels marcadors de les subpoblacions estudiades és molt reduït. L'explicació d'aquests resultats podria trobar-se en el fet que la població cel·lular majoritària a llarg termini en ratolins trasplantats amb CD34<sup>+</sup> de SCU correspongui al llinatge limfocític B, tal com han determinat d'altres autors (Hogan et al., 2002), població sobre la qual no s'ha realitzat cap determinació fenotípica en aquest treball.

Finalment, tant el seguiment veterinari realitzat al llarg de l'experiment com les necròpsies finals realitzades, han permès concloure que els productes cel·lulars generats *in vitro* no tenen efectes potencialment tòxics, evidenciant, per tant, la seva seguretat a nivell preclínic. L'obtenció d'aquestes dades és especialment rellevant en el context del desenvolupament d'un producte de teràpia avançada, en el qual, els estudis preclínic en model animal són imprescindibles pel plantejament d'una eventual aplicació clínica (Sharpe et al., 2012).

Per tant, en conclusió, modulant l'estat maduratiu dels productes cel·lulars a partir de la durada del cultiu, es poden obtenir poblacions cel·lulars amb diferent activitat repobladora, deixant en evidència la composició oligoclona de la població CD34<sup>+</sup>. A partir d'aquestes dades, i tenint en compte que l'objectiu de la teràpia desenvolupada és la repoblació a curt termini (reducció dels períodes d'aplàsia), es decideix escollir el Producte B com a producte cel·lular per a continuar el treball de desenvolupament. Aquesta elecció es justifica bàsicament per tres aspectes: en primer lloc, la viabilitat operacional en termes de productivitat cel·lular ja que amb 14 dies de cultiu, la dosi cel·lular que es pot obtenir és significativament superior que la que s'obtidria si el cultiu s'aturés als 6 dies. En segon lloc, s'ha donat especial rellevància al fet que el potencial clonogènic del Producte B s'hagi expandit i dirigit a llinatge granulocític ja que diversos estudis han conclòs que existeix una correlació positiva entre la disminució del temps d'aplàsia i la dosi de CFU-GM infosa (Carral et al., 2002, Kozłowska-Skrzypczak et al., 2009). I, per últim, la limitada activitat repobladora a llarg termini que presenta el Producte B pot afavorir que no es doni una competència entre aquest producte i la SCU sense expandir, ja que en una teràpia combinada és

d'aquesta última fracció de la que s'espera que es produeixi el repoblament a llarg termini del sistema hematopoètic del pacient.

Per tant, el proper capítol es planteja amb l'objectiu de redissenyar l'estratègia de cultiu per tal d'augmentar la productivitat cel·lular del Producte B i reduir així tant els costos com la dificultat operacional del procés.



# 6

Definició del bioprocés per a  
l'obtenció de dosis cel·lulars  
clínicament significatives

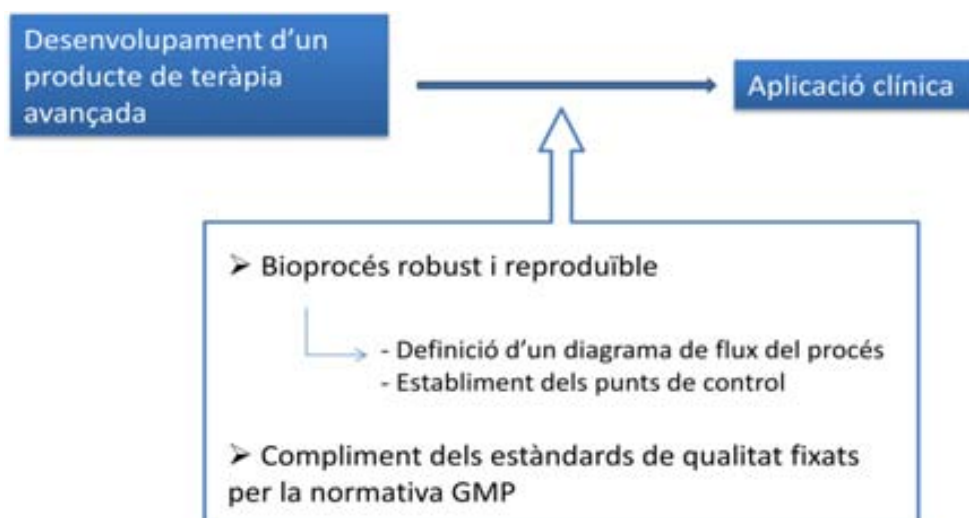




## 6.1. INTRODUCCIÓ

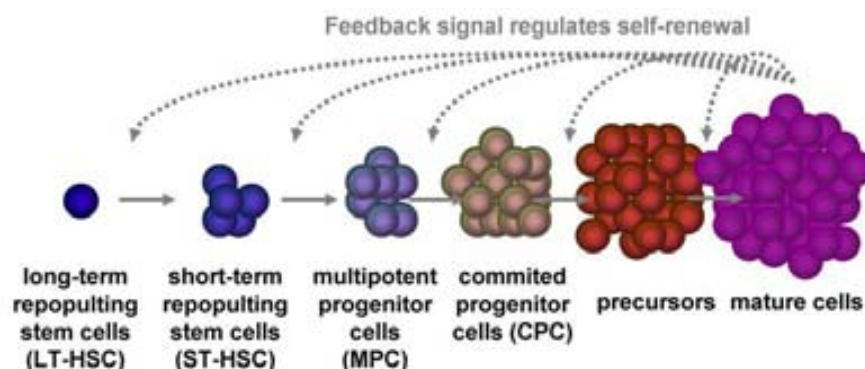
Els estudis funcionals descrits en els capítols anteriors semblen suggerir que el producte obtingut té unes característiques que el fan atractiu per a ser avaluat en estudis clínics com a tractament per a l'aplàsia mieloide. Arribats a aquest punt, i tal com es mostra en la Figura 6.1., el següent pas en el desenvolupament d'un producte de Teràpia Cel·lular Avançada consisteix en efectuar el disseny d'un bioprocés que permeti assolir dosis cel·lulars rellevants des d'un punt de vista clínic, complint els estàndards de qualitat fixats per la normativa GMP (*Good Manufacturing Practice*), per tal de fer possible la seva eventual aplicació terapèutica.

És per aquest motiu que el present capítol es planteja amb l'objectiu de redissenyar l'estratègia de cultiu descrita en el Capítol 3 per tal de realitzar l'escalat del procés de forma operacional i econòmicament viable, de manera que es puguin obtenir les dosis requerides. Addicionalment, es fa una proposta de diagrama de flux del bioprocés, establint els punts de control que permetin assegurar la qualitat del producte cel·lular.



**Figura 6.1:** Requeriments en termes de fabricació d'un producte de Teràpia Cel·lular Avançada per a la seva aplicació clínica.

La fita que es persegueix en el disseny d'aquest bioprocés és la generació d'un sistema de cultiu robust i altament reproduïble (Csaszar et al., 2012a), i inevitablement això passa per conèixer el sistema i entendre'n el seu funcionament (Zandstra and Nagy, 2001). En base a aquesta premissa, el disseny d'un bioprocés basat en el cultiu *in vitro* de CMH/CPH resulta complicat, doncs aquests cultius d'expansió es caracteritzen per ser sistemes de composició heterogènia i altament dinàmica (Csaszar et al., 2012b, Kirouac and Zandstra, 2006). A mesura que el cultiu progressa, la composició de les diferents poblacions cel·lulars canvia de forma significativa, fet que promou una acumulació de les cèl·lules madures generades i, en conseqüència la generació d'un microambient de senyals cel·lulars canviant (Kirouac and Zandstra, 2006). Tal com es mostra a la Figura 6.2., ha estat demostrat en múltiples treballs que els factors secretats per les cèl·lules madures produïdes al llarg del cultiu actuen inhibint la proliferació de les CMH/CPH (Gilmore et al., 2000, Madlambayan et al., 2005, Xu et al., 2000), i és precisament en aquest punt on recau la dificultat principal d'aquest tipus de cultius: evitar la inhibició/maduració de les CMH/CPH causada per aquests factors per tal de promoure'n la seva expansió.



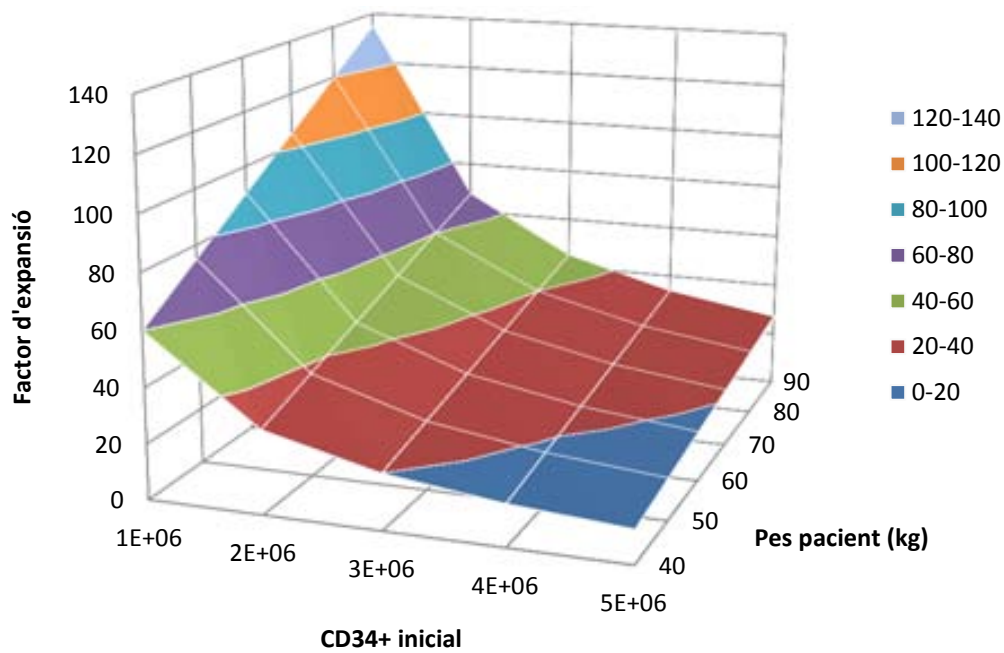
**Figura 6.2:** Esquema del mecanisme d'inhibició de les CMH/CPH en cultiu *in vitro* a partir dels factors secretats per les cèl·lules madures produïdes al llarg del cultiu (Marciniak-Czochra et al., 2009).

Hi ha diversos treballs centrats en desxifrar quins són aquests senyals inhibitoris que governen els cultius per tal de poder aproximar una millor estratègia d'expansió (Bonnet et al., 1995, Broxmeyer et al., 1995, Cashman et al., 1998, Fortunel et al., 2000b, Madlambayan et al., 2005, Zhang et al., 1995). A partir d'aquest coneixement, s'han assajat diverses metodologies, com ara l'enriquiment de les CMH/CPH durant el transcurs del cultiu (Madlambayan et al., 2005), o el bloqueig d'alguns dels factors inhibitoris. No obstant, la metodologia més senzilla operacionalment per tal d'evitar el bloqueig de la capacitat duplicativa de les CMH/CPH és la dilució del cultiu amb medi fresc (Madlambayan et al., 2005). Seguint aquesta estratègia, a banda de diluir tots els possibles factors inhibitoris i aportar nous nutrients i factors de creixement al medi, el fet d'incrementar el volum també permet reduir la densitat cel·lular de treball, evitant per tant l'assoliment de concentracions cel·lulars inhibidores (Csaszar et al., 2012b). És per aquest motiu que l'estratègia de cultiu desenvolupada en aquest capítol es basa en aquest principi: dilucions periòdiques amb medi fresc, com ja s'ha avançat al Capítol 3.

Com a punt de partida, i abans d'iniciar el disseny del bioprocés, cal determinar quina és la dosis cel·lular a produir, doncs aquesta dada condicionarà el dimensionat del procés productiu. En aquest sentit, està àmpliament acceptat que a major dosi cel·lular trasplantada, menors són els períodes d'aplàsia que pateixen els pacients. Tot i que aquest fet ha estat repetidament demostrat en l'àmbit del trasplantament de CMH/CPH de fonts cel·lulars adultes (SPM i MO) (Carral et al., 2002, Heimfeld, 2003a, Nakamura et al., 2008, Weaver et al., 1995), pocs són els precedents en el context del trasplantament de SCU en els quals s'hagin assolit dosis cel·lulars suficientment elevades. D'ells destaquen el treball de Colleen Delaney (Delaney et al., 2010) i, més

recentment, el de Marcos De Lima (De Lima et al., 2012), en els quals, mitjançant l'expansió *in vitro* de SCU, s'han aconseguit trasplantar dosis compreses entre  $0,93-13 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg i  $1,6-9,34 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg, respectivament. Així doncs, prenent com a referència aquests valors, es postula que el bioprocés generat en el present capítol hauria de ser capaç d'assolir dosis cel·lulars de com a mínim  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg.

Un aspecte crític en l'obtenció de la dosi desitjada és la quantitat inicial de cèl·lules CD34<sup>+</sup> presents en una unitat de SCU fresca. Segons l'històric de dades del Banc de Cordó (Banc de Sang i Teixits – BST, Barcelona), la mitjana cel·lular de les unitats processades és d'aproximadament  $6 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> totals. A aquest valor se li ha d'aplicar el rendiment de les etapes de purificació prèvies a l'inici del cultiu, que és d'aproximadament el 50%. Així doncs, la quantitat inicial de cèl·lules de les que es disposarà en aquest treball per a l'obtenció de dosis clínicament significatives a partir d'un cultiu d'expansió és de  $3 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> aproximadament. També cal contemplar les pèrdues cel·lulars que es produiran en les etapes de rentat, acondicionat i de control de qualitat del producte una vegada finalitzada l'expansió. En aquest cas en particular, en base a l'experiència acumulada en la fabricació de productes de Teràpia Cel·lular, es determina que cal produir un 50% més de la dosi clínica estipulada per tal de garantir-ne la seva obtenció. Així doncs, a partir de tots aquests condicionants, i tenint en compte un pes mig de pacient d'entre 50-80 Kg, es calcula que el bioprocés desenvolupat hauria de ser capaç d'assolir uns factors d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> d'entre 25 i 40 vegades (Figura 6.3).



**Figura 6.3:** Factor d'expansió que ha d'assolir la població CD34<sup>+</sup> per a generar una dosi clínica d' $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg pacient, en funció de la disponibilitat inicial de cèl·lules CD34<sup>+</sup> en la unitat de SCU.

En resum, l'objectiu d'aquest capítol se centra en definir una estratègia de cultiu escalable, controlable i que operi en condicions GMP, que permeti assolir dosis cel·lulars de com a mínim  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg. A més, es pretén establir el diagrama de flux que englobi la totalitat del bioprocés, definint les etapes crítiques i els punts de control orientats a garantir la qualitat del producte obtingut. D'aquesta manera es persegueix fer possible la transferència del producte de Teràpia Cel·lular Avançada cap a una eventual aplicació terapèutica.

## 6.2. RESULTATS

---

### 6.2.1 La metodologia de cultiu: avaluació de la seva viabilitat per a la generació de dosis clíniques

En primer lloc, i amb l'objectiu de generar un sistema de cultiu que permeti obtenir les dosis clíniques d'interès, es planteja la possibilitat de dur a terme l'escalat de la metodologia de cultiu utilitzada durant el transcurs de tot aquest treball experimental. Aquesta estratègia, definida en el Capítol 3, ha consistit en realitzar dilucions periòdiques dels factors inhibitoris acumulats al llarg del cultiu durant un total de 14 dies, i ha estat assajada partint de dos inòculs diferents:  $1 \times 10^4$  CD34+/mL i  $1 \times 10^5$  CD34+/mL. Per tal d'avaluar-ne la seva possible integració en un bioprocés orientat a l'obtenció de dosis clínicament significatives, s'han comparat els factors d'expansió assolits per a cadascun dels inòculs (dades extretes del Capítol 3), amb aquells definits com a òptims per a l'obtenció de les dosis clíniques. Paral·lelament, s'ha realitzat una aproximació numèrica del volum amb el qual finalitzarien els cultius en les produccions clíniques, prenent com a quantitat de cèl·lules CD34+ de partida  $3 \times 10^6$  (valor prèviament calculat a partir de la cel·lularitat mitja de les unitats de SCU del Banc de Cordó i de les pèrdues associades al procés de purificació (Taula 6.1).

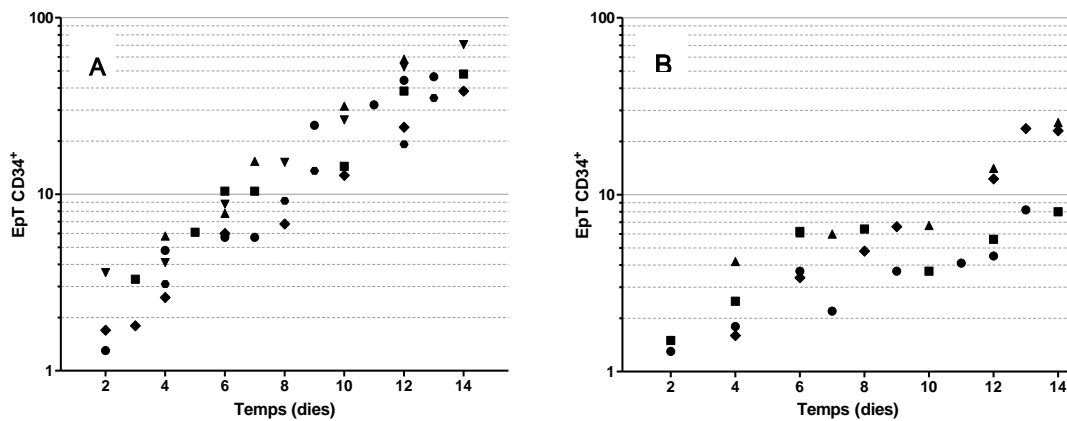
	1x10 <sup>4</sup> CD34 <sup>+</sup> /mL	1x10 <sup>5</sup> CD34 <sup>+</sup> /mL
<b>Estratègia de cultiu</b>	Dilució 1:1 cada 2 dies a partir del dia 4, i fins a dia 14	
<b>Ep CD34<sup>+</sup></b>	61,4 ± 31,1	18,9 ± 9,5
<b>Volum final teòric</b>	≈ 10 L	≈ 1 L

**Taula 6.1:** Detall dels factors d'expansió i de l'aproximació volumètrica per a cadascun dels inòculs seguint l'estratègia de cultiu definida en el Capítol 3. Les dades dels factors d'expansió provenen dels resultats obtinguts en el Capítol 3. El volum és una aproximació numèrica a partir de la quantitat de cèl·lules CD34<sup>+</sup> de partida (3x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>).

Tal com s'observa a la Taula 6.1 els cultius iniciats a un inòcul d'1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL assolixen un factor d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> de 61,4 ± 31,1 vegades (N=5) (Figura 6.4.A). Tenint en compte que el factor d'expansió calculat com a òptim per a l'obtenció de les dosis clíniques d'interès se situa entre les 25 i les 40 vegades, sembla evident que seguint aquesta estratègia de cultiu seria possible assolir les dosis terapèutiques desitjades. No obstant, com a conseqüència de la reduïda densitat cel·lular de sembra, i tenint en compte que seguint l'estratègia d'addicions dissenyada el volum de cultiu augmenta de forma exponencial, si el cultiu s'iniciés amb 3x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> totals, aquest finalitzaria amb un volum de l'ordre de 10 litres. En base a aquest condicionant, aquesta estratègia no es considera viable, doncs treballar amb volums de cultiu d'aquesta magnitud suposaria un cost molt elevat de procés.

En contrast, iniciant el cultiu a un inòcul d'1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL, el volum final se situaria en torn d'1 litre. No obstant, els resultats obtinguts en els cultius iniciats a aquest inòcul són poc reproduïbles (Figura 6.4.B), a la vegada que les taxes d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> són molt reduïdes, de 18,9 ± 9,5 vegades, fet que impossibilita en qualsevol cas l'obtenció de les dosis cel·lulars anteriorment calculades.

Per tant, en base a aquests resultats, es conclou que no es disposa d'una estratègia de cultiu escalable per a l'obtenció de dosis clíniques. És per aquest motiu que es planteja la redefinició de les metodologies d'expansió amb l'objectiu de dissenyar un bioprocés que permeti obtenir les dosis cel·lulars d'interès de forma robusta i reproducible, treballant amb volums de cultiu econòmic i operacionalment suportables.



**Figura 6.4.** Representació dels factors d'expansió assolits per la població CD34<sup>+</sup> en els cultius iniciats a 1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL (A), i en els iniciats a 1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL (B) seguint l'estratègia d'addicions consistent en una primera dilució amb el mateix volum de medi fresc el quart dia de cultiu i, posteriorment, una dilució cada dos dies fins a la seva finalització.

### 6.2.2. Disseny d'una estratègia de cultiu adaptada

La generació d'una metodologia de cultiu que permeti obtenir un factor d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> de 25-40 vegades operant amb un volum de cultiu econòmicament competitiu, passa per l'optimització de les estratègies de cultiu anteriorment mencionades. A tal efecte, s'ha seguit un esquema experimental consistent en modificar dues variables: la temporalització de les addicions i/o la taxa de dilució aplicada. En aquest sentit, es contempen les següents opcions pels cultius iniciats a 1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL i 1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL:



Inòcul	Taxa d'addicions	Periodicitat de les addicions	Durada cultiu	Volum final teòric (mL)
$1 \times 10^4$ CD34 <sup>+</sup> /mL	1:1	Cada 2 dies a partir del dia 5	13 dies	4800
$1 \times 10^5$ CD34 <sup>+</sup> /mL	1:1,5	Cada 2 dies a partir del dia 4	14 dies	2930
	1:0,75	Dilució 1:1,5 a dia 4 i, posteriorment dilució 1:0,75 diària	14 dies	11545

**Taula 6.2:** Condicions experimentals assajades per tal d'ajustar una estratègia d'expansió que permeti obtenir dosis cel·lulars clínicament significatives. Les variables testades són la temporalització de les addicions i/o la taxa de dilució aplicada.

