

Expansión de células progenitoras hematopoyéticas: metodología, ensayos experimentales y aplicaciones clínicas

Dra. Cristina M. Bertinetti, Dr. Benjamín Koziner

Unidad de Investigaciones Oncohematológicas "Nelly Arrieta de Blaquier"
Agrelo 3038. Buenos Aires (1221). Argentina. Tel/Fax: 4956-1579
E-mail: bkoziner@netizen.com.ar



ARTÍCULO
ESPECIAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 4 N° 1: 9-17
Enero-Abril, 2000

RESUMEN

La expansión ex vivo de células stem y progenitoras hematopoyéticas tiene un importante potencial de aplicación clínica, incluyendo la terapia génica, purgado de células tumorales y la producción de células dendríticas para inmunoterapia.

En las dos últimas décadas se han publicado numerosos trabajos demostrando que la expansión de células progenitoras es factible en casi todas las condiciones de cultivos ex vivo, desde cultivos estáticos en bolsas permeables a gases a cultivos de perfusión continua en bioreactores.

En el presente trabajo se describen las diferentes alternativas de cultivo ex vivo de células stem y las potenciales ventajas y aplicaciones clínicas de la expansión de células de la médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical.

ABSTRACT

The ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells have great potential for clinical application in gene therapy, purging of contaminating malignant cells, graft engineering and the production of dendritic cells for tumor immunotherapy.

In the last two decades many reports have been published on this subject arguing that ex vivo cell expansion is feasible in different culture conditions ranging from static cultures in gas permeable bags to continuous perfusion cultures in bioreactors.

In this review we will describe the basic methodology for cell culturing and expansion, and provide updated information regarding laboratory studies and clinical protocols applied to bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood cell populations.

INTRODUCCION

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas provenientes de médula ósea (MO), sangre periférica (SP) o sangre placentaria de cordón umbilical (CU) se ha convertido en la estrategia terapéutica de elección para una variedad de neoplasias hematológicas, síndromes de insuficiencia medular y alteraciones congénitas del metabolismo y la eritropoyesis.

La propiedad de reconstituir el sistema hematopoyético reside en las células madre o *stem*, que pueden ser definidas como elementos pluripotenciales trasplantables, con potencial replicativo variable y

capaces de diferenciarse en células progenitoras de las líneas mieloide, eritroide, linfóide y megacariocítica. La presencia de células progenitoras en las muestras puede ser evaluada por ensayos funcionales: cultivo de células progenitoras en metilcelulosa y/o agarosa.

La mayoría de las células *stem* como las progenitoras expresan en su superficie la glicoproteína CD34, que se ha convertido en un marcador confiable para cuantificar el contenido de estas células en los inóculos a infundir para predecir la velocidad de recuperación hematológica luego de altas dosis de quimioterapia +/- radioterapia.

Los productos celulares a infundir deben contener un número suficiente de células CD34+ ($>5 \times 10^6$ /Kg de peso) que garanticen una reconstitución hematopoyética no sólo inmediata, sino también a largo plazo. Es común que se requiera procesar grandes volúmenes de MO o SP para alcanzar este valor, con el riesgo de aumentar la contaminación del producto con células tumorales. Además, la limitada celularidad de la sangre proveniente de CU restringe su aplicación a casos pediátricos o a pacientes de bajo peso corporal.

Con el objetivo de eliminar estas limitaciones técnicas, durante la última década, los esfuerzos se centraron en intentar aumentar el número y la capacidad proliferativa de las células hematopoyéticas primitivas, previo a su reinfusión, mediante su expansión en cultivos *ex-vivo*.

ENSAYOS FUNCIONALES

Cultivo de células progenitoras en metil celulosa, agarosa y LTC-IC.

Estos cultivos *in vitro* son utilizados para evaluar el potencial hematopoyético de los progenitores comprometidos en la diferenciación celular (1).