Amb aquestes noves aproximacions es pretenen resoldre les limitacions anteriorment descrites que suposen treballar amb cadascun dels inòculs. Per una banda, tot i assolir el factor d'expansió desitjat, l'inconvenient principal dels cultius iniciats a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL és l'elevat volum de treball amb el que finalitzaria l'expansió. En base a aquesta problemàtica i tenint en compte que el factor d'expansió mig assolit amb els cultius iniciats a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL supera el mínim necessari per a assegurar les dosis terapèutiques d'interès, es planteja la supressió de l'última addició de medi, que és precisament la que suposa una major despesa. D'aquesta manera, en comptes de les 5 addicions de medi fresc realitzades fins al moment, se'n realitzarien 4. Aquest canvi suposaria escurçar en dos dies el cultiu, reduint per tant el temps disponible per a que les cèl·lules CD34<sup>+</sup> assoleixin les duplicacions esperades. Així, per tal de minimitzar l'impacte que pugui tenir aquesta reducció en el factor d'expansió de la població CD34<sup>+</sup>, es planteja realitzar la primera addició de medi fresc preferentment un dia posterior, de manera que, en la mesura del possible però sense limitar-se a això, es

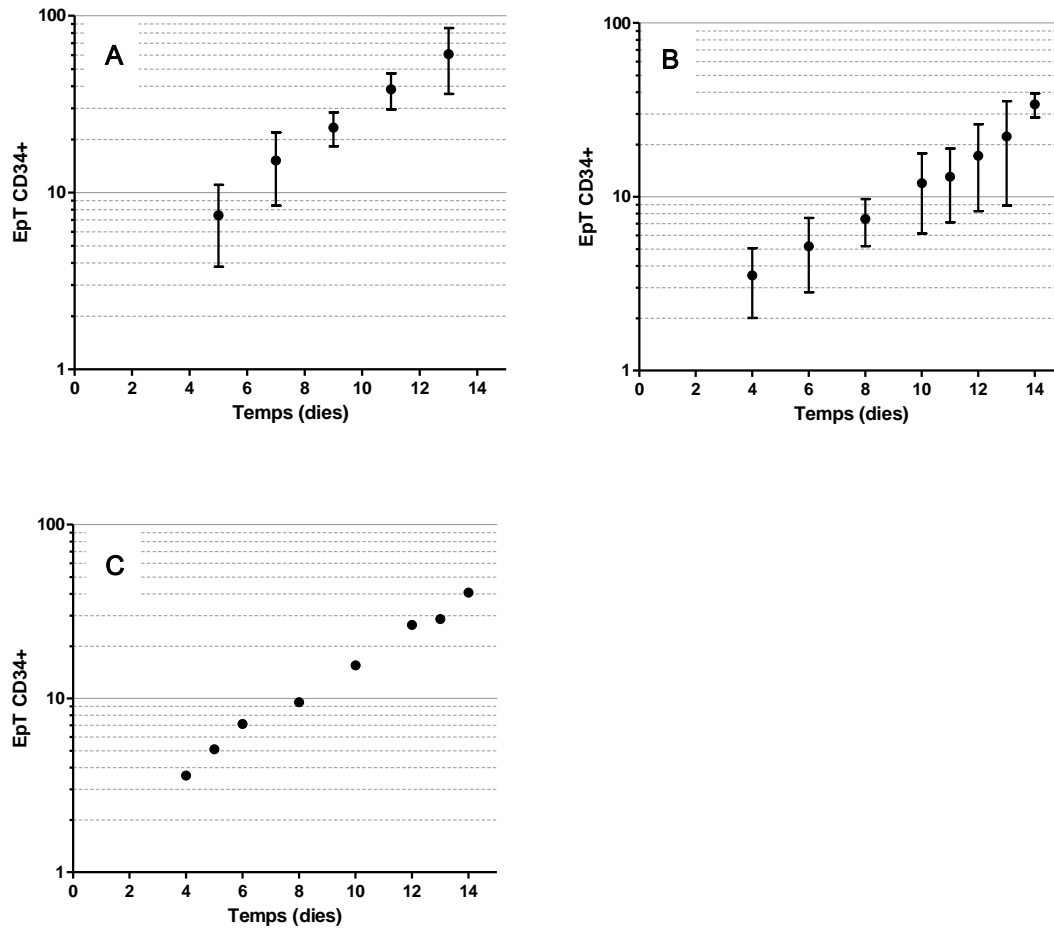
realitzi el dia 5 de cultiu, en comptes del dia 4 i que per tant, el cultiu tingui una durada final de 13 dies.

Per la seva banda, la limitació que es presenta en els cultius iniciats a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL és la inhibició en la capacitat proliferativa de les CMH/CPH, fet que impossibilita l'assoliment dels factors d'expansió necessaris per a l'obtenció de dosis clíniques. Tal com s'ha discutit en el Capítol 3, aquest fet pot ser producte de l'acumulació de subproductes del metabolisme, de senyals inhibidores secretades per les poblacions més madures, o bé d'una suma dels dos factors, fenòmens derivats de les elevades concentracions cel·lulars en el cultiu (Csaszar et al., 2012b, Kirouac and Zandstra, 2006, Madlambayan et al., 2005), els quals no queden suficientment neutralitzats amb les dilucions realitzades. És per aquest motiu que, per tal d'evitar aquests fenòmens inhibitoris, es planteja modificar la pauta d'addicions de medi fresc seguint l'esquema que s'especifica en la Taula 6.2.

Amb l'objectiu de posar a la pràctica aquestes noves metodologies de cultiu descrites i avaluar-ne la seva efectivitat en l'assoliment dels factors d'expansió necessaris per a l'obtenció de les dosis clíniques, es duen a terme una sèrie de cultius a petita escala (volum màxim de 100 mL).

Els cultius s'inicien a partir de cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU fresca a una puresa inicial de  $60,4 \pm 11,6\%$  i a un inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL o d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL segons convingui. El medi de cultiu emprat és un medi químicament definit lliure de sèrum complementat amb les citoquines SCF, IL-3 i G-CSF (8.2.1). Els cultius es mantenen a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, aplicant l'estratègia d'addicions corresponent (Taula 6.2). Periòdicament, i mitjançant la plataforma citomètrica ISHAGE, es realitza un seguiment de la densitat

cel·lular, tant per la població de CNT com per la de cèl·lules CD34<sup>+</sup>. A partir dels valors obtinguts, es calculen els factors d'expansió tant de la població CD34<sup>+</sup> com de les CNT.



**Figura 6.5.** Evolució del factor d'expansió assolit en la població CD34<sup>+</sup> aplicant cadascuna de les estratègies d'estudi. **A:** Cultius de 13 dies de durada iniciats a un inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, en els quals es segueix una estratègia de dilucions 1:1 a partir del dia 5 de cultiu i posteriorment cada 2 dies (N=4) **B:** Cultius de 14 dies de durada iniciats a un inòcul d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL sotmesos a una estratègia de dilucions amb medi fresc de 1:1,5 a partir del dia 4 i posteriorment cada dos dies (N=6). **C:** Cultius de 14 dies de durada iniciats a un inòcul d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL sotmesos a una estratègia de dilucions amb medi fresc de 1:1,5 a dia 4 i posteriorment dilucions de 1:0,75 de forma diària (N=1).

Tal com s'observa a la Figura 6.5 els resultats obtinguts mostren que les tres estratègies de cultiu permeten expandir la població CD34<sup>+</sup> de forma constant fins a la finalització del cultiu. Més específicament, els cultius iniciats a un inòcul d' $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmesos a una estratègia d'addicions 1:1,5 cada dos dies o 1:0,75 diària, presenten uns factors d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> de  $34 \pm 5,4$  i de  $40,6$  vegades, respectivament. Aquests valors contrasten amb els obtinguts en el Capítol 3 en els cultius iniciats a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL (Figura 6.4.B), en els quals, mitjançant una taxa d'addicions 1:1, l'expansió de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> era només de  $18,9 \pm 9,5$  vegades. Per tant, és evident que ampliant la taxa d'addicions aplicades, la capacitat duplicativa de la població CD34<sup>+</sup> es veu afavorida, suposadament com a conseqüència de la dilució de factors potencialment inhibitoris.

Pel què fa al cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a una estratègia d'addicions 1:1 cada dos dies a partir del dia 5 i fins a la seva finalització a dia 13, la població CD34<sup>+</sup> assoleix un factor d'expansió de  $60,8 \pm 24,6$  convertint-se, per tant, en l'estratègia que millor afavoreix la capacitat duplicativa dels progenitors hematopoètics. Així doncs, tot i reduir un dia la durada total del cultiu, el factor d'expansió assolit permetria obtenir les dosis clíniques anteriorment calculades.

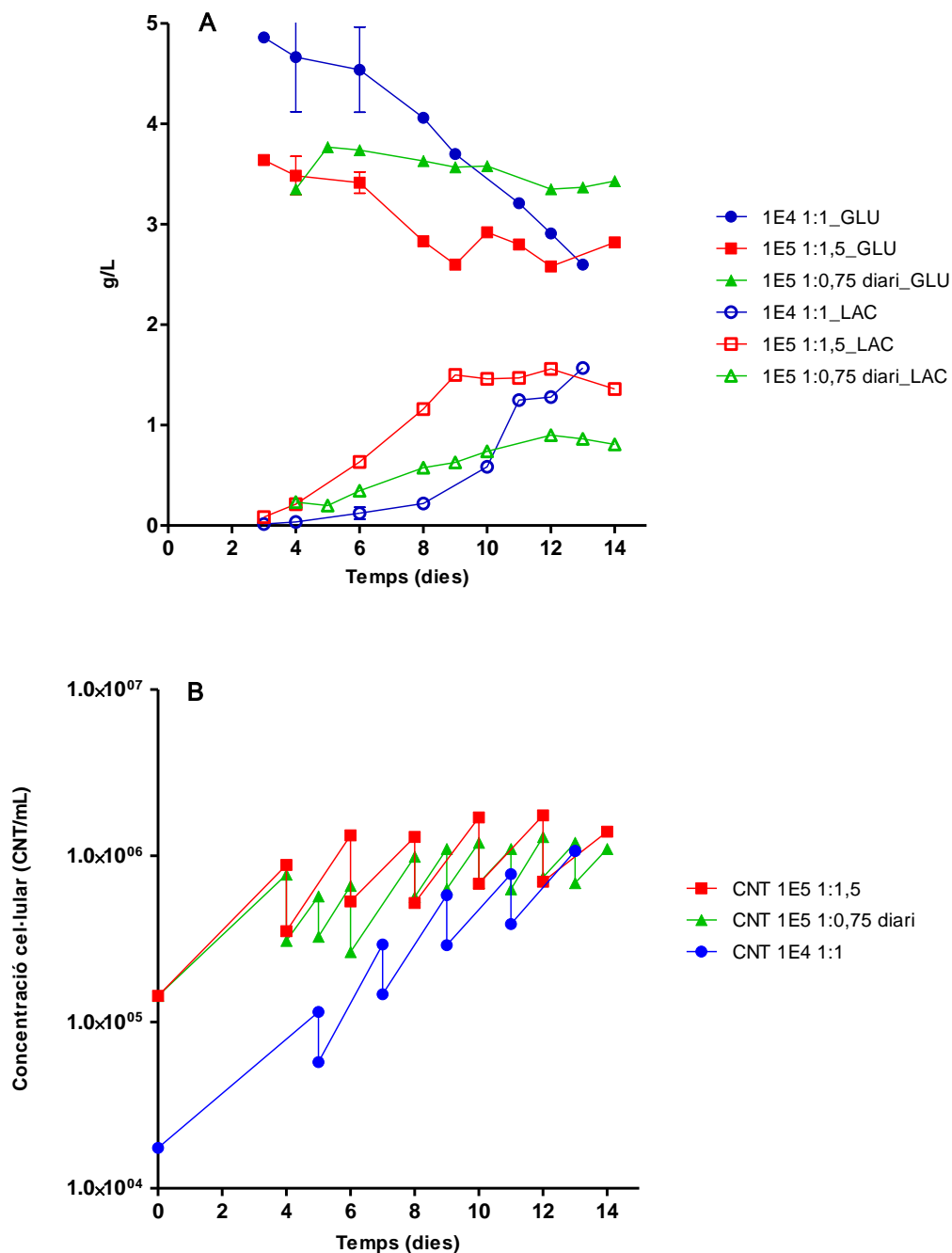
De forma paral·lela al seguiment de la concentració cel·lular al llarg dels cultius i amb l'objectiu de tenir un indicador del seu metabolisme, es prenen mesures de la concentració de glucosa i lactat a diferents punts del cultiu. La glucosa és la principal font de carboni per a les rutes biosintètiques i per a l'obtenció d'energia cel·lular (Cooper et al., 2002), i el lactat és un subproducte del metabolisme de la glucosa, l'acumulació del qual té un impacte negatiu sobre la capacitat proliferativa de les

cèl·lules en cultiu (Ozturk and Hu, 2005). És per aquest motiu que l'estudi d'aquests dos metabòlits, juntament amb l'evolució de la densitat cel·lular al llarg del cultiu, permet correlacionar el creixement cel·lular amb el metabolisme, podent mesurar d'aquesta manera l'impacte que tenen les dilucions de medi fresc sobre la composició del medi i, per extensió, sobre la capacitat d'expansió cel·lular.

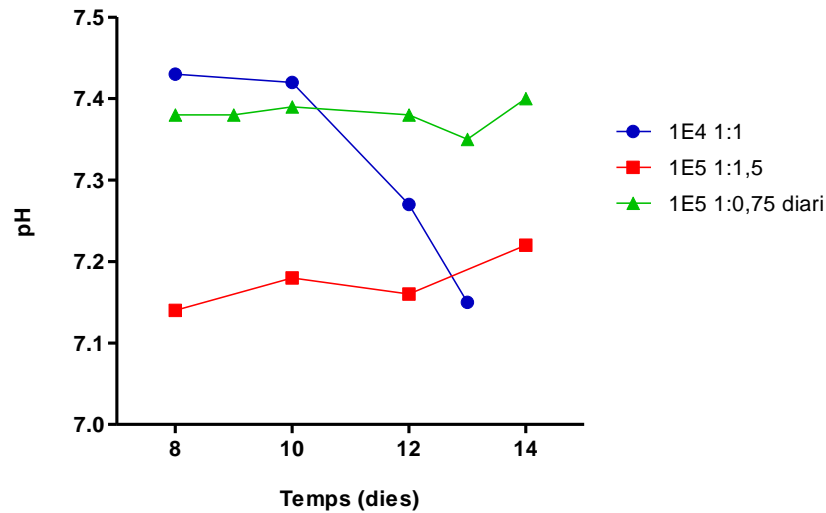
Tal com s'observa a la Figura 6.6.A, els resultats obtinguts mostren que el cultiu que presenta uns nivells més reduïts de glucosa, i en conseqüència, una concentració de lactat més elevada és el cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a un taxa de dilucions de 1:1,5. Aquests resultats estan en concordança amb el fet que aquest cultiu és el que presenta unes densitats cel·lulars més elevades al llarg de tot el procés d'expansió (Figura 6.6.B). Contràriament, el cultiu al qual se li aplica una dilució amb medi fresc diària (1:0,75), mostra una lleugera disminució dels nivells de glucosa al llarg del cultiu, a la vegada que s'observa un lleuger increment en la concentració de lactat. Per últim, el cultiu iniciat a un inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL experimenta una davallada progressiva en la concentració de glucosa, a la vegada que la concentració de lactat també augmenta de forma gradual, fet que correlaciona amb les elevades concentracions cel·lulars observades durant la segona meitat del cultiu (Figura 6.6.B).

Tenint en compte que l'efecte inhibitori de l'acumulació de lactat ve donat per l'acidificació del medi (Hassell et al., 1991, Ozturk and Hu, 2005, Patel et al., 2000), a continuació es duu a terme un seguiment en les variacions de pH en el medi a partir del vuitè dia de cultiu (Figura 6.7). S'escull aquest dia d'inici ja que és el moment en el qual es fan més evidents les diferències colorimètriques de l'indicador de pH del medi

i, tenint en compte els reduïts volums de cultiu, es considera analitzar únicament els dies més significatius.



**Figura 6.6.** Representació de l'evolució en la concentració de glucosa i lactat (**A**) i de la concentració de les cèl·lules nucleades totals (**B**) per a cadascuna de les estratègies de cultiu assajades. Blau: cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a una taxa de dilucions 1:1 cada dos dies. Vermell i verd: cultius iniciats a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL i aplicant les estratègies d'addicions 1:1,5 i 1:0,75 diari, respectivament.



**Figura 6.7.** Representació de l'evolució del pH per a cadascuna de les estratègies de cultiu assajades. Blau: cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a una taxa de dilucions 1:1 cada dos dies. Vermell i verd: cultius iniciats a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL i aplicant les estratègies d'addicions 1:1,5 i 1:0,75 diari, respectivament.

Els resultats obtinguts mostren que efectivament l'acumulació de lactat es tradueix en una disminució del pH del medi, situant-se en valors compresos entre 7,1 i 7,2 des del dia 8 fins al dia 14 en el cas del cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a unes taxes d'addicions de 1:1,5. En canvi, en el cultiu iniciat a aquest mateix inòcul però sobre el qual s'ha aplicat una estratègia de dilucions diàries de 1:0,75, com a conseqüència dels reduïts nivells de lactat acumulats al llarg del cultiu, el pH es manté entorn a 7,4. Pel que fa al cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, a partir del dia 10 i fins a la seva finalització, com a conseqüència del progressiu increment en la concentració de lactat en el medi, el pH disminueix des de 7,4 fins a 7,15. És important destacar que en aquest cas, tot i que el cultiu finalitza amb uns valors de pH menors que els observats al cultiu 1:1,5, la principal diferència entre ambdós cultius és la persistència en el temps dels alts nivells de lactat, i en conseqüència, del reduït pH.

Per tant, els resultats obtinguts indiquen que existeix una correlació negativa entre l'acumulació de lactat en el medi, que és proporcional al consum de glucosa, i la capacitat d'expansió de la població CD34<sup>+</sup>, fent-se més evident en els cultius en que la densitat de treball és més elevada i la renovació del medi és menor.

Amb totes aquestes dades, es conclou que les cèl·lules sotmeses al cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> i seguint una estratègia 1:1,5 estan sotmeses a un nivell d'estrès considerable degut a l'acumulació de lactat en el medi. A més, sota aquestes condicions de cultiu, la taxa d'expansió obtinguda se situa just al límit anteriorment calculat per a l'obtenció de les dosis clíniques. Per la seva banda, el cultiu iniciat a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a una estratègia d'addicions diària, tot i assolir el factor d'expansió requerit per a l'obtenció de dosis clíniques, queda descartat per l'elevat volum de treball que suposaria utilitzar aquesta estratègia per a produccions clíniques, a més de la complexitat operacional tenint en compte que el cultiu està sotmès a manipulacions diàries. Finalment, i pel que fa al cultiu iniciat a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, tot i haver reduït en un dia la durada total del cultiu, s'assoleix i inclús es supera el factor d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> necessari per a l'obtenció de dosis clíniques. És per aquest motiu que aquesta és la metodologia de cultiu d'elecció per a formar part del bioprocés orientat a obtenir dosis cel·lulars clínicament significatives.

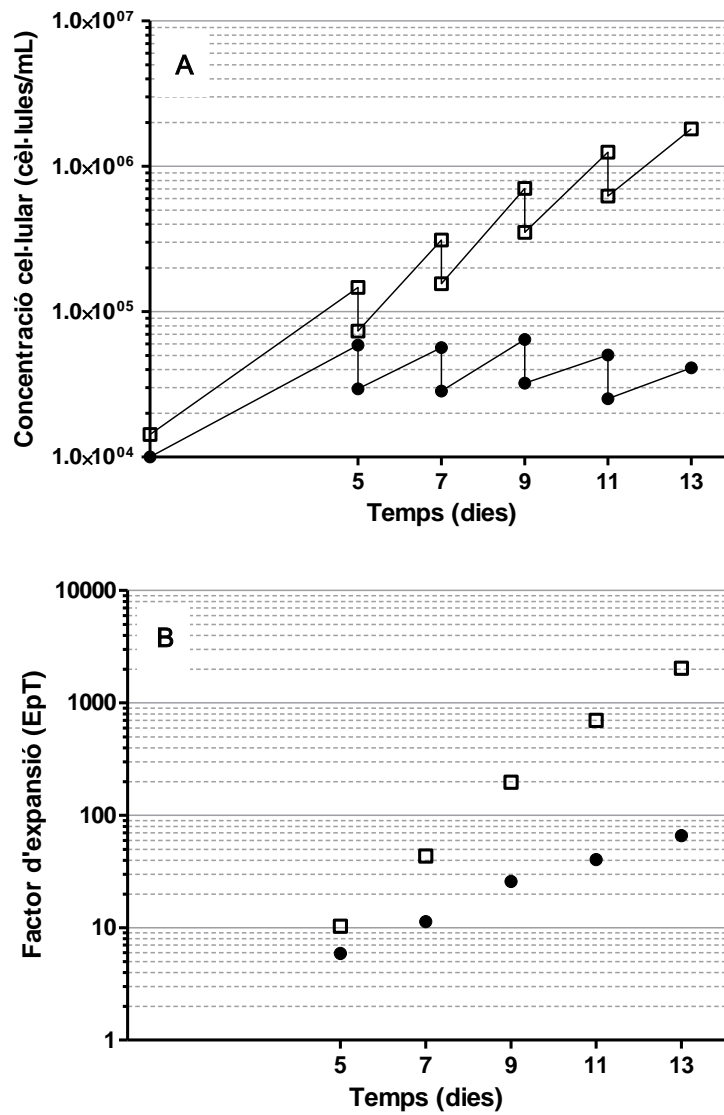
### **6.2.3. Prova de concepte: generació de dosis clíniques**

Una vegada definida l'estratègia de cultiu, es procedeix a avaluar-ne la seva escalabilitat per tal de valorar si el canvi en el dimensionat del procés és possible. Amb aquest objectiu, i a partir de les dosis cel·lulars disponibles a l'inici del cultiu, es duen a terme dues expansions a un volum final de 1,3 i 2,2 litres, respectivament.

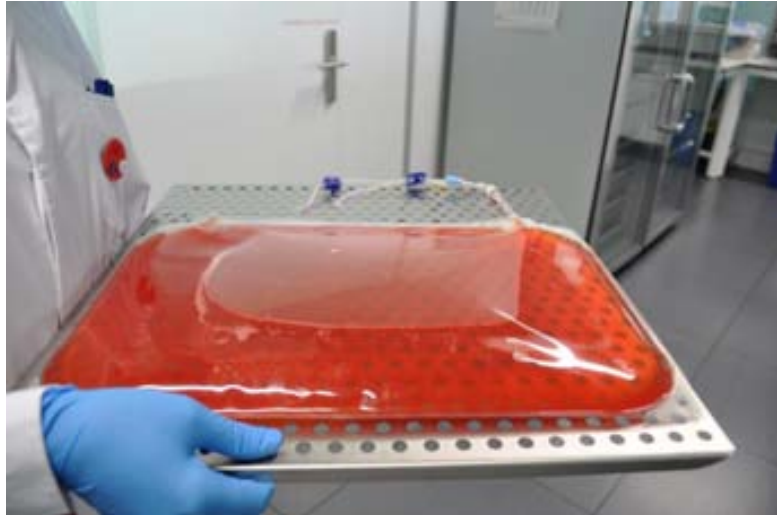


Aquest canvi en el dimensionat del procés porta associada una modificació en el suport de cultiu, que ha consistit en bosses de cultiu permeables al gas de capacitats volumètriques creixents. Aquestes compleixen amb els estàndards de qualitat fixats per la normativa GMP, i permeten la manipulació del seu contingut en sistema tancat, minimitzant per tant el risc de contaminació. L'elecció d'aquest sistema de cultiu es fonamenta amb l'experiència adquirida pel grup de recerca en la seva utilització per a l'expansió de progenitors hematopoètics.

Per a l'inici dels cultius es disposa de  $8,6 \times 10^5$  i  $1,4 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> obtingudes a partir de la purificació de dues unitats de SCU fresca. Per tant, per tal de partir de l'inòcul d' $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, els cultius s'inicien a un volum de 86 i 140 mL, respectivament. El medi de cultiu utilitzat és un medi químicament definit lliure de sèrum complementat amb les citoquines SCF, IL-3 i G-CSF (8.2.1). Els cultius es mantenen a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant 13 dies, aplicant l'estratègia d'addicions anteriorment descrita. Les bosses de cultiu es col·loquen directament sobre la safata de l'incubador, sense sotmetre-les a cap tipus d'agitació. Com a control, es sembra un flascó a la mateixa densitat cel·lular i sotmès a la mateixa estratègia d'addicions, però amb un volum de cultiu que no supera els 10 mL. Periòdicament, i mitjançant la plataforma citomètrica ISHAGE, es realitza un seguiment de la densitat cel·lular, tant per la població de CNT com per la de cèl·lules CD34<sup>+</sup>, fet que permet calcular el factor d'expansió assolit al llarg del cultiu (Figura 6.8).



**Figura 6.8.** Representació de l'evolució de les concentracions cel·lulars (A) i dels factors d'expansió (B) durant un dels cultius a volum duts a terme. CD34+ (●); CNT (□).



**Figura 6.9.** Imatge presa d'una de les expansions a volum realitzades mitjançant la utilització de bosses de cultiu permeables al gas.

Tal com s'observa a la Taula 6.3, finalitzat el cultiu s'assoleix un factor d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> de 26,4 i 65,8 vegades per a la N=1 i N=2, respectivament. Així, la quantitat de cèl·lules CD34<sup>+</sup> obtingudes al finalitzar el cultiu és de  $22,7 \times 10^6$  per a la N=1, i de  $92 \times 10^6$  per a la N=2. Es considera que aquestes diferències en els factors d'expansió dels dos experiments radiquen en les diferències intrínseques de la font cel·lular, com ja han descrit d'altres autors (Csaszar et al., 2012a).

Per tant, tot i les variacions observades en els lots experimentals, en ambdós casos s'assoleixen els factors d'expansió que permetrien obtenir dosis clínicament significatives. A partir d'una aproximació numèrica, on s'apliquen els factors d'expansió assolits a un hipotètic cultiu clínic iniciat a  $3 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>, les dosis cel·lulars obtingudes haurien estat de  $79 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> i  $197 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> per a la N=1 i N=2, respectivament (Taula 6.3).

	EpT CD34 <sup>+</sup>	EpT CNT	Dosi CD34 <sup>+</sup> final	Dosi CD34 <sup>+</sup> teòrica en una expansió clínica
N=1	26,4	1240	22,7x10 <sup>6</sup>	79x10 <sup>6</sup>
N=2	65,8	2030	92x10 <sup>6</sup>	197x10 <sup>6</sup>

**Taula 6.3.** Detall dels factors d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> i de les CNT, així com la dosi de cèl·lules CD34<sup>+</sup> final aconseguida durant les dues expansions a volum dutes a terme.

Amb el producte cel·lular obtingut al finalitzar els cultius, es realitza una caracterització en base a la viabilitat cel·lular, al fenotip i a la capacitat clonogènica, amb l'objectiu de determinar si el fet de cultivar les cèl·lules a elevats volums i amb un suport de cultiu diferent a l'utilitzat fins al moment té algun impacte sobre aquestes característiques cel·lulars (Taula 6.4).

		N=1	N=2
Viabilitat cel·lular	% CD34 <sup>+</sup> viables	85,1	95,5
	% CNT viables	95,2	94,2
Fenotip	% CD11b <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup>	20,4	33
	% CD11b <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	62,4	49,3
	% CD11b <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	34,1	16,1
Clonogè- nics	%CFU-GM	37	42
	EpT CFU-GM	50,1	138,2

**Taula 6.4.** Caracterització de la població cel·lular a la finalització de les dues expansions a volum en base a la viabilitat cel·lular, al fenotip dels precursors neutrofilics generats i a l'activitat clonogènica específica de llinatge granulocític-macròfag.

Els resultats obtinguts permeten concloure que aquesta metodologia de cultiu no té un efecte negatiu sobre la viabilitat cel·lular, doncs en els dos casos estudiats aquesta es situa per sobre del 85%. En referència al fenotip dels precursors neutrofílics i a l'eficiència clonogènica dels progenitors hematopoètics, i a partir de la comparació amb els resultats obtinguts en el Capítol 3 (Figura 3.7.A i Figura 3.10.A), es conclou que el fet de cultivar les cèl·lules a gran escala no altera el patró fenotípic i clonogènic observat fins al moment.

A partir de les dades obtingudes en l'estudi clonogènic i del factor d'expansió assolit en els cultius realitzats a escala clínica, és possible realitzar una aproximació numèrica de la dosi de CFU-GM/kg pacient que es podria obtenir seguint la metodologia de cultiu desenvolupada. Aquesta dada és especialment rellevant tenint en compte que a banda de la dosi de cèl·lules CD34<sup>+</sup> per kilogram de pacient, una de les variables que correlacionen amb la reducció del període d'aplàsia és la dosi d'unitats formadores de colònies (CFU-GM) per kilogram de pacient GM (Carral et al., 2002, Kozłowska-Skrzypczak et al., 2009).

Dosi CD34 <sup>+</sup>	% CFU-GM	Dosi CFU-GM
1x10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> /kg	40%	4x10 <sup>5</sup> CFU-GM/kg

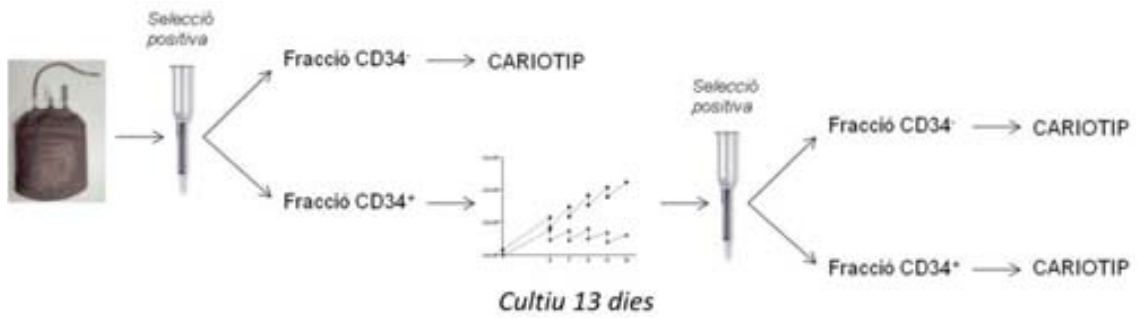
**Taula 6.5.** Aproximació numèrica de la dosi clínica de CPH formadores de colònies de llinatge granulocític-macròfag obtingudes mitjançant l'estratègia de cultiu dissenyada. Aquest valor es calcula aplicant el percentatge mig de CFU-GM obtingut en les expansions a volum dutes a terme, sobre la dosi clínica de cèl·lules CD34<sup>+</sup>.

Així doncs, i tal com s'observa a la Taula 6.5., seguint l'estratègia de cultiu posada a punt en aquest treball, la dosi assolida en termes d'unitats formadores de colònies seria de  $4 \times 10^5$  CFU-GM/kg.

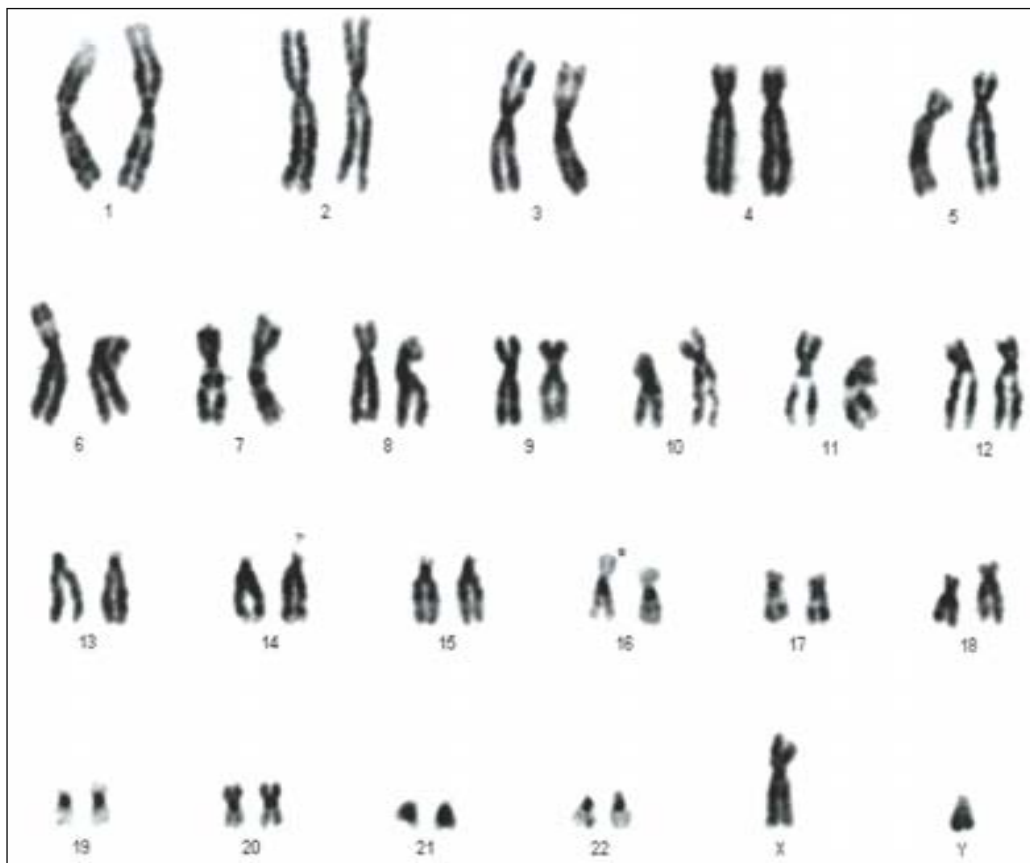
#### **6.2.4. Estudi de l'estabilitat genètica del producte expandit**

A continuació, es duu a terme un estudi de l'estabilitat genètica de les cèl·lules expandides en base a una determinació del cariotip. Aquest estudi té com a objectiu descartar l'adquisició d'alguna anomalia genètica com a conseqüència d'haver estat sotmeses a un procés d'expansió *in vitro*.

S'inicien tres cultius d'expansió a partir de cèl·lules CD34<sup>+</sup> aïllades de SCU fresca a una puresa inicial de  $62\% \pm 6,8\%$ . Aquestes es sotmeten al procés d'expansió optimitzat en el present capítol durant un total de 13 dies. Tal com s'esquematitza a la Figura 6.10, en primer lloc es realitza un estudi del cariotip de la fracció negativa resultant de la purificació de la SCU, amb l'objectiu de descartar la presència d'alguna alteració cromosòmica de la mostra de partida. Al finalitzar l'expansió, i degut a que una possible alteració cromosòmica de la població CD34<sup>+</sup> quedaria emmascarada per la resta de cèl·lules madures com a conseqüència de la seva reduïda proporció, es realitza de nou una purificació. Així, sobre el producte cel·lular obtingut a la finalització de l'expansió, es realitza un estudi cariotípic tant de la fracció CD34<sup>+</sup> (a una puresa mitjana de  $64,4\% \pm 12,3\%$ ), com de la fracció CD34<sup>-</sup>.



**Figura 6.10.** Esquema experimental de l'estudi d'estabilitat genètica en base al cariotip cel·lular. Com a control, es realitza una determinació del cariotip de la fracció negativa obtinguda en la purificació de la sang de cordó umbilical amb l'objectiu de descartar cap anomalia genètica inicial. Finalitzat el cultiu, es realitza una purificació de la fracció CD34<sup>+</sup> i es realitza l'estudi cariotípic tant de la fracció CD34<sup>+</sup> com de la CD34<sup>-</sup>. N=3.



**Figura 6.11.** Imatge d'un dels cariotips realitzats. Per a cada determinació, s'han avaluat una mitjana de 15 metafases. Determinacions dutes a terme pel Laboratori de Citogenètica molecular del Servei de Patologia de l'Hospital del Mar (Barcelona).

Els resultats obtinguts no mostren cap alteració cromosòmica en cap de les fraccions estudiades, fet que permet concloure que les condicions de cultiu a les quals es sotmeten les cèl·lules no produeixen cap impacte negatiu sobre la seva estabilitat cromosòmica.

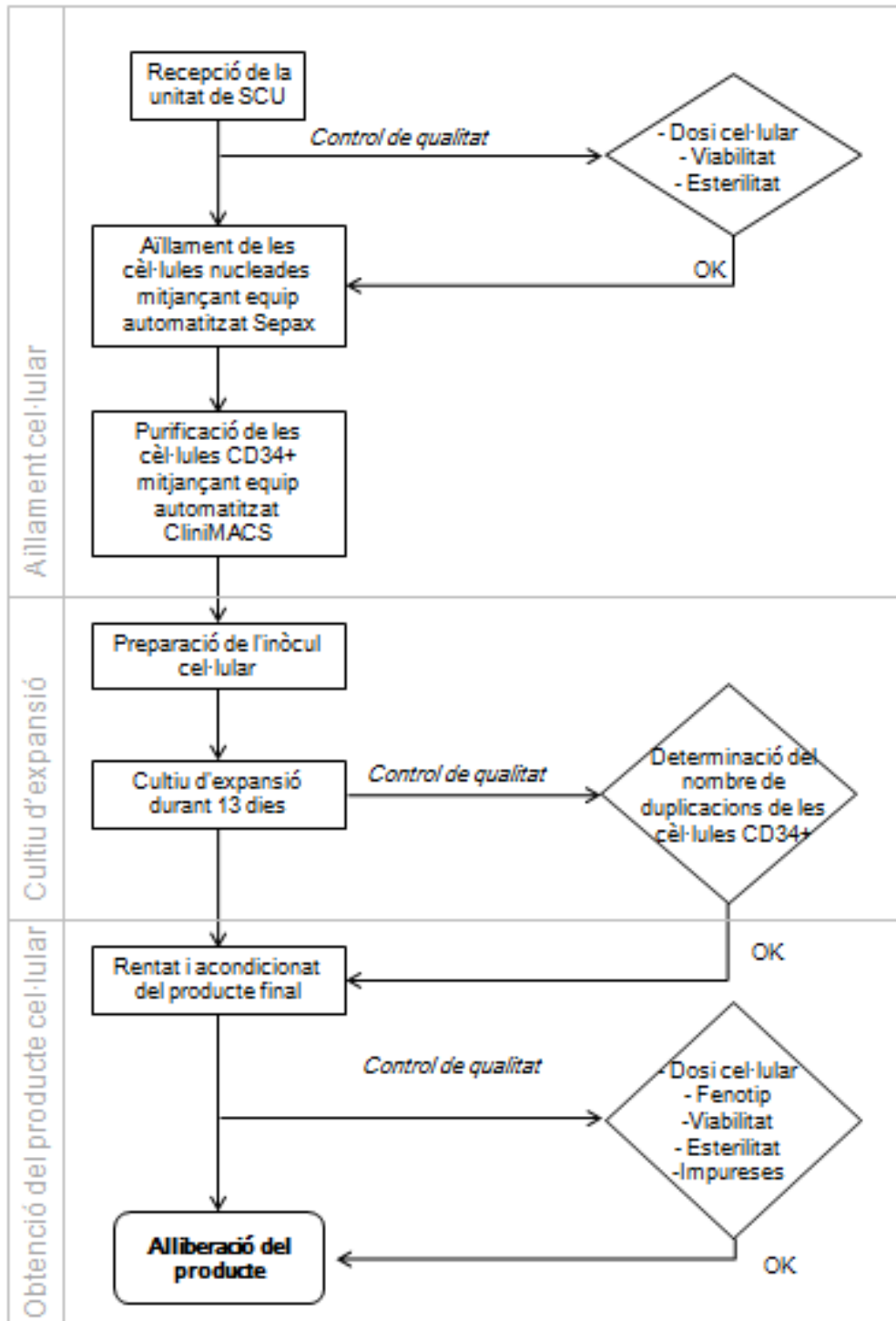
### **6.2.5. Definició del bioprocés i els seus punts de control**

El darrer pas en el procés de desenvolupament del bioprocés consisteix en dur a terme el disseny de tot el bioprocés seguint els estàndards marcats per la normativa GMP.

Un dels aspectes més importants en la definició d'un bioprocés és l'establiment dels punts de control, els quals estan orientats a garantir la qualitat del producte final. En el cas d'estudi, aquests punts de control adquireixen especial rellevància, ja que una dificultat afegida a aquest tipus de cultiu és la variabilitat en la font cel·lular de partida (Csaszar et al., 2012a), la qual cosa té un impacte directe en la capacitat d'expansió de les CMH/CPH. D'aquesta manera, els punts de control de procés han de proporcionar la informació necessària per tal d'anticipar un eventual fracàs en l'assoliment del factor d'expansió necessari.

A continuació es presenta el diagrama de flux que engloba la totalitat del bioprocés, des de l'elecció de la unitat de SCU de partida fins a l'obtenció del producte de teràpia cel·lular avançada.





**Figura 6.12.** Diagrama del procés de fabricació del producte de teràpia cel·lular avançada desenvolupat. El procés ha estat concebut per tal d'operar seguint els estàndards marcats per la normativa GMP en la totalitat de les etapes.

El disseny de tot el bioprocés s'ha concebut per tal d'operar en sistema tancat en la totalitat de les etapes, reduint, per tant, el risc que es produeixi una contaminació microbiològica. D'aquesta manera, tant les etapes de purificació, de cultiu, com de rentat i acondicionat del producte final han estat adaptades a la metodologia de treball en sistema tancat. En primer lloc, l'operació consistent en aïllar les cèl·lules nucleades a partir d'un gradient de densitat s'ha definit utilitzant el sistema automatitzat Sepax (Biosafe, Eysins, Suïssa), el qual permet realitzar la separació d'aquesta fracció cel·lular de forma automatitzada i en sistema tancat. La purificació de la població CD34<sup>+</sup> s'ha concebut a partir de la utilització de l'equip CliniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanya), el qual permet realitzar la selecció positiva de forma automatitzada i mantenint l'estanqueïtat del sistema en tot moment. Pel què fa al cultiu, tal com s'ha assajat amb anterioritat, s'ha establert la utilització de bosses permeables al gas, sobre les quals es realitzen les addicions periòdiques de medi fresc mitjançant connexions estèrils. Finalment, l'operació de rentat i acondicionat del producte final ha estat dissenyada a partir de la centrifugació de bosses de transferència, de manera que una vegada més queda garantida l'estanqueïtat del sistema.