Cultivo en metilcelulosa

Los cultivos se realizan en placas de Petri de 35 mm en 1 ml de medio IMDM conteniendo 1.2% metilcelulosa, 30% SFB, 2.2mM hemina, 1% glutamina, 5×10^{-5} M 2- β mercapto etanol suplementado con: kit ligand (KL: 20 ng/ml), IL-3 (50 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), Epo (6 U/ml) y G-CSF (1000 U/ml). La concentración de células a sembrar es de $0.1-5 \times 10^4$ CD34+ /ml o $1-10 \times 10^4$ CMN/ml. Los cultivos se realizan por triplicado, se incuban a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ y al cabo de 14 días se cuenta el número de CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM.

Cultivo en agarosa

Los cultivos se realizan en placas de Petri de 35 mm en 1 ml de medio IMDM conteniendo 20% SFB, 0.36% agarosa suplementado con: KL (20 ng/ml), IL-3 (50 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), Epo (6 U/ml) y G-CSF (1000 U/ml). La concentración de células a sembrar es de $0.1-5 \times 10^4$ CD34+ /ml o $1-10 \times 10^4$ CMN/ml. Los cultivos se realizan por triplicado, se incuban a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ y al cabo de 14 días se cuenta el número de CFU-GM.

Ensayo de LTC-IC

La presencia de *long term-culture-initiating cells* se determina en cultivos sobre estroma irradiado. La capa de estroma se prepara sembrando células de bazo fetal humano de la línea 62891-mut (2) en bote-

llas de cultivo de 12.5 cm³. Una vez que las células llegan a confluencia, el cultivo se irradia con 1000 rads de una fuente de Cs 137. El cultivo se inicia sembrando 5×10^5 CMN Cs 137 células CD34+ dentro de las 3 hs posteriores a la irradiación en 4 ml de medio Mc Coy 5A conteniendo 12.5% SFB, 12.5% suero de caballo, 1mM piruvato de sodio, 2mM L-glutamina, 6 ml/l 7.5% bicarbonato de sodio, 1% aminoácidos no esenciales, 1% aminoácidos esenciales, 1% vitaminas, 10^{-6} M succinato de hidrocortisona y 1% penicilina-estreptomocina incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Estos cultivos se mantienen por 6 semanas, analizándose el número total de células progenitoras presentes en el sobrenadante semanalmente mediante ensayos en agarosa o metil celulosa.

ENSAYOS DE EXPANSION PRECLINICOS

El aislamiento, caracterización y la aplicación biológica y clínica de un número creciente de citoquinas ha permitido desarrollar sistemas controlados de cultivos celulares. En el laboratorio, estos cultivos han resultado de gran utilidad para determinar las condiciones óptimas de combinación y concentración de factores que resultarán en el mayor número y a su vez, en el menor grado de maduración de células CD34+.

Los ensayos más comunmente empleados para estimar la capacidad proliferativa de la población de células *stem* son: ensayo de LTC-IC (por long-term culture-initiating cells) y la expansión de progenitores en cultivos celulares en suspensión (Δ Assay). En el ensayo de LTC-IC la hematopoyesis ocurre en ausencia del agregado de citoquinas. Las células son sembradas sobre una capa de células de estroma previamente irradiadas y ésta provee un ambiente apropiado para permitir la autorenovación, proliferación y diferenciación de las células más primitivas. A diferencia del ensayo de LTC-IC, el Δ Assay se basa en el crecimiento de las células en medio líquido suplementado con citoquinas.

Una de las técnicas de expansión más estudiadas ha sido el cultivo de células CD34+ purificadas por medio de columnas de afinidad con altas dosis de citoquinas. Haylock (3) fue el primero en reportar que las células CD34+ podían proliferar *in vitro* en presencia de IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, Stem Cell Factor (SCF) y Suero Fetal Bovino (SFB). En estas condiciones, el pool de CFU-GM se expandió 20-60 veces en 14 días. Estos resultados fueron posteriormente reproducidos por otros grupos (Ver tabla I). A pesar de algunas diferencias en los protocolos de expansión empleados, todos reúnen la característica común de utilizar células CD34+, baja concentración inicial de células y múltiples combinaciones de citoquinas junto a SFB.