Pel què fa als punts de control del bioprocés, aquests es poden classificar en els que estan orientats a assegurar l'assoliment de la dosi cel·lular al llarg de tot el procés, i els orientats a garantir la qualitat del producte final pel què fa a l'esterilitat, identitat i potència. En referència a l'obtenció de la dosi cel·lular d'interès i tal com s'ha comentat anteriorment, la variabilitat en el material cel·lular de partida té un impacte directe en la capacitat d'expansió de la població CD34<sup>+</sup>, de manera que esdevé fonamental el control sobre la unitat de SCU amb la que s'iniciarà el procés. L'experiència adquirida

al llarg d'aquest desenvolupament ha permès detectar que una de les variables que influencien de manera més directa sobre l'èxit del cultiu és el temps transcorregut des de l'obtenció de la unitat de SCU fins a l'inici de la purificació. Així, s'estipula que les unitats seleccionades per a una expansió clínica, a més de tenir més de  $6 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> viables, han de tenir un màxim de 24 hores des de la seva obtenció. No obstant, tot i fixar aquests paràmetres, no es pot eliminar completament la variabilitat en les mostres, la qual es posarà de rellevància durant el transcurs del cultiu. És per aquest motiu que s'han integrat punts de control entremitjos consistents en determinar el número de duplicacions realitzades per la població CD34<sup>+</sup> a dia 5 i dia 9 de cultiu, de manera que es puguin detectar aquells cultius que no segueixin el ritme establert de duplicacions i que, per tant, no permetin assolir la dosi clínica d'interès.

Pel què fa als punts de control orientats a garantir la qualitat del producte, aquests es realitzen tant de la font cel·lular de partida com del producte acabat. En referència a la font cel·lular de partida, els controls realitzats consisteixen en determinar l'esterilitat del producte i l'absència de contaminació vírica que pugui comprometre la salut del pacient receptor de la teràpia. Pel què fa al producte final, els controls duts a terme tenen com a objectiu garantir-ne tant l'esterilitat, com la seva identitat i potència. L'avaluació de l'esterilitat es realitza en base a les següents determinacions: assaig microbiològic, test d'endotoxina i determinació de la presència de micoplasma, tots ells segons els estàndards dictats per la Farmacopea Europea. Pel què fa a la determinació de la potència, els assajos indicats a tal efecte, com ara l'avaluació de l'activitat formadora de colònies, sobrepassen l'estabilitat del producte final, fent inviable la seva realització de forma prèvia a l'administració del producte. És per aquest motiu que, per tal d'alliberar el producte cel·lular amb garanties, s'utilitzen

marcadors fenotípics subrogats de potència, els quals es complementen amb els marcadors utilitzats per a la determinació de la identitat, juntament amb la determinació del nombre i viabilitat cel·lular.

Per últim, de forma complementària a la definició del bioprocés, s'estableixen els reactius que hi intervindran, detallant-ne el seu grau de qualitat.

Reactiu	Concentració de treball	Font	Grau	Fabricant
Ficoll Paque Premium	70% (v/v)	Sintètic	GMP	GE Healthcare
Plasmalyte 148	90% (v/v)	Sintètic	GMP USP	Baxter
Albutein 20%	2% (v/v)	Humà	GMP Ph.Eur.	Grifols
Flebogamma	≤10% (v/v)	Humà	GMP Ph.Eur.	Grifols
CD34 MicroBead	≤10% (v/v)	Murí	CE	Miltenyi Biotec
PBS/EDTA Buffer	95% (v/v)	Sintètic	CE	Miltenyi Biotec
HP01	100% (v/v)	Sintètic	GMP	Macopharma
SCF	<0,1% (v/v)	<i>E. coli</i>	GMP	Miltenyi Biotec
IL-3	<0,1% (v/v)	<i>E. coli</i>	GMP	Miltenyi Biotec
Neupogen (G-CSF)	<0,1% (v/v)	<i>E. coli</i>	Medicament d'ús humà GMP	Amgen

**Taula 6. 6.** Reactius utilitzats durant el bioprocés de fabricació del producte de teràpia cel·lular desenvolupat. Per a cada reactiu s'especifica la concentració de treball, la font d'origen, el grau de qualitat i el fabricant. GMP: *good manufacturing practices*; CE: conformitat europea; USP: segons farmacopea dels Estats Units; Ph. Eur.: segons farmacopea de la Unió Europea.

Tal com s'observa a la Taula 6. 6, la totalitat dels reactius utilitzats són de qualitat GMP, a excepció dels reactius utilitzats en l'etapa inicial de selecció de progenitors hematopoètics de la SCU. Tanmateix, i tal com s'ha comentat anteriorment, les bosses

de cultiu permeables al gas també compleixen els estàndards de qualitat marcats per la normativa GMP.

### 6.3. DISCUSSIÓ

---

La generació d'una estratègia de cultiu robusta que permeti obtenir dosis cel·lulars clínicament significatives en el context d'un bioprocés que operi segons normativa GMP, ha de permetre realitzar la transferència del producte de teràpia cel·lular avançada des del laboratori fins a la seva aplicació clínica. És per aquest motiu que en el present capítol s'ha escalat del procés productiu per tal d'obtenir dosis cel·lulars de l'ordre d' $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg pacient. En general, aquests processos de canvi d'escala porten implícita la necessitat de re-optimitzar algun dels paràmetres del cultiu (Csaszar et al., 2012a). En aquest cas en particular, aquesta re-optimització s'ha centrat en la definició d'una metodologia de cultiu orientada a treballar amb el menor volum possible, tant per motius operacionals com econòmics, doncs el medi de cultiu és el que encareix més el cost del procés.

A tal efecte, la definició del nou bioprocés ha pivotat sobre les variables descrites a continuació, i la seva influència sobre la capacitat d'expansió del cultiu: densitat de sembra i esquema d'addicions de medi fresc. Els resultats obtinguts han posat en evidència la repercussió negativa que tenen les elevades concentracions cel·lulars en aquest tipus de cultiu, ja descrites en el Capítol 3, doncs l'estratègia que ha permès expandir la població CD34<sup>+</sup> de forma més efectiva ha estat la iniciada a un inòcul menor:  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL. Per la seva banda, els cultius iniciats a un inòcul superior

( $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>/mL), tot i mostrar una capacitat d'expansió més limitada, han presentat unes taxes d'expansió més grans com majors han estat les dilucions aplicades en el cultiu. Tal com ha estat descrit en múltiples treballs, aquests resultats semblen indicar que es produeix una acumulació de factors inhibitoris en el medi, presumiblement com a conseqüència de l'acumulació de cèl·lules madures per unitat de volum, que actuen limitant la capacitat replicativa dels progenitors hematopoètics de forma dosi-dependent (Fortunel et al., 2000a, Madlambayan et al., 2005, Pierelli et al., 2002). Però no únicament la presència d'aquests senyals cel·lulars solubles serien els responsables de la limitació en la capacitat d'expansió dels cultius, sinó que també, tal com ha quedat demostrat en el present treball, es produeix una acidificació dels cultius degut a l'acumulació de subproductes del metabolisme, com ara l'àcid làctic, fenomen descrit com a altament inhibitori (Patel et al., 2000). Una vegada més, aquesta acumulació és més important com més elevat és l'inòcul i menor la dilució aplicada. Així doncs, en base als resultats obtinguts, s'ha escollit l'estratègia de cultiu iniciada a  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>/mL, preferentment de 13 dies de durada, i sotmesa a dilucions periòdiques 1:1 per tal d'escalar el procés.

En referència al suport de cultiu d'elecció per a l'escalat del bioprocés, existeixen una gran varietat de bioreactors de diversa complexitat orientats a l'expansió de progenitors hematopoètics, des de bioreactors de tanc agitat fins a bioreactors de llit fix, passant per cambres de perfusió (Cabrita et al., 2003, Kowalczyk et al., 2011). En aquest treball, el sistema de cultiu d'elecció han estat les bosses de cultiu permeables al gas, la utilització de les quals ja ha estat demostrada amb èxit en diversos treballs (Ivanovic et al., 2011, Madlambayan et al., 2006, Pla, 2011). L'avantatge principal que confereix aquesta plataforma de cultiu és la seva senzillesa operacional i aplicabilitat

en condicions GMP, facilitant per tant la seva utilització en qualsevol instal·lació, sense que sigui necessari l'adquisició de maquinària específica, més enllà d'un incubador amb control de temperatura i CO<sub>2</sub>.

Arribats a aquest punt, i una vegada definides les variables que articulen el bioprocés, s'han dut a terme amb èxit dos assajos d'escalabilitat de la metodologia de cultiu d'elecció. Tot i no haver iniciat els cultius amb la dosi cel·lular de la que es disposarà en la realització d'una expansió per a ús clínic i, per tant, no finalitzar amb el volum i dosi cel·lular corresponents, els resultats obtinguts semblen indicar que la metodologia de cultiu aplicada és apta per a la generació de dosis de l'ordre d' $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg pacient, doncs en ambdós casos s'han assolit els factors d'expansió de la població CD34<sup>+</sup> necessaris per a l'obtenció de les dosis terapèutiques (26,4 i 65,8 vegades). En aquest cas en particular, tenint en compte el nombre de cèl·lules amb les que s'han iniciat els cultius, aquests factors d'expansió s'han traduït en l'obtenció de dosis de  $22,7 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> i  $92 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>, respectivament, assolint uns volums finals de 1,3 i 2 litres. En cas que els cultius efectivament s'haguessin iniciat amb el volum corresponent per a una expansió d'ús clínic, mitjançant una aproximació numèrica es pot determinar que s'haguessin obtingut unes dosis finals de  $79 \times 10^6$  i  $197 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>, dosis comparables amb els treballs dels equips de C. Delaney i M. DeLima, en els quals s'obtenien dosis d'aproximadament  $60-1440 \times 10^6$  i  $20-200 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>, respectivament (De Lima et al., 2012, Delaney et al., 2010).

Tot i haver obtingut resultats positius, convé posar èmfasi en la variabilitat en els factors d'expansió assolits. Aquest és un fenomen atribuïble a la variabilitat intrínseca de les cèl·lules de partida, tal com han experimentat d'altres autors en el context de

fabricació de dosis clíniques (De Lima et al., 2008). Per tal de minimitzar aquest efecte indesitjat, la definició dels criteris d'acceptació de les unitat de SCU esdevé imprescindible (Csaszar et al., 2012a).

A continuació, i amb l'objectiu de comprovar que el procés d'expansió a escala clínica no altera les propietats característiques del producte desenvolupat, s'ha dut a terme una caracterització en base al fenotip i a la capacitat clonogènica de la suspensió cel·lular resultant. Els resultats obtinguts han permès corroborar l'especialització a llinatge granulocític-macròfag a la que queden sotmesos els progenitors, la qual cosa es tradueix en dosis teòriques d'aproximadament  $4 \times 10^5$  CFU-GM/kg. Aquesta dada, tal i com ja s'ha esmentat, és especialment rellevant tenint en compte que existeixen alguns treballs que conclouen que una de les variables que millor correlaciona amb la disminució dels períodes de neutropènia és precisament la dosi de CFU-GM (Carral et al., 2002, Kozłowska-Skrzypczak et al., 2009). Concretament, en el treball de l'equip de M. Kozłowska-Skrzypczak, en el qual realitzen trasplantament de moll d'os autòleg, conclouen que la recuperació dels índexs normals de neutròfils en sang es produeix més ràpid en els pacients que reben dosis superiors a  $2,34 \times 10^5$  CFU-GM/kg (Kozłowska-Skrzypczak et al., 2009).

Com a requisit per a que un producte de teràpia avançada pugui ser aplicat en un context d'assaig clínic, no tant sols és necessari disposar d'una estratègia de cultiu robusta i reproduïble, sinó que és necessari demostrar que les cèl·lules sotmeses a aquesta estratègia no adquireixen anomalies genètiques (Katayama et al., 2001). És per aquest motiu que s'ha realitzat un estudi cariotípic de les cèl·lules resultants del procés d'expansió. Els resultants obtinguts han permès demostrar que les cèl·lules



sotmeses al procés d'expansió desenvolupat no adquireixen defectes cromosòmics. Aquestes dades es complementen amb les obtingudes en l'estudi preclínic realitzat en el Capítol 5, evidenciant una vegada més que el producte de teràpia avançada desenvolupat és segur.

Per últim, el darrer pas d'aquest desenvolupament ha consistit en definir la totalitat del bioprocés operant en condicions GMP, des de la purificació dels progenitors hematopoètics de la SCU fins a l'acondicionat final del producte cel·lular. A tal efecte s'ha generat un diagrama de procés, en el qual s'han establert les diferents etapes que el componen, així com els controls de procés, els quals estan orientats a garantir la qualitat del producte final.

En resum, els resultats obtinguts en aquest capítol semblen indicar que el sistema de cultiu desenvolupat és escalable i permet assolir uns factors d'expansió compatibles amb l'obtenció de dosis cel·lulars clínicament significatives.



# 7

Conclusions generals i  
treball futur



## 7.1. CONCLUSIONS

El treball realitzat en aquesta tesi doctoral ha permès el desenvolupament d'un producte de teràpia cel·lular avançada a partir de l'expansió dels progenitors hematopoètics de la sang de cordó umbilical. Aquest desenvolupament ha transcorregut seguint les següents etapes: en primer lloc s'ha definit una estratègia de cultiu que permet expandir les poblacions cel·lulars d'interès. A continuació s'ha realitzat la caracterització del producte cel·lular resultant, mitjançant tècniques tant *in vitro* com *in vivo*. La seguretat del producte cel·lular obtingut ha quedat demostrada a partir del seu trasplantament en model murí i a partir de l'estudi cariotípic. Finalment s'ha realitzat l'escalat del procés productiu per tal d'obtenir dosis cel·lulars clínicament significatives, a la vegada que s'ha definit la totalitat de bioprocés seguint els estàndards de qualitat segons la normativa GMP.

En base als resultats obtinguts, les conclusions que es poden extreure d'aquest treball es llisten a continuació:

- I. El cultiu de cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU iniciat a un inòcul d'1x10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/mL i sotmès a una estratègia de cultiu consistent en adicions periòdiques de medi fresc, permet obtenir uns factors d'expansió que fan possible l'assoliment de dosis cel·lulars clínicament significatives, de l'ordre d'1x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg.
- II. La combinació de citoquines utilitzades (IL-3, SCF i G-CSF) permet l'especialització selectiva dels progenitors hematopoètics a llinatge granulocític.

- III. El producte resultant de l'expansió està compost per un 0,8-4% de cèl·lules CD34<sup>+</sup>, i per un 96-99,2% de cèl·lules CD34<sup>-</sup>. La fracció cel·lular majoritària (CD34<sup>-</sup>) està integrada per precursors neutrofilics en diferent grau de maduració i per cèl·lules mieloides supressores, ambdues poblacions funcionalment actives segons tests *in vitro*.
- IV. L'estratègia de cultiu desenvolupada permet l'expansió dels progenitors hematopoètics amb activitat repobladora a curt termini. Contràriament, el procés d'expansió provoca l'empobriment en progenitors amb activitat repobladora a llarg termini.
- V. El producte cel·lular ha demostrat ser segur tant a nivell preclínic (absència de formacions neoplàsiques i absència de formació de teixit ectòpic en model murí), com en termes d'integritat cromosòmica.
- VI. El sistema de cultiu desenvolupat és escalable i permet assolir els factors d'expansió necessaris per a l'obtenció de dosis cel·lulars clínicament significatives, complint els estàndards definits per la normativa GMP.

## 7.2. TREBALL FUTUR

Aquesta tesi ha servit per assentar les bases per a la fabricació d'un producte de teràpia cel·lular avançada orientat a la reducció dels períodes d'aplàsia. No obstant, perquè això sigui possible, cal complir encara amb una sèrie de requeriments fixats per l'Agència Espanyola del Medicament. D'ells destaca la realització dels tests de manipulació asèptica, la realització de la validació del procés productiu fins a l'assoliment de dosis clíniques, i l'escriptura de la documentació necessària per a la sol·licitud d'un assaig clínic (*Producto en Fase de Investigación, PEI*). Un cop s'hagin assolit aquests requeriments, es podrà iniciar l'estudi clínic, que s'espera que sigui en els propers mesos.





# 8

Materials i mètodes



## 8.1. Aïllament cel·lular

### 8.1.1. Purificació de cèl·lules CD34<sup>+</sup> de SCU fresca

Per a la purificació de la població CD34<sup>+</sup> de la SCU són necessàries dues etapes d'aïllament consecutives: aïllament de la fracció mononuclear (CMN) mitjançant gradient de centrifugació i, a continuació, selecció immunomagnètica de les cèl·lules CD34<sup>+</sup>.

#### I. Aïllament de les CMN per gradient de densitat

En primer lloc, es calcula el volum de la unitat de SCU (Banc de Sang i Teixits, Barcelona) a partir del seu pes i mitjançant el valor de densitat de la sang (1,06 g/mL). A continuació es realitza una dilució de la SCU amb PBS (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a una relació 3:1 aproximadament.

El reactiu utilitzat per a la realització del gradient de densitat és Lymphoprep (1.077g/mL, Axis-Shield, Oslo, Noruega). Per tal efecte, es dipositen 35 mL de la sang diluïda en un tub cònic de 50 mL de capacitat, el qual ha estat precarregat amb 15 mL de Lymphoprep, evitant que la interfase entre la sang i el Lymphoprep es trenqui. Es centrifuga a 340g durant 55 minuts, a 20°C i sense frenada. Finalitzada la centrifugació, es recuperen les cèl·lules dipositades a la interfase plasma/Lymphoprep formant un anell i es transfereixen de nou a un tub cònic de 50 mL de capacitat. A continuació es realitzen dos rentats consecutius amb PBS i mitjançant centrifugacions a 340g. durant 10 minuts a 20°C. Finalment es ressuspèn el *pellet* amb 10 mL de PBS, s'extreu una mostra de 200 µL i es realitza un recompte mitjançant la plataforma citomètrica ISHAGE.

## II. Selecció immunomagnètica

La selecció immunomagnètica es realitza a partir de la utilització de l'anticòs anti-CD34 (QBEND10) conjugat a una partícula magnètica i el pas de la suspensió cel·lular a través d'una columna emplaçada en un camp magnètic, de manera que les cèl·lules unides específicament a l'anticòs CD34 quedaran retingudes a la columna i, posteriorment podran ser eluïdes.

De nou, la suspensió cel·lular obtinguda en l'etapa anterior es sotmet a una centrifugació (340g, 10 minuts, 20°C), i el *pellet* resultant es ressuspèn en un volum de 300 µL de PBS per cada 10<sup>8</sup> cèl·lules nucleades. A continuació s'afegeixen 100 µL d'agent de bloqueig en base a immunoglobulina humana FcR (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanya) per cada 10<sup>8</sup> cèl·lules nucleades. S'incuba durant 5 minuts a temperatura ambient i seguidament s'afegeixen 100 µL de l'anticòs CD34 conjugat a les partícules magnètiques (Miltenyi Biotec) per cada 10<sup>8</sup> cèl·lules nucleades. S'incuba durant 30 minuts, a 4-8°C i en agitació mitjançant l'agitador MACSMix (Miltenyi Biotec). Finalitzada la incubació, s'afegeixen 10 mL de PBS i es realitza un rentat per tal d'eliminar les interaccions inespecífiques (340g, 10 minuts i 20°C). El *pellet* resultant es ressuspèn amb 500 µL de PBS per cada 10<sup>8</sup> cèl·lules nucleades. Aquesta suspensió cel·lular es diposita en una columna de separació MACS del tipus LS (Miltenyi Biotec) prèviament rentada amb PBS i emplaçada en un suport magnètic, de manera que les cèl·lules que no s'hagin unit a l'anticòs conjugat a les partícules magnètiques, eluiran. A més, es realitzen diversos rentats amb PBS per a eliminar les cèl·lules no retingudes. Finalment s'elueixen les cèl·lules d'interès retirant el camp magnètic i fent passar 5 mL de PBS a través de la columna.

### **8.1.2. Purificació de cèl·lules CD34<sup>+</sup> d'un cultiu d'expansió**

Per a la purificació de la població CD34<sup>+</sup> d'un cultiu d'expansió, es realitza únicament l'etapa de selecció immunomagnètica descrita en l'apartat anterior, emprant les mateixes proporcions volumètriques.

### **8.1.3. Aïllament de la fracció mononuclear d'un residu leucocitari**

Per a l'aïllament de la fracció mononuclear d'un residu leucocitari (Banc de Sang i Teixits), en primer lloc es realitza una dilució amb PBS (Life Technologies) fins a un volum final de 100 mL (el volum habitual d'un residu leucocitari és de 10-20 mL). A continuació, es dipositen 25 mL del residu leucocitari diluït en un total de quatre tubs cònics de 50 mL de capacitat precarregats amb 15 mL de Lymphoprep (1.077g/mL, Axis-Shield) cadascun. Es centrifuga a 400g durant 30 minuts, a 20°C i sense frenada. Finalitzada la centrifugació, es recuperen les cèl·lules dipositades a la interfase PBS/Lymphoprep formant un anell i es transfereixen de nou a un tub cònic de 50 mL de capacitat. A continuació es realitzen dos rentats consecutius amb PBS i mitjançant centrifugacions a 340g durant 10 minuts a 20°C. Finalment es ressuspen el *pellet* amb 10 mL de PBS i es procedeix a realitzar un recompte cel·lular.