Tabla I: Ensayos de expansión con cultivos de células CD34+ seleccionadas de sangre periférica.

Referencia	Días de cultivo	Suero	Citoquinas	Crecimiento (número de veces)
Haylock y col. (3)	14	SFB	IL-1 (10 ng/ml) IL-3 (10 ng/ml) IL-6 (10 ng/ml) G-CSF(10 ng/ml) GM-CSF(10ng/ml) SCF (10 ng/ml)	CFU-GM: 60
Brugger y col. (4)	14	SFB	IL-1 (100 ng/ml) IL-3 (100 U/ml) IL-6 (100 U/ml) Epo (1 U/ml) SCF (100 ng/ml)	Cel. totales: 170 CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM: 130
Shapiro y col. (6)	14	SFB	KL (20 ng/ml) IL-3 (50 ng/ml) IL-6 (20 ng/ml) G-CSF (100 ng/ml) Epo (6 U/ml)	CD34+: 104 CFU-GM: 10
Sandstrom y col. (11)	15	SFB SC	IL-3 (150 U/ml) IL-6 (40 ng/ml) G-CSF (150 U/ml) SCF (50 ng/ml)	CD34+: 113 CFU-GM: 18
Williams y col. (15)	12	No	PIXY 321 (100 ng/ml)	Cel. totales: 26 CFU-GM: 4.7
Zimmerman y col. (51)	12	No	PIXY 321 (100 ng/ml)	Cel. totales: 23-65
Alcorn y col. (16)	8	No	IL-1b (10 ng/ml) IL-3 (10 ng/ml) IL-6 (20 ng/ml) Epo (2 U/ml) SCF (10 ng/ml)	CD34+: 22 CFU-GM: 92

Si bien las tasas de expansión obtenidas argumentaban a favor de su potencial uso clínico, la infusión sistémica de trazas de SFB en pacientes podría potencialmente inducir reacciones alérgicas o anafilaxis (5). Para evitar esta posible complicación, Shapiro y col. (6) analizaron la posibilidad de evitar el empleo de SFB en los cultivos, demostrando que podía ser reemplazado por el uso de plasma autólogo junto a la combinación de IL-1, KL, IL-6, G-CSF, GM-CSF y Epo.

Cabe aclarar que a pesar de que todos los estudios publicados utilizan diferentes métodos de expansión -por lo que se ve dificultada la comparación directa de la expansión de células progenitoras-, cualquiera de las combinaciones propuestas en la literatura pareciera ser adecuada para ensayos clínicos.

Para obtener volúmenes celulares compatibles con las necesidades clínicas se desarrollaron inicialmente cultivos estáticos en bolsas permeables a gases. En estos sistemas cerrados, sin recambio de medio de

cultivo ni reposición de citoquinas, Shapiro y col. (6) reportaron una tasa de expansión de CFU-GM/BFU-E de 14 veces a los 10 días de cultivo con una combinación de IL-1, IL-6, Epo, GM-CSF, G-CSF y ligando del c-Kit (KL).

Una desventaja de los cultivos estáticos es que la amplificación de progenitores observada pareciera provenir de la diferenciación terminal de las células progenitoras y *stem*. Si bien se observan incrementos en el número de CFU-GM, el número absoluto de células CD34+ decrece. De igual modo el número de las células más primitivas LTC-IC raramente aumenta y en general decrece a medida que pasan los días de incubación.