## **8.2. Cultiu cel·lular**

### **8.2.1. Preparació del medi de cultiu d'expansió de cèl·lules CD34<sup>+</sup>**

El medi de cultiu utilitzat per a l'expansió de les CMH/CPH de SCU està compost pel medi basal HP01 (Macopharma, Mouvoux, França) complementat amb les següents citoquines: IL3 a una concentració de 155 IU/mL (Miltenyi Biotec), SCF a una concentració de 36 IU/mL (Miltenyi Biotec) i G-CSF a una concentració de 50 ng/mL (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, EEUU). Finalitzada la complementació del medi,

es realitza una etapa de filtració esterilitzant (0,22 µm). El medi s'emmagatzema a 2-8°C i s'utilitza durant els 5 dies posteriors a la seva preparació.

### 8.2.2. Cultiu d'expansió de CMH/CPH

Els cultius d'expansió s'inicien a partir de CD34<sup>+</sup> purificades de SCU a una concentració d'entre 1x10<sup>3</sup> CD34<sup>+</sup>/mL i 1x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>/mL. Com a suport de cultiu s'empren flascons de cultiu (T25, T75 i T150, Corning, NY, EEUU), o bosses permeables al gas de diferent capacitat volumètrica (100 mL – 5000 mL) (Charter Medical, NC, EEUU). Sobre els cultius en discontinu no es realitza cap addició ni recanvi de medi. Sobre els cultius del tipus *fed-batch* es realitzen dilucions periòdiques de medi fresc. Els cultius es mantenen en una atmosfera humidificada a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i tenen una durada d'entre 12 i 20 dies.

### 8.2.3. Càlcul del factor d'expansió i del nombre de duplicacions

Pel càlcul del factor d'expansió cel·lular (Ep, de l'anglès *expansion factor*) al llarg del cultiu s'aplica la següent fórmula:

$$E_p = \frac{(\text{Nombre de cèl·lules})_{\text{final}}}{(\text{Nombre de cèl·lules})_{\text{inicial}}}$$

Per altra banda, el càlcul del número de duplicacions realitzades al llarg del cultiu, s'aplica la següent fórmula:

$$\text{Nombre de duplicacions} = \frac{\ln(E_p)}{\ln(2)}$$

### 8.2.4. Generació d'una capa confluent de cèl·lules mesenquimals irradiades

Per a la generació d'una capa confluent de cèl·lules mesenquimals, es sembren les cèl·lules (prèviament aïllades d'un moll d'os humà) a una concentració de 1-5x10<sup>3</sup> cèl·lules/cm<sup>2</sup> en flascons de cultiu (Corning, NY, EEUU) o en plaques multipous (Nunc,

Thermo Scientific, MA, EEUU). Cada 3-4 dies es realitza un recanvi complet de medi, que consisteix en DMEM (Invitrogen, Paisley, Gran Bretanya) complementat amb un 10% v/v de sèrum humà (Banc de Sang i Teixits). Una vegada s'ha arribat a la confluència cel·lular, es procedeix a realitzar la irradiació a una dosi de 15 Gy, mitjançant la utilització d'una font de  $^{137}\text{Cs}$  (Cis Biointernational, model: IBL 437 C, Gif-sur-Yvette, França).

### **8.3. Tècniques citomètriques**

#### **8.3.1. Quantificació de cèl·lules CD34<sup>+</sup> i cèl·lules nucleades totals**

Per a la quantificació de cèl·lules CD34<sup>+</sup> s'utilitza la metodologia establerta per la *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) (Keeney et al., 1998). Es tracta d'una metodologia citomètrica en la que es combinen 5 paràmetres: mida i complexitat cel·lular, expressió de les proteïnes de membrana CD34 i CD45, i marcatge del DNA amb l'agent 7-aminoactinomycin D (7AAD) com a indicador de mortalitat cel·lular. Aquests paràmetres es combinen en una estratègia seqüencial de selecció de poblacions Booleana que permet identificar específicament la població de cèl·lules progenitores hematopoètiques. L'addició d'un volum conegut de microesferes amb una densitat coneguda, permet la quantificació tant de la concentració de les cèl·lules CD34<sup>+</sup> com de les cèl·lules nucleades totals (CD45<sup>+</sup>) per unitat de volum.

En un tub de citometria es dipositen 5 µL de l'anticòs CD34-PE i 5 µL del CD45-FITC (ambdós de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) . S'afegeixen 50 µL de la mostra cel·lular, s'homogeneïtza i es deixa incubar durant 15 minuts a la foscor i a temperatura ambient. Finalitzada la incubació, es dipositen 100 µL de PBS i 50 µL de microesferes de recompte Perfect Count (Cytognos, Salamanca, Espanya).

S'homogeneïtza i es realitza l'adquisició mitjançant el citòmetre de flux FACSCalibur (Becton Dickinson). S'adquireixen un mínim de 20000 esdeveniments, i per a l'anàlisi s'utilitza el software CellQuest Pro (Becton Dickinson). En aquest cas no es realitza marcatge amb 7AAD degut a que la determinació de la viabilitat cel·lular es realitza de forma posterior, ja que s'inclou un marcador per a la determinació de l'apoptosi.

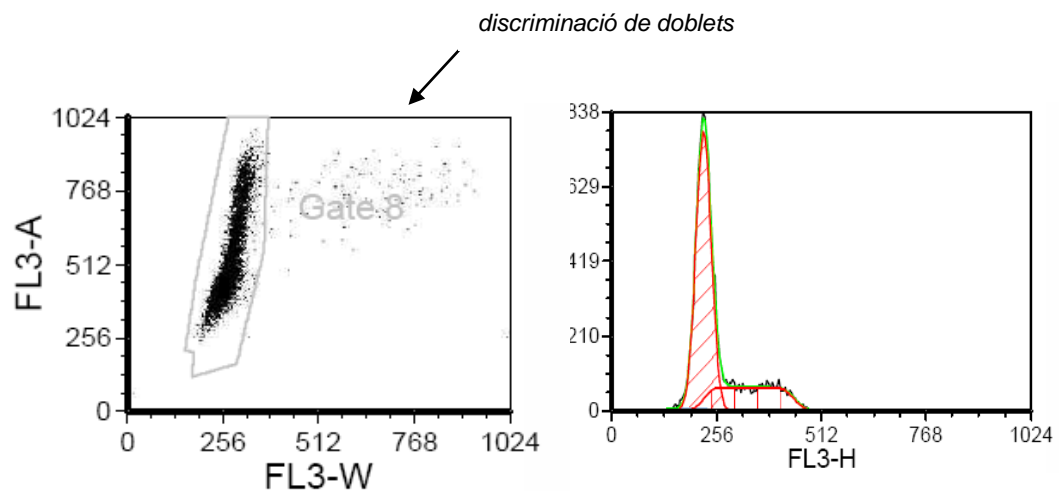
### **8.3.2. Cicle cel·lular**

Per a l'estudi del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux s'utilitza el reactiu DRAQ5 que s'uneix de forma específica i estequiomètrica al DNA, de forma que la quantitat de DRAQ5 incorporada és proporcional a la quantitat de DNA. D'aquesta manera, i en base a la intensitat de fluorescència emesa, es pot extrapolar el contingut de DNA cel·lular i, per extensió, la fase del cicle en la que es troba.

Per a la determinació del cicle cel·lular de la població CD34<sup>+</sup> es realitza un marcatge amb els anticossos CD34-PE i CD45-FITC (Becton Dickinson). Es dipositen 5 µL de l'anticòs CD34-PE i 5 µL de l'anticòs CD45-FITC en un tub de citometria, i a continuació s'afegeixen 200 µL de la suspensió cel·lular d'estudi. S'incuba 15 minuts a la foscor i a temperatura ambient. Transcorregut aquest període, s'afegeixen 2 µL de DRAQ5 (Biostatus, Leicestershire, Gran Bretanya) i s'incuba a la foscor i a temperatura ambient durant 5 minuts més. Finalment, es realitza l'adquisició citomètrica d'un mínim de 100000 esdeveniments en el citòmetre de flux FACSCalibur (Becton Dickinson) i novament s'utilitza l'estratègia ISHAGE per identificar específicament la població CD34<sup>+</sup>, sobre la qual es realitza l'estudi del cicle cel·lular. Un punt crític en aquesta citometria és l'eliminació de doblets cel·lulars, els quals suposen un artefacte en la determinació del percentatge de cèl·lules en les fases del cicle cel·lular que es caracteritzen per presentar el doble de dotació genètica. L'anàlisi



posterior es realitza amb el programa FCS Express (De Novo, Los Angeles, CA, EEUU).



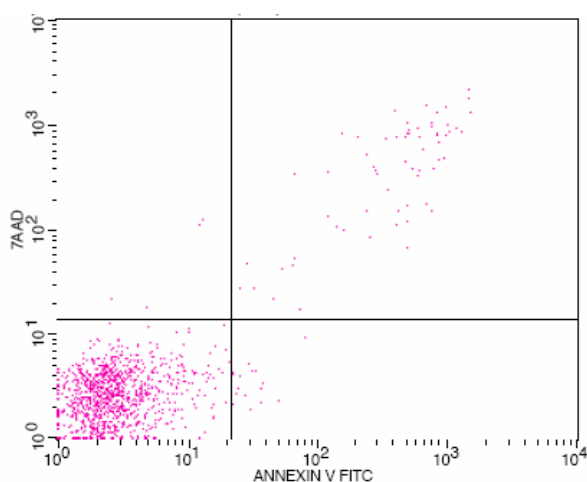
**Figura 8.1:** Exemple de l'estratègia seguida per a l'eliminació de dobles (esquerre) i el posterior anàlisi del cicle cel·lular en funció del contingut de DNA (dreta).

### 8.3.3. Viabilitat cel·lular

En una suspensió cel·lular es poden distingir dues formes de mort cel·lular: apoptòsis i necrosi. Gràcies a les característiques de cadascun d'aquests processos, és possible detectar mitjançant citometria de flux les poblacions que es troben en els diferents processos de mort cel·lular. L'apoptòsis es caracteritza perquè en els seus estadis inicials, es produeix una translocació de la fosfatidilserina des de l'interior de la membrana plasmàtica a l'exterior. L'Anexina V és una proteïna que s'uneix específicament a la fosfatidilserina de forma  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, de manera que mitjançant la utilització de l'Anexina V conjugada a un fluorocrom, és possible detectar les cèl·lules apoptòtiques mitjançant citometria de flux. Per altra banda, el procés de necrosi es caracteritza pels danys que es produeixen a la membrana cel·lular. La molècula 7-Amino-Actinomycin (7AAD) s'uneix específicament al DNA i pot penetrar a

l'interior de la cèl·lula únicament a través dels porus formats com a conseqüència del procés de necrosi, doncs la membrana cel·lular, en condicions normals, és impermeable a aquesta molècula. Així, les cèl·lules necròtiques queden marcades específicament amb la molècula 7AAD, el que permet la seva detecció mitjançant citometria de flux.

Per a la determinació de la viabilitat cel·lular del total de les cèl·lules del cultiu i, de forma més concreta, de la població CD34<sup>+</sup>, en primer lloc es duu a terme un rentat de les cèl·lules amb el tampó *Binding Buffer* (Becton Dickinson), una solució amb les concentracions de Ca<sup>2+</sup> òptimes per a la unió amb l'Anexina V. El *pellet* resultant de la centrifugació es ressuspend amb un volum de *Binding Buffer* determinat per tal de deixar les cèl·lules a una concentració de 1x10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. A continuació es dipositen 100 µL de la suspensió cel·lular resultant en un tub de citometria prèviament marcat amb 5 µL de CD45-APC, 10 µL de CD34-PE i 5 µL d'Anexina V-FITC (tots de Becton Dickinson). S'incuba durant 10 minuts a la foscor i a temperatura ambient i, transcorregut aquest període, s'afegeixen 5 µL de 7AAD (Becton Dickinson) i es deixa incubar 5 minuts més en les mateixes condicions. Posteriorment s'afegeixen 2 mL de *Binding Buffer* i es realitza una centrifugació a 340g durant 5 minuts. Finalitzada la centrifugació es descarta el sobrenedant i el *pellet* es ressuspend en 100 µL de *Binding Buffer*. Es realitza l'adquisició citomètrica amb l'equip FACSCalibur i els resultats s'analitzen amb el software CellQuest Pro. Com a control per establir el llindar de positivitat de la població viable s'utilitzen cèl·lules marcades únicament amb CD34-PE i CD45-APC.



**Figura 8.2:** Exemple de l'anàlisi citomètric realitzat per a la determinació de la viabilitat cel·lular de la població CD34<sup>+</sup>.

#### 8.3.4. Fenotip neutròfil

Per a la caracterització dels diferents estadis de diferenciació neutrofílica s'utilitzen els marcadors CD11b, CD15 i CD16 que, combinats entre ells, són característics de cadascuna de les etapes de diferenciació, tal com s'especifica a la taula següent:

	Promielòcit	Mielòcit / Metamielòcit	Band cell / Neutròfil madur
CD15	+	+	+
CD11b	-	+	+
CD16	-	-	+

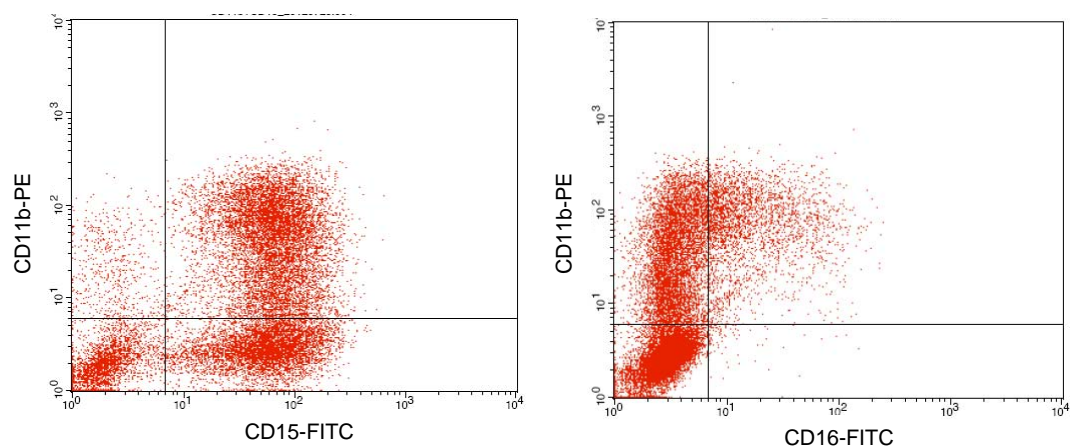
**Taula 8.1:** Detall del fenotip característic en cada etapa de diferenciació neutrofílica (Lund-Johansen and Terstappen, 1993).

Es realitzen un total de cinc marcatges, amb l'objectiu de generar els controls suficients per tal d'establir el llindar de positivitat de cadascuna de les poblacions:

	CD11b-PE	CD15-FITC	CD16-FITC
<b>Tub 1</b>	5 µL	-	-
<b>Tub 2</b>	-	5 µL	-
<b>Tub 3</b>	-	-	5 µL
<b>Tub 4</b>	5 µL	5 µL	-
<b>Tub 5</b>	5 µL	-	5 µL

**Taula 8.2:** Relació dels anticossos utilitzats en cadascun dels tubs, amb el seu volum corresponent. Els tubs 1, 2 i 3 s'utilitzen per establir els llindars de positivitats, i els 4 i 5 per a la determinació específica del fenotip. Tots els anticossos utilitzats són de Becton Dickinson.

De forma prèvia a la realització del marcatge, es realitza una etapa de bloqueig per tal d'evitar les interaccions inespecífiques. Es dipositen 100 µL de la suspensió cel·lular en cadascun dels tubs de citometria prèviament carregats amb 10 µL d'IgG murina (Invitrogen), que s'utilitza com a agent bloquejant. S'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient, i a continuació es dipositen els diferents anticossos, tal com s'especifica a la Taula 8.2. S'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient i a la foscor, i finalitzat aquest període es realitza un rentat amb 3 mL de PBS (Life Technologies) i una centrifugació de 340g. Es descarta el sobrenedant i el *pellet* es resuspèn amb 100 µL de PBS. L'adquisició citomètrica es realitza a l'equip FACSCalibur (Becton Dickinson), i l'anàlisi posterior amb el software CellQuest Pro (Becton Dickinson).



**Figura 8.3:** Exemple de l'anàlisi citomètric dut a terme per a la determinació del percentatge de precursors neutrofílics en els diferents graus de maduració.

### 8.3.5. MDSC

Per a la identificació de les MDSC, tant de llinatge granulocític com monocític, s'utilitza una de les combinacions fenotípiques proposades a la bibliografia (Gimeno and Barquinero, 2011):

	Fenotip
MDSC-granulocítiques	CD33 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup>
MDSC-monocítiques	CD33 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup>

**Taula 8.3:** Combinació fenotípica utilitzada per a la determinació del percentatge de cèl·lules mieloides supressores tant de llinatge granulocític com monocític.

Per tal de poder definir amb exactitud les poblacions cel·lulars aparegudes, es realitzen controls citomètrics del tipus FMO (de l'anglès *full minus one*). A la Taula 8.4 s'especifiquen les diferents combinacions utilitzades, a més dels marcatges complets.

		CD33-PE	HLA-DR- PerCP	CD15- FITC	HLA-DR- FITC	CD14- PerCP
MDSC- granulo.	Tub 1	5 µL	5 µL	-	-	-
	Tub 2	-	5 µL	5 µL	-	-
	Tub 3	5 µL	-	5 µL	-	-
	Tub 4	5 µL	5 µL	5 µL	-	-
MDSC- mono.	Tub 5	5 µL	-	-	5 µL	-
	Tub 6	5 µL	-	-	-	5 µL
	Tub 7	-	-	-	5 µL	5 µL
	Tub 8	5 µL	-	-	5 µL	5 µL

**Taula 8.4:** Detall de les combinacions d'anticossos utilitzats per a la identificació de les MDSC granulocítiques i monocítiques. Els tubs 1, 2 i 3, per una banda, i 5, 6 i 7, per altra banda, són els emprats per a l'establiment dels límits de positivitat de cada població. Els tubs 4 i 8 són els corresponents al marcatge complert per a la identificació de les MDSC granulocítiques i monocítiques, respectivament. Tots els anticossos utilitzats són de Becton Dickinson.

En primer lloc es realitza una etapa de bloqueig, i amb l'objectiu d'evitar interaccions inespecífiques, es dipositen 10 µL d'IgG murina (Invitrogen) en cadascun dels tubs de citometria en els que es realitzarà el marcatge. A continuació es dipositen 100 µL de la suspensió cel·lular d'estudi (prèviament ajustada a una concentració d' $1 \times 10^6$  CD45<sup>+</sup>/mL) en cadascun dels tubs, i s'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest període, es dipositen 5 µL de cadascun dels anticossos (Taula 8.4) en el seu tub corresponent i s'incuben durant 15 minuts a la foscor i a temperatura ambient. Finalitzada la incubació, es realitza una etapa de rentat: s'afegeixen 3 mL de PBS a cada tub i es centrifuguen durant 5 minuts a 340g. Es descarten els sobrenedants i es ressuspèn cada *pellet* amb 100 µL de PBS. L'adquisició citomètrica es realitza amb l'equip FACSCalibur (Becton Dickinson) i les dades s'analitzen amb el software CellQuest Pro (Becton Dickinson).

### 8.3.6. Fenotip CD34+ madur

La quantificació de cèl·lules hematopoètiques orientades a algun dels llinatges sanguinis es fa a partir de la combinació de l'anticòs CD34-FITC (Becton Dickinson), amb cadascun dels següents marcadors específics: CD19-PE, CD13-PE, CD33-PE, CD41a-PE, CD71-PE (tots els anticossos son de Becton Dickinson). Es dipositen 5 µL de l'anticòs CD34-FITC en cadascun dels tubs, i a continuació s'afegeixen 5 µL de cadascun dels anticossos en el seu tub corresponent. S'addicionen 100 µL de la suspensió cel·lular d'estudi i s'incuben durant 15 minuts a la foscor i a temperatura ambient. Finalitzada la incubació, es realitza una etapa de rentat per tal d'eliminar les possibles interaccions inespecífiques: s'afegeixen 3 mL de PBS a cada tub i es centrifuguen durant 5 minuts a 340g. Es descarten els sobrenedants i es ressuspèn cada *pellet* amb 100 µL de PBS. Es realitza l'adquisició citomètrica mitjançant l'equip FACSCalibur (Becton Dickinson) i les dades s'analitzen amb el software CellQuest Pro (Becton Dickinson). Per tal d'establir el llindar de positivitat de cadascuna de les poblacions, es realitza l'adquisició d'una mostra marcada únicament amb l'anticòs CD34-FITC i d'una mostra amb cèl·lules sense marcar.

### 8.3.7. Fenotip CD34+ immadur

La identificació de la població més primitiva de precursors hematopoètics es realitza en base a la determinació d'un dels fenotips que ha estat descrit com a característic d'aquest tipus cel·lular: CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> (Craig et al., 1993, Danet et al., 2001, Yin et al., 1997). Aquesta identificació es realitza mitjançant citometria de flux.

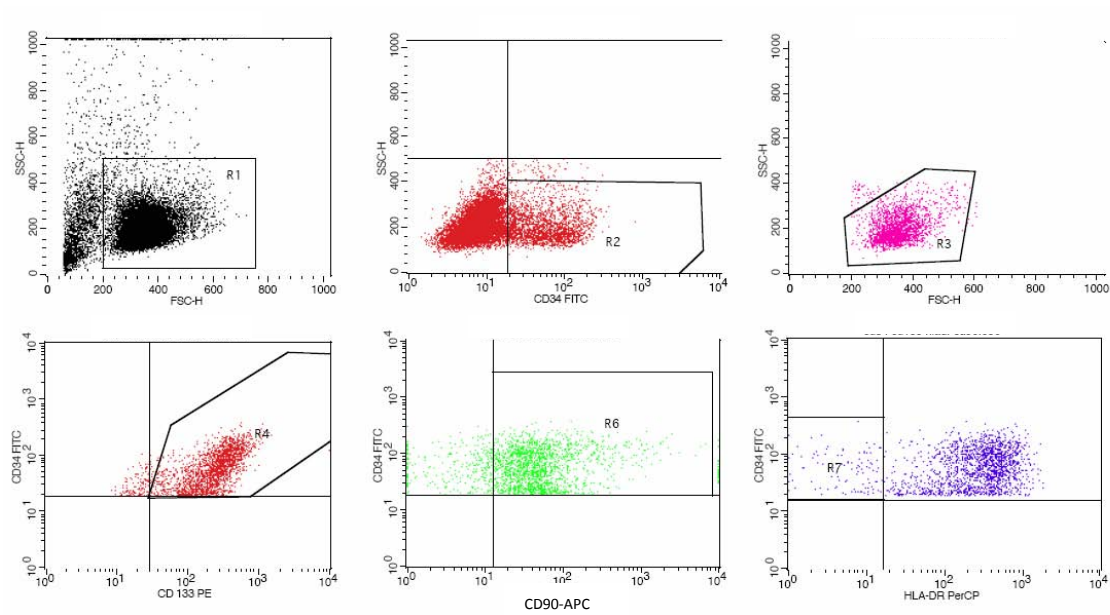
Es realitzen un total de quatre marcatges, amb l'objectiu de generar els controls suficients per tal d'establir el llindar de positivitat de cadascuna de les poblacions:

	CD34-FITC (BD)	CD133-PE (Miltenyi Biotec)	CD90-APC (BD)	HLA-DR- PerCP (BD)
<b>Tub 1</b>	5 µL	-	-	-
<b>Tub 2</b>	5 µL	5 µL	5 µL	
<b>Tub 3</b>	5 µL	5 µL	-	5 µL
<b>Tub 4</b>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

**Taula 8.5:** Combinació d'anticossos utilitzats per a la realització del fenotip CD34<sup>+</sup> immadur. Els tubs 1, 2 i 3 s'utilitzen com a controls per a establir els llindars de positivitat, i el tub 4 correspon al marcatge complet. BD: Becton Dickinson.

Es diposita la quantitat de cadascun dels anticossos en els tubs de poliestirè corresponents, tal com es detalla a la Taula 8.5. A continuació, s'afegeixen 100 µL de la suspensió cel·lular, i s'incuben durant 15 minuts a la foscor i a temperatura ambient. Transcorregut aquest període es procedeix a eliminar les possibles interaccions inespecífiques mitjançant un rentat. S'afegeixen 3 mL de PBS en cadascun dels tubs i es centrifuga a 340g durant 5 minuts. Finalitzada la centrifugació, es descarta el sobrenedant i es ressupèn el *pellet* en 100 µL de PBS. Es realitza l'adquisició citomètrica mitjançant l'equip FACSCalibur (Becton Dickinson) i les dades s'analitzen amb el software CellQuest Pro (Becton Dickinson).





**Figura 8.4:** Exemple de l'anàlisi citomètric dut a terme per a la determinació del percentatge de la població més primitiva de progenitors hematopoètics.

### 8.3.8. Determinació del grau de quimerisme humà en sang perifèrica murina

Per a la determinació del grau de quimerisme humà en sang de ratolí s'empra el marcatge específic de les cèl·lules humanes per una banda, i de les cèl·lules murines per l'altra, en base a l'antigen leucocitari comú de cadascuna de les espècies (CD45). De forma complementària, per tal d'estudiar el llinatge al qual pertanyen les cèl·lules humanes generades, s'utilitza una combinació d'anticossos específics dels diferents llinatges sanguinis humans. A la Taula 8.6 s'especifiquen les combinacions d'anticossos utilitzades en cada marcatge.

Marcatge 1	Marcatge 2
15 µL CD45-APC anti-humà	15 µL CD45-APC anti-humà
5 µL CD45-PerCP anti-murí	5 µL CD45-PerCP anti-murí
15 µL CD3-PB anti-humà	15 µL CD16-FITC anti-humà
15 µL CD13-PE anti-humà	15 µL CD41a-PE anti-humà
15 µL CD15-FITC anti-humà	-

**Taula 8.6:** Combinació d'anticossos utilitzats en cadascun dels marcatges de la sang perifèrica murina. Per tal d'identificar els leucòcits humans s'utilitza el marcador CD45 anti-humà conjugat a APC, i per tal d'identificar els anticossos murins, s'utilitza el marcador anti-murí conjugat a PerCP. A més, s'utilitza una bateria d'anticossos específics per les cèl·lules humanes per tal de determinar-ne el llinatge. Tots els anticossos són de Becton Dickinson.

Es diposita el volum de cadascun dels anticossos en el seu tub de poliestirè corresponent. A continuació, s'afegeixen 100 µL de la mostra de sang a analitzar a cadascun dels tubs, i s'incuba durant 15 minuts a la foscor i a temperatura ambient. Finalitzada la incubació, es realitza una etapa de lisi, per tal d'eliminar els eritròcits i evitar així la seva interferència en la citometria. Amb aquesta finalitat, s'afegeixen 2 mL d'una solució de lisi basada en clorur d'amoni (Becton Dickinson) a cada tub, i s'homogeneïtza mitjançant la utilització del vòrtex (Scientific Industries, EEUU). La incubació té una durada de 10 minuts, i a continuació es realitza una centrifugació a 330g durant 5 minuts. Es descarta el sobrenedant i el *pellet* es ressuspèn amb 3 mL de PBS. Es realitza de nou una altra etapa de centrifugació a les mateixes condicions, i finalment es descarta el sobrenedant i es ressuspèn el *pellet* amb 100 µL de PBS. Es realitza l'adquisició citomètrica d'un total de 100000 esdeveniments mitjançant l'equip FACSCanto (Becton Dickinson), i el posterior anàlisi es duu a terme amb el programa FACSDiva (Becton Dickinson).

### 8.3.9. Determinació del grau de quimerisme humà en moll d'os murí

Les cèl·lules humanes de moll d'os es caracteritzen per presentar una quantitat molt elevada de receptors Fc a les seves membranes. La presència d'aquests receptors pot provocar una interacció inespecífica per la regió constant de l'anticòs anti-CD45 murí, fet que provocaria que aparegués una població cel·lular marcada amb l'anticòs CD45 humà, però amb un lleuger co-marcatge pel CD45 murí. Per tal d'evitar aquest fenomen, es realitza una etapa de bloqueig mitjançant la utilització de IgG de rata. De forma addicional, es realitza un control isotípic.

Es realitzen els mateixos marcatges que en la sang perifèrica (Taula 8.6), a més del control isotípic. A la Taula 8.7 s'especifiquen les combinacions d'anticossos utilitzades pel control isotípic.

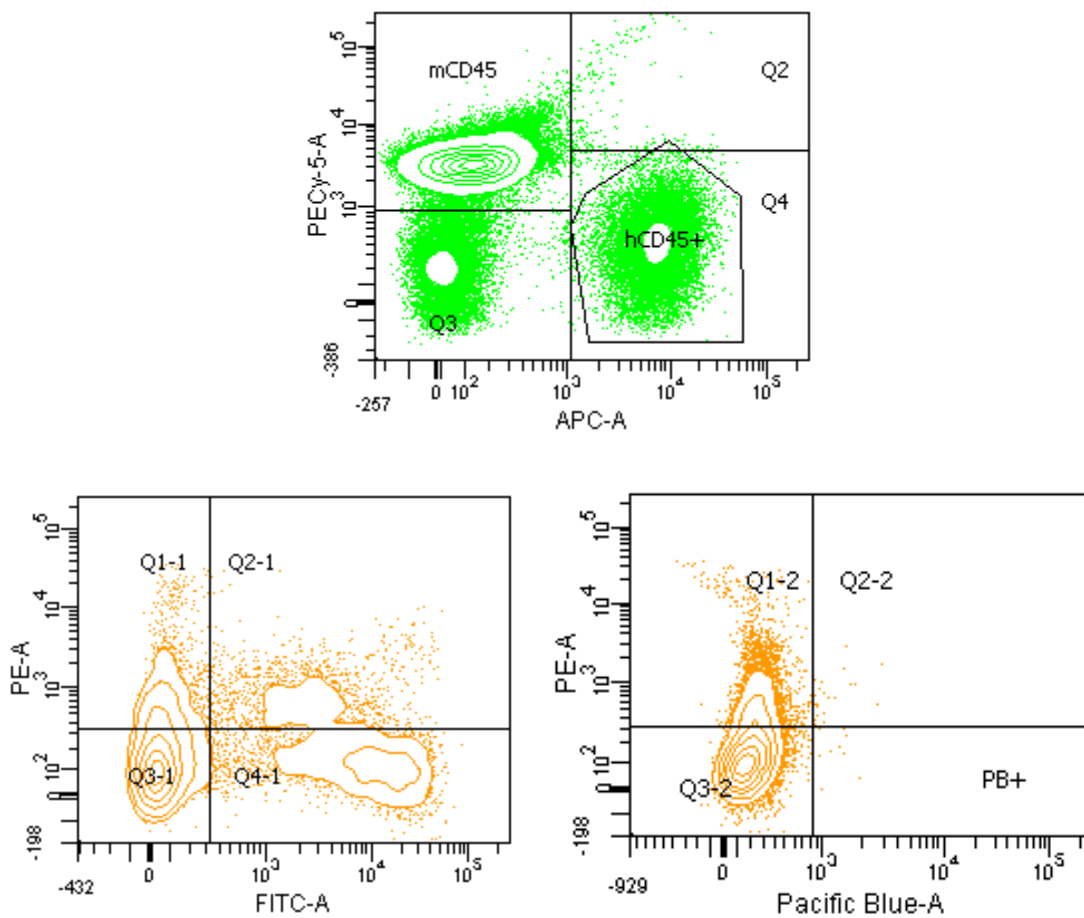
Control isotípic
15 µL CD45-APC anti-humà
5 µL IgG2bk Rat PerCP

**Taula 8.7:** Anticossos utilitzats pel control isotípic dut a terme durant la determinació del grau de quimerisme en moll d'os murí. Tots els anticossos utilitzats són de Becton Dickinson.

Tenint en compte que en el procés d'obtenció del moll d'os es realitza una etapa de lisi dels eritròcits, en aquest cas, a diferència de les mostres de sang perifèrica, s'omet l'etapa de lisi durant el marcatge citomètric.

En primer lloc, i de forma prèvia al marcatge, es realitza l'etapa de bloqueig: es disposen 10 µL d'IgG de rata (Invitrogen) en cadascun dels tubs de poliestirè on es realitzarà el marcatge. A continuació, s'afegeixen 100 µL en cada tub de la suspensió cel·lular provinent del moll d'os, i s'incuba durant 10 minuts. Finalitzada la incubació,

s'afegeixen cadascun dels anticossos tal com es detalla a la Taula 8.6 i Taula 8.7. S'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient i a la foscor, i a continuació s'afegeixen 3 mL de PBS per l'etapa de rentat. En centrifuga durant 5 minuts a 330g, es descarta el sobrenedant i els *pellets* es ressuspenen amb 100  $\mu$ L de PBS. Es realitza l'adquisició citomètrica d'un total de 200000 esdeveniments mitjançant l'equip FACSCanto (Becton Dickinson), i el posterior anàlisi es duu a terme amb el programa FACSDiva (Becton Dickinson).



**Figura 8.5:** Exemple de l'anàlisi citomètric dut a terme per a la determinació del grau de quimerisme humà en moll d'os murí. A la imatge superior, es determina el percentatge de cèl·lules humanes en base a l'expressió del marcador leucocitari comú humà (CD45). A les imatges inferiors, es determina el llinatge específic de les cèl·lules humanes en base a l'expressió dels marcadors CD3, CD13, CD15, CD16 i CD41a.

### 8.3.10. Càlcul del grau de quimerisme humà

Per calcular el grau de quimerisme humà tant en sang perifèrica com en moll d'os, s'aplica la següent fórmula:

$$\% \text{ quimerisme humà} = \frac{\text{n}^\circ \text{ d'esdeveniment hCD45-APC}}{\text{n}^\circ \text{ d'esdeveniments hCD45-APC} + \text{n}^\circ \text{ d'esdeveniments mCD45-PerCP}} \times 100$$

## 8.4. Assajos funcionals *in vitro*

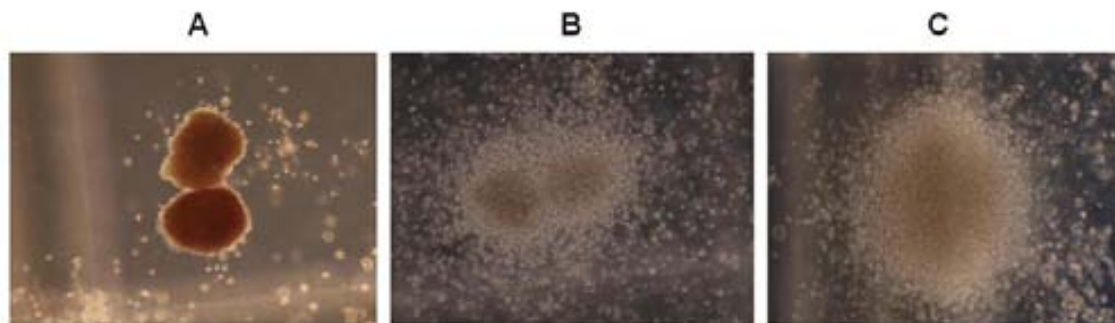
### 8.4.1. Cultius clonogènics

Els cultius clonogènics són els assajos funcionals *in vitro* més àmpliament utilitzats per tal de quantificar els progenitors hematopoètics d'una suspensió cel·lular. Aquests es basen en la sembra de les cèl·lules en un medi semisòlid enriquit, de manera que les cèl·lules progenitores són capaces de generar la seva progènie en un període d'entre 7 i 15 dies. Degut a les característiques del medi de cultiu, el creixement cel·lular es caracteritza per la formació de colònies, de manera que és possible quantificar el nombre de colònies aparegudes i, per extensió, la proporció de progenitors en la suspensió cel·lular d'inici.

En primer lloc es prepara la suspensió cel·lular d'estudi a una concentració de 1000 CD34<sup>+</sup>/mL en el medi IMDM + 2% FBS (StemCell Technologies, Vancouver, Canadà). A continuació, es dipositen 0,3 mL d'aquesta suspensió cel·lular en un tub cònic amb 3 mL de MethoCult Classic (StemCell Technologie) i s'homogeneïtza mitjançant l'ús del vòrtex. Se n'aspiren 2,2 mL mitjançant l'ús d'una xeringa i una agulla, i es dispensen 1,1 mL en dues plaques de petri de 35 mm de diàmetre (StemCell Technologies), de manera que s'hauran sembrat 100 CD34<sup>+</sup> per placa. Es reparteix homogèniament el contingut per tota la placa, i es col·loquen en una placa de petri de 20 cm de diàmetre amb dues plaques més de 35 mm de diàmetre amb aigua. S'incuba durant 14-16 dies

a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, i transcorregut aquest període, es realitza el recompte i la classificació de les colònies mitjançant microscòpia òptica a 200X. La classificació realitzada es basa en la morfologia de les cèl·lules que integren cada colònia:

- CFU-E: colònia formada pel progenitor eritroide. Formada per 1 o 2 *clusters* que contenen un total de 8-200 eritroblasts. Lleugerament vermelloses.
- BFU-E: colònia formada pel progenitor eritroide més immadur que el formador de les CFU-E. Formada per >200 cèl·lules distribuïdes en 1 o 2 *clusters*. De color vermell intens.
- CFU-GM: colònia formada pel progenitor granulocític i macròfag. Poden contenir des de 20 fins a centenars de cèl·lules en 1 o múltiples *clusters*.
- CFU-GEMM o CFU-Mix: colònia formada pel progenitor comú mieloide. Múltiples *clusters* formats per eritroblastes, granulòcits, macròfags i megacariòcits. >500 cèl·lules.



**Figura 8.6:** Imatges preses d'algunes de les colònies observades (200X). A: colònia del tipus BFU-E. B-C: colònies del tipus CFU-GM.

### 8.4.2. Càlcul de l'eficiència clonogènica

Els resultats obtinguts es presenten en forma d'eficiència clonogènica. El càlcul es realitza mitjançant la següent expressió:

$$\text{Eficiència clonogènica} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colònies recomptades}}{\text{n}^\circ \text{ de cèl·lules CD34+ sembrades}} \times 100$$

### 8.4.3. Càlcul del factor d'expansió clonogènica

El càlcul del factor d'expansió clonogènica es realitza a partir de la diferència entre l'eficiència clonogènica a l'inici i final del cultiu, i del factor d'expansió de la població CD34+ obtingut al final del cultiu, calculat segons l'expressió:

$$\text{Factor d'expansió clonogènica} = \frac{\text{Eficiència clonogènica final}}{\text{Eficiència clonogènica inicial}} \times \text{Factor d'expansió CD34+}$$

### 8.4.4. Determinació de la capacitat fagocítica

Per a la determinació *in vitro* de l'activitat fagocítica dels precursors neutrofilics generats, s'empren unes microesferes carboxilades grogues-verdes de 2 µm de diàmetre (Invitrogen) que, al ser fagocitades per les cèl·lules, aquestes poden ser detectades mitjançant citometria de flux a partir de la fluorescència emesa per les pròpies microesferes.

En primer lloc, s'ajusta la suspensió cel·lular d'estudi a una concentració d' $1 \times 10^6$  CD45<sup>+</sup>/mL en medi HP01 (MacoPharma) en un tub cònic de 15 mL de capacitat. A continuació s'afegeixen les microesferes a una proporció 1:10 (cèl·lules : microesferes) i s'incuben durant 2 hores a 37°C i en agitació (MACSMix, Miltenyi Biotec). Finalitzat aquest període d'incubació, i amb l'objectiu de desenganxar les microesferes que hagin pogut quedar retingudes a la membrana cel·lular sense ser fagocitades,

s'afegeix 1 mL d'una solució de tripsina al 0,05% (Invitrogen) i s'incuba durant 5 minuts a 37°C. A continuació, i per tal de neutralitzar l'efecte de la tripsina, s'afegeixen 2 mL de PBS (Life Technologies) complementat al 10% v/v amb albúmina humana (Grífols, Barcelona, Catalunya). Finalment es centrifuga durant 5 minuts a 340g, es descarta el sobrenedant i el *pellet* resultant es ressuspèn amb 0,5-1 mL de PBS. Es transfereixen 200 µL a un tub de poliestirè, i es realitza l'adquisició citomètrica mitjançant l'equip FACSCalibur (Becton Dickinson). La detecció de les cèl·lules fagocítiques es realitza a través del canal FL1, ja que les microesferes emeten a una longitud d'ona de 515 nm.

De forma complementària a la citometria de flux, es duu a terme la observació de les cèl·lules fagocítiques mitjançant microscòpia confocal per tal de verificar que efectivament les microesferes han estat internalitzades per les cèl·lules i no han quedat retingudes a les seves membranes. Aquesta determinació es realitza al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Catalunya). En primer lloc, es dipositen 250 µL de la suspensió cel·lular en un microtub, i a continuació s'hi afegeixen 0,25 µL del reactiu "Cell Mask", el qual s'uneix específicament a la membrana plasmàtica. S'homogeneïtza i s'incuba durant 5 minuts a la foscor. Amb l'objectiu d'eliminar l'excés de colorant, es realitza una centrifugació durant 5 minuts a 300g. Finalment, es descarta el sobrenedant i es ressuspèn el *pellet* amb 250 µL de PBS (Life Technologies). A continuació es dipositen 100 µL en una placa de Petri de 35 mm de diàmetre amb la base de vidre i s'observa la preparació a través del microscopi confocal (Leica, Solms, Alemanya).



#### 8.4.5. Determinació de la capacitat immunomoduladora

Per a la determinació de la capacitat immunomoduladora de les MDSC resultants del cultiu d'expansió s'utilitza un assaig *in vitro* consistent en un cultiu mixte limfocitari, en el qual s'avalua la capacitat inhibidora de les cèl·lules d'estudi sobre la proliferació limfocitària. L'assaig es fonamenta en la detecció del colorant CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) en el citoplasma limfocitari, els nivells del qual són inversament proporcionals a la capacitat proliferativa dels limfòcits degut a la seva pèrdua progressiva en cada divisió cel·lular.