Una alternativa para la expansión *ex-vivo* de células progenitoras ha sido la utilización de cultivos de perfusión continua. El frecuente recambio de medio y factores de crecimiento estimula la función del estroma para inducir la autorenovación de las célu-

las *stem* y producir factores estimulantes de colonias. La combinación de la estimulación sobre las células de elementos del estroma y la remoción de productos metabólicos producidos por la maduración de las células mieloides se traduce en una producción estable de células progenitoras en los cultivos, indicadoras de la autorenovación de las células *stem* (7, 8).

Koller y col. (9) demostraron que la incubación de células mononucleares de MO bajo condiciones de continua oxigenación y perfusión en presencia de SCF, IL-3, GM-CSF y Epo resultaba en una expansión del orden de 10-20 veces en células mononucleares totales y CFU-GM y 4-8 veces en LTC-IC. En un trabajo posterior (10) reportaron que tanto la presencia de la capa de estroma, las células accesorias del estroma CD34⁺ y el continuo recambio de medio contribuyen a mantener y expandir las células LTC-IC en estos sistemas.

Sandstrom y col. (11) llegaron a resultados similares. Comparando la expansión de células mononucleares y CD34⁺ en cultivos estáticos y con perfusión hallaron que en ambos tipos de cultivos se obtuvieron un número similar promedio de células totales y CFU-GM; sin embargo aquellas muestras cuyo rendimiento era pobre en los cultivos estáticos, se comportaron a niveles normales de expansión en los cultivos con perfusión. Además, en los cultivos con perfusión se obtuvieron recuentos más altos de LTC-ICs.

Es razonable inferir entonces que mientras la perfusión en los cultivos contribuye en gran medida a la expansión de progenitores y el mantenimiento de LTC-ICs, la selección de células CD34⁺ no brindaría beneficios *per se*. Una evidencia que apoya esta observación fue aportada por Koller y col (12), quienes demostraron que la población de células más primitivas presentes en la MO puede ser expandida en cultivos con perfusión continua independientemente del grado de purificación de las mismas. Más aún, encontraron que luego de 14 días de incubación la mayor tasa de expansión se obtuvo a partir de células de MO sin purificar (3.76×10^6 CFU-GM/ml de aspirado de MO en comparación con 1.42×10^6 CFU-GM/ml MNC y 7×10^5 CFU-GM de CD34⁺ purificadas por columnas de afinidad). Probablemente, la pérdida de células accesorias en los distintos pasos de purificación tiene un impacto negativo en la productividad del cultivo.

Considerando que la cantidad mínima de CFU-GM necesaria para un trasplante es de aproximadamente 2×10^5 CFU-GM/Kg peso corporal, teóricamente para un paciente de 70 Kg sería necesaria la aspiración de tan sólo 3.7 ml de MO para obtener el número total de CFU-GM requeridas (1×10^4 CFU-GM).

Para obtener el mismo rendimiento a partir de células purificadas (mononucleares o CD34⁺) se requie-

riría un mínimo de 10-20 ml de aspirado o más, debido a la necesidad de mantener un estroma para las células CD34⁺.

Si bien todas estas estrategias de expansión son válidas, el uso de sangre entera presenta las ventajas de requerir la menor cantidad de MO, el menor tiempo de procesamiento de la muestra en el laboratorio y ser menos oneroso.

APLICACIONES CLÍNICAS

La expansión *ex-vivo* de la población de células CD34⁺ ofrece varias ventajas en comparación con el uso de material no manipulado. Se puede obtener un número suficiente de células CD34⁺ a partir de menores volúmenes de aféresis y por otra parte, podría producirse una población celular enriquecida no solamente en términos de número de células progenitoras, sino también en su capacidad de reconstituir rápidamente la hematopoyesis luego de un régimen mieloablativo. Pacientes que recibieron un trasplante alogénico de MO que incluía células incubadas durante 4 días con IL-3 y GM-CSF conjuntamente con células no manipuladas, mostraron una recuperación más rápida de plaquetas y permanecieron menos tiempo hospitalizados en comparación con pacientes que recibieron solamente células no manipuladas (13).