##### I. Marcatge amb CFSE:

En primer lloc, es realitza la tinció amb CFSE (Invitrogen) de la fracció mononuclear prèviament aïllada d'un residu leucocitari i ajustada a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl·lules/mL. S'afegeixen 0,25  $\mu$ L de CFSE per cada 1 mL de suspensió cel·lular i s'incuba durant 10 minuts a la foscor i a temperatura ambient. A continuació es realitza un rentat mitjançant una etapa de centrifugació (340g durant 10 minuts) emprant PBS (Life Technologies) a una proporció volumètrica de 5:1 (PBS : suspensió cel·lular). El *pellet* resultant es ressuspen amb medi de cultiu (DMEM [Life Technologies] complementat amb un 10% v/v de sèrum humà [Banc de Sang i Teixits]), per tal de que quedi a una concentració de  $10 \times 10^6$  cèl·lules/mL aproximadament, i es realitza una sembra en flascons T150 (Corning) (20 mL de suspensió cel·lular per cada flascó). L'objectiu de la sembra és doble: per una banda, permetre que s'estabilitzi el marcatge amb el CFSE i, per altra banda, dur a terme un enriquiment de la fracció limfocitària a partir de l'adherència al plàstic dels monòcits de la fracció mononucleada. La incubació té una durada de 12-24h a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, i transcorregut aquest període, es recull el

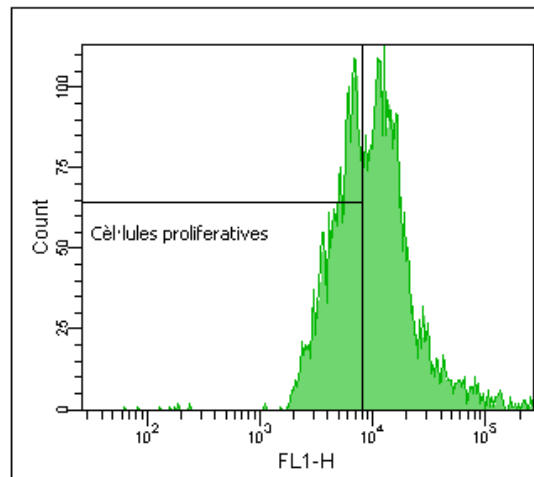
sobrenedant del cultiu i es realitza un recompte cel·lular i una valoració de la intensitat i eficiència del marcatge mitjançant citometria de flux.

## II. Cultiu mixte limfocitari amb les MDSC

Per a la sembra del cultiu mixte s'empren plaques de cultiu de 24 pous (Corning) i s'utilitzen les següents proporcions cel·lulars: 1:1, 2:1, 5:1 i 10:1 (limfòcits:MDSC), mantenint sempre fixat el nombre de limfòcits per pou ( $5 \times 10^5$  limfòcits) i, variant per tant, el nombre de cèl·lules MDSC. Durant el procés de sembra s'afegeix un estímul policlonal per tal d'induir la proliferació del limfòcits, el qual consisteix en PMA (10 ng/mL) i ionomicina (100 ng/mL) (ambdós de Sigma, St. Louis, Missouri, EEUU). La sembra es realitza per triplicat i com a controls s'utilitzen limfòcits amb estímul, limfòcits sense estímul, i la combinació de limfòcits i MDSC sense estímul. La incubació es duu a terme durant 6 dies a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

## III. Avaluació de la capacitat immunomoduladora de les MDSC

Transcorreguts els 6 dies de cultiu es determina l'activitat immunomoduladora de les MDSC mitjançant citometria de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson). Aquesta determinació es realitza en base al percentatge de limfòcits que han perdut la intensitat inicial del marcatge per CFSE com a conseqüència de la seva proliferació.



**Figura 8.7:** Exemple de la determinació citomètrica per a l'estudi de la proliferació limfocitària en base a la pèrdua del marcatge per CFSE. Les cèl·lules proliferatives són les que presenten una intensitat de fluorescència menor en el canal FL1 (canal pel qual es detecta l'emissió del CFSE).

### 8.5. Mesura de la concentració de glucosa/làctic

Per a la mesura del contingut de glucosa i làctic en el sobrenedant resultant d'un cultiu cel·lular, s'empra l'aparell YSI 2700 Select (YSI Life Sciences, Ohio, EEUU). Aquest aparell és un analitzador bioquímic que, a partir de la utilització de membranes enzimàtiques específiques per a la detecció de D-glucosa i L-lactat, és capaç de reportar-ne la concentració. De forma prèvia a l'anàlisi, es realitza una centrifugació de la mostra (5 minuts, 340g) amb l'objectiu d'eliminar les restes cel·lulars, les quals podrien obstruir els conductes de l'analitzador. Per a cada mesura, s'extreuen aproximadament 0,5-1 mL de mostra del sobrenedant del cultiu cel·lular d'estudi.

### 8.6. Mesura de pH

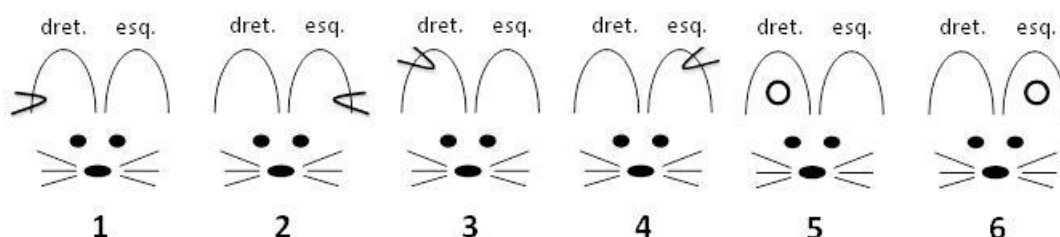
Per a la mesura del pH d'un cultiu cel·lular s'utilitza l'equip micropH 2001 (CRISON, Alella, Catalunya). Per a cada mesura s'utilitzen 3-5 mL del sobrenedant del cultiu

cel·lular d'estudi, als qual se'ls hi ha eliminat prèviament la biomassa mitjançant una etapa de centrifugació (340g durant 5 minuts).

## 8.7. Estudis d'empelt de cèl·lules humanes en ratolins immunodeficients *NOD-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>*

### 8.7.1. Model murí

El model murí *NOD-scid* és un model animal àmpliament utilitzat i caracteritzat en l'estudi de l'empelt de cèl·lules mare hematopoètiques humanes (Greiner et al., 1998, Shultz et al., 2005). La idoneïtat d'aquest model es deu a la immunodeficiència severa que presenta, la qual permet trasplantar cèl·lules humanes i que aquestes no siguin rebutjades (Brehm et al., 2010). Per a la realització de l'estudi s'utilitzen femelles *NOD-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup>* (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EEUU) de 8-15 setmanes d'edat i 30 grams de pes. Degut a la seva immunodeficiència, aquests animals són estabulats en zones *Specific Pathogen Free* (SPF) de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (Badalona, Catalunya). Es mantenen amb una dieta estàndard composta per pinso (Harland Ibérica, Barcelona, Catalunya) i aigua de xarxa estèril *ad limitum*. La identificació dels diferents animals d'una mateixa gàbia segueix el patró que s'esquematitza a la Figura 8.8:



**Figura 8.8:** Esquema de la identificació mitjançant marca a l'orella dels animals estabulats en una mateixa gàbia.

Els estudis d'experimentació animal duts a terme han estat aprovats pel Comitè Ètic de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol, amb el número de registre 5656.

Durant el transcurs de l'estudi, els animals han estat sotmesos a una inspecció veterinària setmanal per part del personal de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Catalunya).

De forma prèvia al trasplantament (entre 2 i 4 hores, aproximadament) els animals s'acondicionen mitjançant una irradiació subletal de 2 Gy mitjançant la utilització d'una font de  $^{137}\text{Cs}$  (Schering, model: IBL 437 C).

### **8.7.2. Preparació de les dosis d'injecció i transferència als animals**

Les dosis d'injecció consisteixen en  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> en un volum de 200  $\mu\text{L}$  de solució salina fisiològica (BBraun, Melsungen, Alemanya).

En primer lloc, es diposita el volum necessari de suspensió cel·lular en un tub cònic per tal de preparar el nombre de dosis d'injecció necessàries a  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> cadascuna. Es realitzen dos rentats consecutius amb PBS (Life Technologies) mitjançant centrifugacions a 330g durant 10 minuts. El *pellet* resultant de l'última centrifugació es ressuspend amb el volum necessari de solució de salina fisiològica per tal de generar el nombre de dosis necessàries de 200  $\mu\text{L}$  cadascuna. A continuació, mitjançant una micropipeta, es transfereixen 200  $\mu\text{L}$  de la suspensió cel·lular resultant en un microtub, i d'aquí s'aspira a l'interior d'una xeringa amb agulla de 5 mm. Es repeteix la mateixa operació tantes vegades com dosis a preparar. Finalment, s'emboliquen totes les xeringues en dues talles quirúrgiques estèrils i es transporten a l'estabulari. Des de la preparació de les dosis d'injecció fins a la transferència als

animals, no transcórrer més d'una hora. La transferència es fa a partir de la injecció per vena de la cua.

### 8.7.3. Sacrifici i extracció de mostres

En els períodes de temps establerts (1, 2, 3, 4 i 8 setmanes post-trasplantament), es realitza el sacrifici dels animals per dislocació cervical després de l'administració d'anestèsic volàtil Isoflurà (Abbot Animal Health, Illinois, EEUU). Per una banda, les mostres de sang perifèrica s'extreuen a partir de punció intracardíaca mitjançant una xeringa prèviament heparinitzada. S'extreuen un total de 200-400 µL de sang. Per altra banda, les mostres de moll d'os s'obtenen a partir de la circulació de medi RPMI (PAA, Pasching, Àustria) + 10% FBS (Gibco) a través de la cavitat interior dels fèmurs. Una vegada obtingut el moll d'os, es realitza una concentració cel·lular a partir d'una centrifugació a 330g durant 5 minuts a 4°C. El *pellet* resultant es ressuspèn amb 10 mL d'una solució d'hemòlisi consistent en 3,735 g NH<sub>4</sub>Cl (Merck, Darmstadt, Alemanya) i 1,0297 g TrisBase (Sigma) en 500 mL d'aigua destil·lada. S'incuba durant 5 minuts a 4°C i seguidament es realitzen dos rentats consecutius amb 10 mL de PBS i mitjançant centrifugacions a 330g durant 5 minuts a 4°C. Finalment, les cèl·lules resultants es ressuspensen en 200-500µL de PBS.

### 8.7.4. Necròpsia

La necròpsia és realitzada per personal veterinari de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Catalunya). En ella s'examinen de forma tant macroscòpica com microscòpica els següents òrgans: intestí prim i gruixut, pàncrees, fetge, melsa, ronyons, úter, pulmons, cor i encèfal. Per a l'examinació microscòpica, les mostres dels teixits són fixades amb paraformaldehid 4% (Sigma) a temperatura ambient, durant 24 hores i posteriorment parafinitzades. Finalment, es realitzen talls histològics

de 4 µm mitjançant la utilització d'un microtom i es tenyeixen amb hematoxilina/eosina (Sigma).

#### **8.7.5. Immunohistoquímica**

La immunohistoquímica s'externalitza al centre de diagnòstic veterinari Anapath (Granada, Espanya). La tècnica es duu a terme en base a la tinció específica de mitocondris humans mitjançant un anticòs antimitocondrial humà (clon: 113-1) (AbCam, Cambridge, Regne Unit) sobre talls histològics dels següents òrgans murins: intestí prim i gruixut, pàncrees, fetge, melsa, ronyons, úter, pulmons, cor i encèfal. Com a agent de revelat s'utilitza el kit ARK-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) i es realitza una contratinció amb hematoxilina (Sigma).

#### **8.8. Estudis citogenètics**

Els estudis citogenètics s'externalitzen al Laboratori de Citogenètica Molecular del Servei de Patologia de l'Hospital del Mar (Barcelona, Catalunya). Com a factor per aturar les cèl·lules en metafase s'utilitza el reactiu Colcemid, el qual actua a partir de la inhibició en la formació dels microtubs en el citoplasma cel·lular.





# 9

## Referències bibliogràfiques



- ADEEGBE, D., SERAFINI, P., BRONTE, V., ZOSO, A., RICORDI, C. & INVERARDI, L. 2011. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell transplantation*, 20, 941-954.
- ALVARADO-MORENO, A., CHÁVEZ-GONZÁLEZ, A., CÉRBULO, A., ARRIAGA, L. & MAYANI, H. 2010. In vitro cell cycle dynamics of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Hematology*, 15, 11-20.
- ARAKI, H., MAHMUD, N., MILHEM, M., NUNEZ, R., XU, M., BEAM, C. A. & HOFFMAN, R. 2006. Expansion of human umbilical cord blood SCID-repopulating cells using chromatin-modifying agents. *Experimental hematology*, 34, 140-149.
- BARKER, J. N., KREPSKI, T. P., DEFOR, T. E., DAVIES, S. M., WAGNER, J. E. & WEISDORF, D. J. 2002. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 8, 257-260.
- BARKER, J. N. & WAGNER, J. E. 2003. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Critical reviews in oncology/hematology*, 48, 35-43.
- BARKER, J. N., WEISDORF, D. J., DEFOR, T. E., BLAZAR, B. R., MCGLAVE, P. B., MILLER, J. S., VERFAILLIE, C. M. & WAGNER, J. E. 2005. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*, 105, 1343-1347.
- BITTENCOURT, H., ROCHA, V., CHEVRET, S., SOCIÉ, G., ESPÉROU, H., DEVERGIE, A., DAL CORTIVO, L., MAROLLEAU, J.-P., GARNIER, F. & RIBAUD, P. 2002. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*, 99, 2726-2733.
- BOIRON, J. M., DAZEY, B., CAILLIOT, C., LAUNAY, B., ATTAL, M., MAZURIER, F., MCNIECE, I. K., IVANOVIC, Z., CARAUX, J. & MARIT, G. 2006. Large-scale expansion and transplantation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells: in vitro and in vivo confirmation of neutropenia abrogation related to the expansion process without impairment of the long-term engraftment capacity. *Transfusion*, 46, 1934-1942.
- BONNET, D., LEMOINE, F., NAJMAN, A. & GUIGON, M. 1995. Comparison of the inhibitory effect of AcSDKP, TNF-alpha, TGF-beta, and MIP-1 alpha on marrow-purified CD34<sup>+</sup> progenitors. *Experimental hematology*, 23, 551.
- BORNSTEIN, R., FLORES, A. I., MONTALBAN, M., DEL REY, M. J., DE LA SERNA, J. & GILSANZ, F. 2005. A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. *Stem cells*, 23, 324-334.
- BREHM, M. A., CUTHBERT, A., YANG, C., MILLER, D. M., DIORIO, P., LANING, J., BURZENSKI, L., GOTT, B., FOREMAN, O. & KAVIRAYANI, A. 2010. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: Analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the *IL2r $\gamma$*  null mutation. *Clinical Immunology*, 135, 84-98.
- BROWN, J. A. & BOUSSIOTIS, V. A. 2008. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clinical Immunology*, 127, 286-297.
- BROXMEYER, H. 2010. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation (May 26, 2010), StemBook, ed. *The Stem Cell Research Community, Stem-Book*, doi/10.3824/stembook, 1.
- BROXMEYER, H., COOPER, S., HAGUE, N., BENNINGER, L., SARRIS, A., CORNETTA, K., VADHANRAJ, S., HENDRIE, P. & MANTEL, C. 1995. Human chemokines: enhancement of specific activity and effects in vitro on normal and leukemic progenitors and a factor-dependent cell line and in vivo in mice. *Annals of hematology*, 71, 235-246.

- BROXMEYER, H., COOPER, S., HASS, D., HATHAWAY, J., STEHMAN, F. & HANGOC, G. 2009. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation*, 44, 627-633.
- BRUNSTEIN, C., BARKER, J., WEISDORF, D., DEFOR, T., MCKENNA, D., CHONG, S., MILLER, J., MCGLAVE, P. & WAGNER, J. 2009. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone marrow transplantation*, 43, 935-940.
- BRUNSTEIN, C. G., BARKER, J. N., WEISDORF, D. J., DEFOR, T. E., MILLER, J. S., BLAZAR, B. R., MCGLAVE, P. B. & WAGNER, J. E. 2007. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood*, 110, 3064-3070.
- BRUNSTEIN, C. G., GUTMAN, J. A., WEISDORF, D. J., WOOLFREY, A. E., DEFOR, T. E., GOOLEY, T. A., VERNERIS, M. R., APPELBAUM, F. R., WAGNER, J. E. & DELANEY, C. 2010. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood*, 116, 4693-4699.
- BRYDER, D., ROSSI, D. J. & WEISSMAN, I. L. 2006. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American journal of pathology*, 169, 338-346.
- BUESSOW, S. C., PAUL, R. D. & LOPEZ, D. M. 1984. Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 73, 249-255.
- CABRITA, G. J., FERREIRA, B. S., DA SILVA, C. L., GONÇALVES, R., ALMEIDA-PORADA, G. & CABRAL, J. 2003. Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *TRENDS in Biotechnology*, 21, 233-240.
- CARRAL, A., DE LA RUBIA, J., MARTIN, G., MARTINEZ, J., SANZ, G., JARQUE, I., SEMPERE, A., SOLER, M., MARTY, M. & SANZ, M. 2002. Factors influencing hematopoietic recovery after autologous blood stem cell transplantation in patients with acute myeloblastic leukemia and with non-myeloid malignancies. *Bone marrow transplantation*, 29, 825-832.
- CASHMAN, J., EAVES, C., SARRIS, A. & EAVES, A. 1998. MCP-1, not MIP-1 $\alpha$ , is the endogenous chemokine that cooperates with TGF- $\beta$  to inhibit the cycling of primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood*, 92, 2338-2344.
- CASTELLO, S., PODESTÀ, M., MENDITTO, V. G., IBATICI, A., PITTO, A., FIGARI, O., SCARPATI, D., MAGRASSI, L., BACIGALUPO, A. & PIAGGIO, G. 2004. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Experimental hematology*, 32, 782-787.
- CHALMERS, I., JANOSSY, G., CONTRERAS, M. & NAVARRETE, C. 1998. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood*, 92, 11-18.
- COOPER, G. M., HAUSMAN, R. E. & WRIGHT, N. 2002. *La célula*, Marbán.
- COURIEL, D., CALDERA, H., CHAMPLIN, R. & KOMANDURI, K. 2004. Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer*, 101, 1936-1946.
- CRAIG, W., KAY, R., CUTLER, R. L. & LANSDORP, P. M. 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*, 177, 1331-1342.
- CSASZAR, E., COHEN, S. & ZANDSTRA, P. W. 2012a. Blood stem cell products: Toward sustainable benchmarks for clinical translation. *BioEssays*.
- CSASZAR, E., KIROUAC, D. C., YU, M., WANG, W., QIAO, W., COOKE, M. P., BOITANO, A. E., ITO, C. & ZANDSTRA, P. W. 2012b. Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling. *Cell Stem Cell*, 10, 218-229.
- CUTLER, C. & BALLEEN, K. K. 2012. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: State of the art. *Blood reviews*.

- DANET, G. H., LEE, H. W., LUONGO, J. L., SIMON, M. C. & BONNET, D. A. 2001. Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells after ex vivo expansion. *Experimental hematology*, 29, 1465-1473.
- DE BRUYN, C., DELFORGE, A., BERNIER, M. & BRON, D. 2003. Ex vivo expansion of neutrophil precursor cells from fresh and cryopreserved cord blood cells. *Cytotherapy*, 5, 87-98.
- DE BRUYN, C., DELFORGE, A., MARTIAT, P. & BRON, D. 2005. Ex vivo expansion of neutrophil precursor cells from mobilized peripheral blood cells: similar results in cancer patients and normal donors. *Cytotherapy*, 7, 470-477.
- DE LIMA, M., MCMANNIS, J., GEE, A., KOMANDURI, K., COURIEL, D., ANDERSSON, B., HOSING, C., KHOURI, I., JONES, R. & CHAMPLIN, R. 2008. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone marrow transplantation*, 41, 771-778.
- DE LIMA, M., MCNIECE, I., ROBINSON, S. N., MUNSELL, M., EAPEN, M., HOROWITZ, M., ALOUSI, A., SALIBA, R., MCMANNIS, J. D. & KAUR, I. 2012. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *New England Journal of Medicine*, 367, 2305-2315.
- DE LIMA, M., ROBINSON, S., MCMANNIS, J., ALOUSI, A. M., SALIBA, R. M., MUNSELL, M., KEBRIAIEI, P., HOSING, C., PARMAR, S. & COOPER, L. Year. Mesenchymal stem cell (MSC) based cord blood (CB) expansion (Exp) leads to rapid engraftment of platelets and neutrophils. *In: Blood*, 2010. AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA, 164-164.
- DELANEY, C., HEIMFELD, S., BRASHEM-STEIN, C., VOORHIES, H., MANGER, R. L. & BERNSTEIN, I. D. 2010. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nature medicine*, 16, 232-236.
- DELANEY, M. & BALLEEN, K. K. 2010. The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 23, 179-187.
- DOMEN, J., WAGERS, A. & WEISSMAN, I. L. 2006. 2. BONE MARROW (HEMATOPOIETIC) STEM CELLS. *Regenerative medicine*, 13.
- DOMEN, J. & WEISSMAN, I. L. 1999. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Molecular medicine today*, 5, 201-208.
- DORRELL, C., GAN, O. I., PEREIRA, D. S., HAWLEY, R. G. & DICK, J. E. 2000. Expansion of human cord blood CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*, 95, 102-110.
- DUGAST, A.-S., HAUDEBOURG, T., COULON, F., HESLAN, M., HASPOT, F., POIRIER, N., DE SILLY, R. V., USAL, C., SMIT, H. & MARTINET, B. 2008. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *The Journal of Immunology*, 180, 7898-7906.
- ELGHETANY, M. T. 2002. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 28, 260-274.
- ELGHETANY, M. T., GE, Y., PATEL, J., MARTINEZ, J. & UHROVA, H. 2004. Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *Journal of clinical laboratory analysis*, 18, 36-41.
- FERNÁNDEZ, M. N., REGIDOR, C., CABRERA, R., GARCÍA-MARCO, J. A., FORÉS, R., SANJUÁN, I., GAYOSO, J., GIL, S., RUÍZ, E. & LITTLE, A.-M. 2003. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells from an HLA-haploidentical donor. *Experimental hematology*, 31, 535-544.
- FILIPAZZI, P., HUBER, V. & RIVOLTINI, L. 2012. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61, 255-263.