El primer estudio clínico publicado realizado con células expandidas *ex vivo* fue llevado a cabo en Alemania. Brugger y col. (14) reinfundieron células CD34⁺ expandidas *ex-vivo* provenientes de SP en 10 pacientes que recibieron altas dosis de quimioterapia (aunque no totalmente mieloablativa). Las células fueron cultivadas en presencia de SCF, IL-1, IL-3, IL-6 y Epo por 12 días, encontrando una significativa correlación entre el número de células reinfundidas a los pacientes y la velocidad de recuperación de plaquetas.

Williams y col. (15) emplearon células CD34⁺ provenientes de sangre periférica expandidas por 12 días en bolsas permeables a gases en 9 pacientes con cáncer de mama metastásico. Suplementando el medio de cultivo con 1% de seroalbúmina humana y 100 ng/ml PIXY 321(GM/IL-3) obtuvieron una expansión promedio de 26 veces en número de células CD34⁺ y un aumento de 4.7 veces el recuento de unidades formadoras de colonias. No se observó toxicidad luego del trasplante y los pacientes mostraron más de 500 neutrófilos/ml en un promedio de 8 días y más de 50.000 plaquetas/ml a los 12 días.

Alcorn y col. (16) emplearon una alícuota de SP movilizada y criopreservada en nitrógeno líquido para seleccionar las células CD34⁺ y las expandieron por 8 días en bolsas permeables a gases con medio suplementado con suero autólogo, IL-1, IL-3, IL-6, SCF y Epo. La expansión promedio de las células de 10 pa-

cientes alcanzada en estas condiciones fue de 21 veces en el número total de células, 139 veces el de CFU-GM y 114 veces el de BFU-E. Las células fueron reinfundidas en los pacientes conjuntamente con material no manipulado ($>25 \times 10^4$ CFU-GM/Kg). Si bien en este pequeño estudio no se encontraron diferencias en cuanto a la recuperación de neutrófilos y plaquetas con respecto a controles históricos, una conclusión interesante de este trabajo es que es factible que células criopreservadas puedan ser expandidas en gran escala y posteriormente reinfundidas. En un estudio similar llevado a cabo en 7 pacientes con mieloma y linfoma no-Hodgkin, Reiffers y col. (17) reportaron que 3 de 4 pacientes trasplantados con células criopreservadas y posteriormente expandidas por 10 días a más de 150×10^6 células/Kg conjuntamente con una media de 4.2×10^6 CD34+/Kg de células criopreservadas no expandidas, no sufrieron neutropenia por debajo de valores de 0.5×10^9 /L. En los pacientes restantes la misma se redujo considerablemente.

En el caso de pacientes con neuroblastoma, la expansión *ex-vivo* de células megacariocíticas podría convertirse en una nueva terapia para acortar los períodos de trombocitopenia inducida por la administración de altas dosis de quimioterapia. Van den Oudenrijn y col. (18) lograron expandir estas células (CD41+) en cultivos líquidos suplementados con IL-1, IL-6, IL-11, SCF y trombopoyetina (TPO). También Halle y col. (19) obtuvieron un incremento de 153, 140 y 77 veces en las poblaciones de células con fenotipo CD34+/CD61+, CD34+/CD41+ y CD34+/CD42a+ respectivamente, luego de cultivar células CD34+ en medio líquido suplementado con IL-3, IL-6, IL-11, SCF, TPO, FLT-3 y MIP-1a. En ambos casos la tasa de expansión obtenida sería suficiente para acelerar la recuperación del número de plaquetas en el paciente hasta que las células progenitoras más primitivas hayan tenido tiempo para injertar.

Recientemente, Stiff (20, 21) reportó resultados alentadores obtenidos en ensayos clínicos en fase I y II luego de reinfundir células expandidas en un sistema de perfusión automatizado (Aastrom Replicell System; Aastrom Biosciences, Ann Arbor, Michigan). Este es un sistema de expansión controlado por computadora, basado en el uso de estroma con frecuente recambio de medio, citoquinas y gases. Para determinar si las células de MO expandidas podían rescatar pacientes luego de una quimioterapia mieloablativa, se seleccionaron 16 pacientes en el período 1996-1997 con cancer avanzado de mama. El volumen promedio de MO de partida fue de 36.7 ml. Luego de expandir las células por 12 días en medio suplementado con PIXY 123, FLT3 y Epo se obtuvo una expansión de 4.9 veces en el número de células, 22.5 veces en CFU-GM y un aumento del 23% de LTC-ICs.

El mencionado sistema ha sido exitosamente empleado por otros grupos: partiendo de pequeñas alícuotas de MO expandidas por 12 días Engelhardt y col. (22) pudieron obtener una reconstitución hematopoyética de corto y largo plazo en pacientes con cancer de mama en estadio IV. Pecora y col. (23) compararon la recuperación hematopoyética de pacientes con cancer de mama metastásico trasplantadas con el producto de la expansión de 60 ml de MO conjuntamente con dosis "sub-terapéuticas" de células ($\leq 0.7 \times 10^6$ /Kg CD34+) obtenidas de una sola leucaféresis luego de 4 días de administración de bajas dosis de G-CSF por día (10mg/Kg) contra pacientes trasplantados con el producto de un promedio de 3 aféresis luego de altas dosis de G-CSF. En ambos casos se obtuvieron tiempos similares de recuperación hematopoyética, por lo que estos datos sugieren que podría evitarse el empleo de múltiples procedimientos de aféresis, disminuyendo el riesgo de contaminación del producto con células tumorales y hacer posible el trasplante en aquellos pacientes cuyos productos de aféresis resultaran en dosis "sub-terapéuticas". También Bachier y col. (24) trasplantaron exitosamente 5 pacientes con cancer de mama con células provenientes de la expansión por 12 días de pequeños volúmenes de aspirados de MO (52.9 ml promedio).

La expansión *ex-vivo* podría emplearse como método de purga pasivo para reducir el contenido en células tumorales de los productos a infundir. Ludell y col. (25) demostraron que luego de la expansión de células de MO de 7 pacientes con cancer de mama, en cuatro muestras no se detectaron células tumorales y se observó una reducción de las mismas en las restantes 3 muestras.

FUENTE DE CELULAS PARA EXPANSIÓN: MÉDULA ÓSEA, SANGRE PERIFÉRICA Y SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Tanto las células presentes en la MO, en la SP movilizada y en la sangre placentaria de CU han sido utilizadas exitosamente como poblaciones de partida para la expansión de células progenitoras *in vitro*. Cada una de ellas ofrece ventajas potenciales y relevancia teórica en cuanto a su empleo como fuente de células para aplicaciones clínicas.

Células mononucleares de MO: Han sido estudiadas por Koller y col. (9, 12) en cultivos con perfusión. La ventaja de este tejido es que es altamente probable que se encuentren presentes todos los elementos necesarios para la supervivencia *in vivo* de las células *stem* pluripotentes (26). Además, en estos ensayos las células tuvieron una escasa manipulación previa al inicio de los cultivos; de hecho estos cultivos mostraron un mejor rendimiento cuando todos los elemen-

Recientemente, se observó una mejor eficiencia de transferencia de genes en células progenitoras de CU comparándolas con células *stem* provenientes de MO o SP de adultos. Esta característica, conjuntamente con la alternativa que brindan de ser una fuente de células prácticamente ilimitada para trasplantes no relacionados (aumentando el pool de donantes en minorías étnicas y en países en desarrollo, donde por razones económicas o culturales la donación de MO se ve dificultada), podría convertir a la sangre placentaria de CU en la fuente ideal de células hematopoyéticas para trasplante.