- FORTUNEL, N., HATZFELD, J., AOUSTIN, L., BATARD, P., DUCOS, K., MONIER, M.-N., CHARPENTIER, A. & HATZFELD, A. 2000a. Specific dose-response effects of TGF- $\beta$  1 on developmentally distinct hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. *The Hematology Journal*, 1, 126-135.
- FORTUNEL, N. O., HATZFELD, A. & HATZFELD, J. A. 2000b. Transforming growth factor- $\beta$ : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*, 96, 2022-2036.
- FRASSONI, F., GUALANDI, F., PODESTÀ, M., RAIOLA, A. M., IBATICI, A., PIAGGIO, G., SESSAREGO, M., SESSAREGO, N., GOBBI, M. & SACCHI, N. 2008. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *The lancet oncology*, 9, 831-839.
- FUJIMOTO, H., SAKATA, T., HAMAGUCHI, Y., SHIGA, S., TOHYAMA, K., ICHIYAMA, S., WANG, F. S. & HOUWEN, B. 2000. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry*, 42, 371-378.
- FUJIMURA, T., MAHNKE, K. & ENK, A. H. 2010. Myeloid derived suppressor cells and their role in tolerance induction in cancer. *Journal of dermatological science*, 59, 1-6.
- GABRILOVICH, D. I. & NAGARAJ, S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9, 162-174.
- GARCIA, M. R., LEDGERWOOD, L., YANG, Y., XU, J., LAL, G., BURRELL, B., MA, G., HASHIMOTO, D., LI, Y. & BOROS, P. 2010. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120, 2486.
- GIASSI, L. J., PEARSON, T., SHULTZ, L. D., LANING, J., BIBER, K., KRAUS, M., WODA, B. A., SCHMIDT, M. R., WOODLAND, R. T. & ROSSINI, A. A. 2008. Expanded CD34+ human umbilical cord blood cells generate multiple lymphohematopoietic lineages in NOD-scid IL2rynull mice. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 997-1012.
- GILMORE, G. L., DEPASQUALE, D. K., LISTER, J. & SHADDUCK, R. K. 2000. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. *Experimental hematology*, 28, 1297-1305.
- GIMENO, R. & BARQUINERO, J. 2011. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología*, 30, 45-53.
- GLASSER, L. & FIEDERLEIN, R. L. 1987. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood*, 69, 937-944.
- GLUCKMAN, E. 2000. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental hematology*, 28, 1197-1205.
- GLUCKMAN, E. 2009. History of cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation*, 44, 621-626.
- GLUCKMAN, E., BROXMEYER, H., AUERBACH, A. D., FRIEDMAN, H. S., DOUGLAS, G. W., DEVERGIE, A., ESPEROU, H., THIERRY, D., SOCIE, G. & LEHN, P. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 321, 1174-8.
- GREINER, D. L., HESSELTON, R. A. & SHULTZ, L. D. 1998. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem cells*, 16, 166-177.
- GÜENECHEA, G., SEGOVIA, J., ALBELLA, B., LAMANA, M., RAMIREZ, M., REGIDOR, C., FERNANDEZ, M. & BUEREN, J. 1999. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34+ cord blood cells. *Blood*, 93, 1097-1105.
- GYURKOCZA, B., REZVANI, A. & STORB, R. F. 2010. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert review of hematology*, 3, 285-299.
- HASELL, T., GLEAVE, S. & BUTLER, M. 1991. Growth inhibition in animal cell culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 30, 29-41.
- HAYLOCK, D., TO, L., DOWSE, T., JUTTNER, C. & SIMMONS, P. 1992. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood*, 80, 1405-1412.

- HEIMFELD, S. 2003a. Bone marrow transplantation: how important is CD34 cell dose in HLA-identical stem cell transplantation? *Leukemia*, 17, 856-858.
- HEIMFELD, S. 2003b. HLA-identical stem cell transplantation: is there an optimal CD34 cell dose? *Bone marrow transplantation*, 31, 839-845.
- HINES, M., NIELSEN, L. & COOPER-WHITE, J. 2008. The hematopoietic stem cell niche: what are we trying to replicate? *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 421-443.
- HOGAN, C. J., SHPALL, E. J. & KELLER, G. 2002. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 413-418.
- IVANOVIC, Z., DUCHEZ, P., CHEVALEYRE, J., VLASKI, M., LAFARGE, X., DAZEY, B., ROBERT-RICHARD, E., MAZURIER, F. & BOIRON, J.-M. 2011. Clinical-scale cultures of cord blood CD34+ cells to amplify committed progenitors and maintain stem cell activity. *Cell transplantation*, 20, 1453-1463.
- JANEWAY JR, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. J. 2003. Inmunobiología, el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad, Charles A. Janeway, Jr....[et al.], Immunobiology. The immune system in health and disease.
- JELINEK, N., SCHMIDT, S., HILBERT, U., THOMA, S., BISELLI, M. & WANDREY, C. 2002. Novel bioreactors for the ex vivo cultivation of hematopoietic cells. *Engineering in life sciences*, 2, 15-18.
- KATAYAMA, Y., MIYAMOTO, K., TAKENAKA, K., IMAJYO, K., SHINAGAWA, K. & HARADA, M. 2001. Chromosome analysis after ex vivo expansion of CD34<sup>+</sup> cells from human cord blood. *Cancer genetics and cytogenetics*, 125, 161-162.
- KEENEY, M., CHIN-YEE, I., WEIR, K., POPMA, J., NAYAR, R. & SUTHERLAND, D. R. 1998. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*, 34, 61-70.
- KELLY, S., SOLA, C., DE LIMA, M. & SHPALL, E. 2009. Ex vivo expansion of cord blood. *Bone marrow transplantation*, 44, 673-681.
- KIROUAC, D. C. & ZANDSTRA, P. W. 2006. Understanding cellular networks to improve hematopoietic stem cell expansion cultures. *Current opinion in biotechnology*, 17, 538-547.
- KOBARI, L., PFLUMIO, F., GIARRATANA, M.-C., LI, X., TITEUX, M., IZAC, B., LETEURTRE, F., COULOMBEL, L. & DOUAY, L. 2000. In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34<sup>+</sup> cord blood cells. *Experimental hematology*, 28, 1470-1480.
- KONDO, M. 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunological reviews*, 238, 37-46.
- KONDO, M., WAGERS, A. J., MANZ, M. G., PROHASKA, S. S., SCHERER, D. C., BEILHACK, G. F., SHIZURU, J. A. & WEISSMAN, I. L. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*, 21, 759-806.
- KOWALCZYK, M., WALDRON, K., KRESNOWATI, P. & DANQUAH, M. K. 2011. Process challenges relating to hematopoietic stem cell cultivation in bioreactors. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38, 761-767.
- KOZLOWSKA-SKRZYPCZAK, M., GIL, L. & KOMARNICKI, M. Year. Factors affecting neutrophil recovery after autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. In: Transplantation proceedings, 2009. Elsevier, 3868-3872.
- KRAUSE, D., FACKLER, M., CIVIN, C. & MAY, W. S. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility *Blood*, 87, 1-13.

- LEHMANN, A. K., SØRNES, S. & HALSTENSEN, A. 2000. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 243, 229-242.
- LIU, H., RICH, E. S., GODLEY, L., ODENIKE, O., JOSEPH, L., MARINO, S., KLINE, J., NGUYEN, V., CUNNINGHAM, J. & LARSON, R. A. 2011. Reduced-intensity conditioning with combined haploidentical and cord blood transplantation results in rapid engraftment, low GVHD, and durable remissions. *Blood*, 118, 6438-6445.
- LIU, Y., LIU, T., FAN, X., MA, X. & CUI, Z. 2006. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. *Journal of biotechnology*, 124, 592-601.
- LUND-JOHANSEN, F. & TERSTAPPEN, L. 1993. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *Journal of leukocyte biology*, 54, 47-55.
- MADLAMBAYAN, G. J., ROGERS, I., KIROUAC, D. C., YAMANAKA, N., MAZURIER, F., DOEDENS, M., CASPER, R. F., DICK, J. E. & ZANDSTRA, P. W. 2005. Dynamic changes in cellular and microenvironmental composition can be controlled to elicit in vitro human hematopoietic stem cell expansion. *Experimental hematology*, 33, 1229-1239.
- MADLAMBAYAN, G. J., ROGERS, I., PURPURA, K. A., ITO, C., YU, M., KIROUAC, D., CASPER, R. F. & ZANDSTRA, P. W. 2006. Clinically relevant expansion of hematopoietic stem cells with conserved function in a single-use, closed-system bioprocess. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12, 1020-1030.
- MAJKA, M., JANOWSKA-WIECZOREK, A., RATAJCZAK, J., EHRENMAN, K., PIETRZKOWSKI, Z., KOWALSKA, M. A., GEWIRTZ, A. M., EMERSON, S. G. & RATAJCZAK, M. Z. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner Presented at the 41st Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, December 3-7, 1999, and published in abstract form in *Blood*. 1999; 94 (suppl 1): 465a. *Blood*, 97, 3075-3085.
- MARCINIAK-CZOCHRA, A., STIEHL, T. & WAGNER, W. 2009. Modeling of replicative senescence in hematopoietic development. *Aging (Albany NY)*, 1, 723.
- MARIGO, I., BOSIO, E., SOLITO, S., MESA, C., FERNANDEZ, A., DOLCETTI, L., UGEL, S., SONDA, N., BICCIATO, S. & FALISI, E. 2010. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP $\beta$  transcription factor. *Immunity*, 32, 790-802.
- MARTINEZ-AGOSTO, J. A., MIKKOLA, H. K., HARTENSTEIN, V. & BANERJEE, U. 2007. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes & development*, 21, 3044-3060.
- MATTSSON, J., RINGDÉN, O. & STORB, R. 2008. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, 165-170.
- MAVROUDIS, D., READ, E., COTTLER-FOX, M., COURIEL, D., MOLLIDREM, J., CARTER, C., YU, M., DUNBAR, C. & BARRETT, J. 1996. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood*, 88, 3223-3229.
- MAYANI, H. 2010. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells and development*, 19, 285-298.
- MAZURIER, F., DOEDENS, M., GAN, O. I. & DICK, J. E. 2003. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nature medicine*, 9, 959-963.
- MAZURIER, F., GAN, O. I., MCKENZIE, J. L., DOEDENS, M. & DICK, J. E. 2004. Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment. *Blood*, 103, 545-552.



- MCNIECE, I., KUBEGOV, D., KERZIC, P., SHPALL, E. J. & GROSS, S. 2000. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Experimental hematology*, 28, 1181-1186.
- MCNIECE, I. K., ALMEIDA-PORADA, G., SHPALL, E. J. & ZANJANI, E. 2002. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Experimental hematology*, 30, 612-616.
- MEHTA, J., FRANKFURT, O., ALTMAN, J., EVENS, A., TALLMAN, M., GORDON, L., WILLIAMS, S., WINTER, J. & KRISHNAMURTHY, J. 2009. Optimizing the CD34+ cell dose for reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia & lymphoma*, 50, 1434-1441.
- MEISSNER, P., SCHRÖDER, B., HERFURTH, C. & BISELLI, M. 1999. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Cytotechnology*, 30, 227-234.
- MILES PRINCE, H., SIMMONS, P. J., WHITTY, G., WALL, D. P., BARBER, L., TONER, G. C., SEYMOUR, J. F., RICHARDSON, G., MRONGOVIUS, R. & HAYLOCK, D. N. 2004. Improved haematopoietic recovery following transplantation with ex vivo-expanded mobilized blood cells\*. *British journal of haematology*, 126, 536-545.
- NABHAN, S. K., ROCHA, V., ARCESE, W., SIRVENT, A., LONESCU, I., BIZZETTO, R., BOUDJEDIR, K., CHAVES, W., HERR, A.-L. & GLUCKMAN, E. Year. Influence of myeloablative conditioning regimens on outcomes after single unrelated cord blood transplantation for adults with leukemia: an analysis on behalf of Eurocord-EBMT-Netcord. *In: Blood*, 2008. AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA, 63-64.
- NAKAMURA, R., AUAYPORN, N., SMITH, D. D., PALMER, J., SUN, J. Y., SCHRIBER, J., PULLARKAT, V., PARKER, P., RODRIGUEZ, R. & STEIN, A. 2008. Impact of Graft Cell Dose on Transplant Outcomes following Unrelated Donor Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Higher CD34<sup>+</sup> Cell Doses Are Associated with Decreased Relapse Rates. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, 449-457.
- NIELSEN, L. K. 1999. Bioreactors for hematopoietic cell culture. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1, 129-152.
- NORKIN, M., LAZARUS, H. & WINGARD, J. 2012. Umbilical cord blood graft enhancement strategies: has the time come to move these into the clinic? *Bone marrow transplantation*.
- OSTANIN, D. V., KURMAEVA, E., FURR, K., BAO, R., HOFFMAN, J., BERNEY, S. & GRISHAM, M. B. 2012. Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *The Journal of Immunology*, 188, 1491-1502.
- OZTURK, S. & HU, W.-S. 2005. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*, CRC Press.
- PALSSON, B. O., PAKK, S.-H., SCHWARTZ, R. M., PALSSON, M., LEE, G.-M., SILVER, S. & EMERSON, S. G. 1993. Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system. *Nature Biotechnology*, 11, 368-372.
- PAQUETTE, R. L., DERGHAM, S. T., KARPF, E., WANG, H.-J., SLAMON, D. J., SOUZA, L. & GLASPY, J. A. 2000. Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. *Blood*, 96, 2385-2390.
- PATEL, S. D., PAPOUTSAKIS, E. T., WINTER, J. N. & MILLER, W. M. 2000. The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. *Biotechnology progress*, 16, 885-892.
- PELED, T., LANDAU, E., PRUS, E., TREVES, A. J. & FIBACH, E. 2002. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. *British journal of haematology*, 116, 655-661.

- PIACIBELLO, W., SANAVIO, F., SEVERINO, A., DANÈ, A., GAMMAITONI, L., FAGIOLI, F., PERISSINOTTO, E., CAVALLONI, G., KOLLET, O. & LAPIDOT, T. 1999. 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*, 93, 3736-3749.
- PIERELLI, L., MARONE, M., BONANNO, G., RUTELLA, S., DE RITIS, D., MANCUSO, S., LEONE, G. & SCAMBIA, G. 2002. Transforming growth factor- $\beta$ 1 causes transcriptional activation of CD34 and preserves haematopoietic stem/progenitor cell activity. *British journal of haematology*, 118, 627-637.
- PILLAY, J., TAK, T., KAMP, V. M. & KOENDERMAN, L. 2013. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-15.
- PLA, A. 2011. Expansió de cèl·lules mare hematopoètiques. Bases per al desenvolupament d'un producte de teràpia cel·lular avançada. *Tesi Doctoral*.
- POSCHKE, I. & KIESSLING, R. 2012. On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. *Clinical Immunology*, 144, 250-268.
- PUGA, I., COLS, M., BARRA, C. M., HE, B., CASSIS, L., GENTILE, M., COMERMA, L., CHORNY, A., SHAN, M. & XU, W. 2011. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature immunology*.
- ROBINSON, S., NG, J., NIU, T., YANG, H., MCMANNIS, J., KARANDISH, S., KAUR, I., FU, P., DEL ANGEL, M. & MESSINGER, R. 2006. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone marrow transplantation*, 37, 359-366.
- ROCHA, V. & BROXYMEYER, H. 2009. New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*.
- ROCHA, V. & GLUCKMAN, E. 2009. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft-and transplantation-related factors. *British journal of haematology*, 147, 262-274.
- ROCHA, V., LABOPIN, M., SANZ, G., ARCESE, W., SCHWERDTFEGGER, R., BOSI, A., JACOBSEN, N., RUUTU, T., DE LIMA, M. & FINKE, J. 2004. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *New England Journal of Medicine*, 351, 2276-2285.
- ROCHA, V. & LOCATELLI, F. 2007. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone marrow transplantation*, 41, 207-214.
- SCHEDING, S., MEISTER, B., BÜHRING, H.-J., BAUM, C. M., MC KEARN, J. P., BOCK, T., KANZ, L. & BRUGGER, W. 2000. Effective ex vivo generation of granulopoietic postprogenitor cells from mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Experimental hematology*, 28, 460-470.
- SCHOEMANS, H., THEUNISSEN, K., MAERTENS, J., BOOGAERTS, M., VERFAILLIE, C. & WAGNER, J. 2006. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone marrow transplantation*, 38, 83-93.
- SEUNG, L. P., ROWLEY, D. A., DUBEY, P. & SCHREIBER, H. 1995. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 6254-6258.
- SHARPE, M. E., MORTON, D. & ROSSI, A. 2012. Nonclinical safety strategies for stem cell therapies. *Toxicology and applied pharmacology*, 262, 223-231.
- SHPALL, E. J., QUINONES, R., GILLER, R., ZENG, C., BARON, A. E., JONES, R. B., BEARMAN, S. I., NIETO, Y., FREED, B. & MADINGER, N. 2002. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 8, 368-376.
- SHULTZ, L. D., ISHIKAWA, F. & GREINER, D. L. 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature Reviews Immunology*, 7, 118-130.
- SHULTZ, L. D., LYONS, B. L., BURZENSKI, L. M., GOTT, B., CHEN, X., CHALEFF, S., KOTB, M., GILLIES, S. D., KING, M. & MANGADA, J. 2005. Human lymphoid and myeloid cell

- development in NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *The Journal of Immunology*, 174, 6477-6489.
- STEEN, R., TJØNNFJORD, G. E. & EGELAND, T. 1994. Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD34+ cells from umbilical cord blood, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and adult human bone marrow. *Journal of hematotherapy*, 3, 253-262.
- STEINKAMP, J. A., WILSON, J. S., SAUNDERS, G. C. & STEWART, C. C. 1982. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science*, 215, 64-66.
- SZILVASSY, S. J., MEYERROSE, T. E., RAGLAND, P. L. & GRIMES, B. 2001. Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of  $\beta$ 1 integrin. *Experimental hematology*, 29, 1494-1502.
- THOMSON, A. W. & LOTZE, M. T. 2003. *The Cytokine Handbook, Two-Volume Set*, Gulf Professional Publishing.
- TRAYCOFF, C., ABOUD, M., LAVER, J., CLAPP, D. & SROUR, E. 1994. 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. *Experimental hematology*, 22, 1264-1272.
- UNVERZAGT, K. L., BENDER, J. G., LOUDOVARIS, M., MARTINSON, J. A., HAZELTON, B. & WEAVER, C. 1997. Characterization of a culture-derived CD15+ CD11b-promyelocytic population from CD34+ peripheral blood cells. *Journal of leukocyte biology*, 62, 480-484.
- VAN EEDEN, S. F., KLUT, M. E., WALKER, B. A. & HOGG, J. C. 1999. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *Journal of immunological methods*, 232, 23-43.
- VAN LOCHEM, E., VAN DER VELDEN, V., WIND, H., TE MARVELDE, J., WESTERDAAL, N. & VAN DONGEN, J. 2004. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 60, 1-13.
- VAN OS, R., KAMMINGA, L. M. & DE HAAN, G. 2004. Stem cell assays: something old, something new, something borrowed. *Stem cells*, 22, 1181-1190.
- VANHEUSDEN, K., VAN COPPERNOLLE, S., DE SMEDT, M., PLUM, J. & VANDEKERCKHOVE, B. 2007. In vitro expanded cells contributing to rapid severe combined immunodeficient repopulation activity are CD34+ 38- 33+ 90+ 45RA-. *Stem cells*, 25, 107-114.
- VARNUM-FINNEY, B., XU, L., BRASHEM-STEIN, C., NOURIGAT, C., FLOWERS, D., BAKKOUR, S., PEAR, W. S. & BERNSTEIN, I. D. 2000. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature medicine*, 6, 1278-1281.
- WANG, J. C., DOEDENS, M. & DICK, J. E. 1997. 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*, 89, 3919-3924.
- WEAVER, C. H., HAZELTON, B., BIRCH, R., PALMER, P., ALLEN, C., SCHWARTZBERG, L. & WEST, W. 1995. 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*, 86, 3961-3969.
- XU, R., MEDCHILL, M. & REEMS, J. A. 2000. Serum supplement, inoculum cell density, and accessory cell effects are dependent on the cytokine combination selected to expand human HPCs ex vivo. *Transfusion*, 40, 1299-1307.
- YIN, A. H., MIRAGLIA, S., ZANJANI, E. D., ALMEIDA-PORADA, G., OGAWA, M., LEARY, A. G., OLWEUS, J., KEARNEY, J. & BUCK, D. W. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90, 5002-5012.

- YOUNG, M. R., NEWBY, M. & WEPSIC, H. T. 1987. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research*, 47, 100-105.
- ZANDSTRA, P. W. & NAGY, A. 2001. Stem cell bioengineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3, 275-305.
- ZHANG, W., LIANG, S., WU, J. & HORUZSKO, A. 2008. Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+ Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation*, 86, 1125-1134.
- ZHANG, Y., HARADA, A., BLUETHMANN, H., WANG, J., NAKAO, S., MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. 1995. Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro. *Blood*, 86, 2930-2937.
- ZIMMERMAN, T., LEE, W., BENDER, J., SCHILLING, M., SMITH, S., VAN EPPS, D. & WILLIAMS, S. 2000. Clinical impact of ex vivo differentiated myeloid precursors after high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell rescue. *Bone marrow transplantation*, 26, 505-510.
- ZON, L. I. 2008. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*, 453, 306-313.