BIBLIOGRAFIA

1. Yurasov S, Flasshove M, Rafii S, Moore M. Density enrichment and characterization of hematopoietic progenitors and stem cells from umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 517-525.
2. Goldstein NI, Moore MAS, Allen C, Tackney C. A human fetal spleen cell line, immortalized with SV40 T-antigen will support the growth of CD34+ long-term culture-initiating cells. *Mol Cell Diff* 1993; 1: 301-321.
3. Haylock D, To L, Dowse T, Juttner C, Simmons P. *Ex vivo* expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into myeloid lineage. *Blood* 1992; 80: 1405-1412.
4. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson R, Mertelsmann R, Kanz L. *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34 progenitor cells by stem cell factor, IL-1b, IL-6, IL-3, interferon- γ and erythropoietin. *Blood* 1993; 81 (10): 2579-2584.
5. Lichtenstein LM. Anaphylaxis. Cecil textbook of Medicine. Wyngaarden JB y Smith LH Jr 1988, p. 1956. Philadelphia, PA.
6. Shapiro F, Yao TJ, Raptis G, Reich L, Norton L, Moore M. Optimization of conditions for *ex vivo* expansion of CD34+ cells from patients with stage IV breast cancer. *Blood* 1994; 84 (10): 3567-3574.
7. Schwartz RM, Emerson SG, Clarke MF, Palsson B. *In vitro* myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with haematopoietic growth factors. *Blood* 1991; 78: 3155-3161.
8. Schwartz RM, Palsson BO, Emerson SG. Rapid medium perfusion rate significantly increases the productivity and longevity of human bone marrow cultures. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 6760-6764.
9. Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion culture. *Blood* 1993; 82: 378-384.
10. Koller MR, Palsson MA, Manchel I, Palsson BO. LTC-IC expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cells effects. *Blood* 1995; 86: 1784.
11. Sandstrom C, Bender J, Papoutsakis T, Miller W. Effects of CD34+ cell selection and perfusion on *ex vivo* expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1995; 86 (3): 958-970.
12. Koller M, Manchel I, Newsom B, Palsson M, Palsson B. Bioreactor expansion of human bone marrow: comparison of unprocessed, density-separated, and CD34-enriched cells. *J Hematother* 1995; 4: 159-169.
13. Naparstek E, Hardan Y, Ben-Shahar M y col. Enhanced marrow recovery by short preincubation of marrow allografts with human recombinant interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992; 80: 1673-1678.
14. Brugger W, Heimfeld S, Berenson R, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *ex vivo*. *New Engl J Med* 1995; 333: 283-287.
15. Williams S, Lee W, Bender J y col. Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 1996; 87: 1687-1691.
16. Alcorn MJ, Holyoake TL, Richmond L y col. CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded *ex vivo* and used for transplantation with little or no toxicity. *J Clin Oncol* 1996; 14 (6): 1839-1847.
17. Reiffers J, Cailliot C, Dazey B y col. Infusion of expanded CD34+ selected cells can abrogate post myeloablative chemotherapy neutropenia in patients with hematologic malignancies. *Blood* 1998; 92 (10): 126a, abstr. 508.
18. van den Oudenrijn S, de Haas M, van der Schoot CE, von dem Borne AEG. *Ex vivo* expansion of megakaryocytes in the presence of IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, SCF and TPO. *Blood* 1998; 92 (10): 647a, abstr. 2670.
19. Halle P, Rouzier C, Kanold J y col. *Ex vivo* expansion of CD34+/CD41+ late progenitors from peripheral blood CD34+ cells: potential transplant product to accelerate platelet recovery. *Blood* 1998; 92 (10): 125a, abstr. 506.
20. Stiff P, Oldenberg D, Hsi E y col. Transplantation of *ex vivo* expanded grown in Aastrom stromal-based perfusion bioreactors from marrow aliquots (40 ml) produces durable hematopoietic reconstitution after ablative chemotherapy. *Blood* 1997; 90: 395a, abstr. 1755.
21. Stiff P, Pecora A, Parthasarathy M y col. Umbilical cord blood transplants in adults using a combination of unexpanded *ex vivo* expanded cells: preliminary clinical observations. *Blood* 1998; 92 (10): 646a, abstr. 2668.
22. Engelhardt M, Douville J, de Reys S y col. Transplantation of *ex vivo* perfusion culture expanded bone marrow cells produces durable hematopoietic reconstitution after myeloablative chemotherapy. *Blood* 1998; 92 (10): 126a, abstr. 509.
23. Pecora AL, Preti R, Jennis A y col. Aastrom replicell™ system expanded bone marrow enhances hematopoietic recovery in patients receiving low doses of G-CSF primed blood stem cells. *Blood* 1998; 92 (10): 126a, abstr. 507.
24. Bachier C, Gokmen E, Teale J y col. *Ex vivo* expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. *Hematol Cell Ther* 1999; 41 (2): 78-81.
25. Lundell B, Vredenburgh J, Tyer C, DeSombre K, Smith A. *Ex vivo* expansion of bone marrow from breast cancer patients: reduction in tumor cell content through passive purging. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 (7): 707-715.
26. Emerson S. *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 1996; 87: 3082-3088.
27. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD y col. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.
28. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer H, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in children with malignant disease. *Lancet* 1995; 346: 214-219.
29. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham M y col. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996; 335: 157-166.
30. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G y col. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 1989; 86: 3828-3832.
31. Koller M, Manchel I, Maher RJ, Goltry KL, Armstrong RD, Smith AK. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. **Bone Marrow Transpl** 1998; 21: 653-663.
 32. Carow C, Hangoc G, Broxmeyer H. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: an effect enhanced by cord blood plasma. **Blood** 1993; 81 (4): 942-949.
 33. Lansdorp P, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. **J Exp Med** 1993; 178: 787.
 34. Mayani H, Lansdorp P. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood plasma. **Blood** 1994; 83 (12): 2410-2558.
 35. Moore MAS. *Ex vivo* gene therapy using cord blood CD34+ cells. **J Hematol** 1993; 2: 221-224.
 36. Querol S, Capmany G, Cancelas J, Garcia J. Expansion of cord blood progenitor cells. **Exp Hematol** 1999; 27 (5): 956-965.
 37. Liu X, Rapp N, Cheng L. Human mesenchymal stem cells enhance *ex vivo* expansion of human megakaryocyte, erythroid and myeloid progenitors from purified cord blood CD34+ cells. **Blood** 1998; 92 (10): 725a, abstr. 2977.
 38. Tao H, Gaudry L, Rice A, Chong B. Cord blood is better than bone marrow for generating megakaryocytic progenitor cells. **Br J Haematol** 1999; 104 (1): 178-185.
 39. Rubinstein P, Carrier C, Adamson J, Migliaccio A, Berkowitz R, Kurtzberg J. New York Blood Center's program for unrelated placental/umbilical cord blood (PCB) transplantation: 243 transplants in the first 3 years. **Blood** 1996; 88: 142a.
 40. Qiu L, Meagher R, Welhausen S, Brown R, Heye M, Herzig R. Expanded CD34+ umbilical cord blood cells retain the characteristics of the initial fresh CD34+ cells *in vitro*. **Blood** 1998; 92 (10): 644a, abstr. 2660.
 41. Piacibello W, Sanavio E, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Gaglioli F. Engraftment in NOD/SCID mice of human CD34+ cord blood cells after *ex vivo* expansion: evidence for the amplification and SELF-renewal of repopulating stem cells. **Blood** 1998; 92 (10): 114a, abstr. 462.
 42. Lazzari L, De Bernardi N, Villa A y col. Cord blood stem cells expanded *ex vivo* with TPO, FLT-3, IL-6 and IL-11 and serum-free medium show engrafting potential in NOD/SCID mice. **Blood** 1998; 92 (10): 114a, abstr. 463.
 43. Novelli E, Ramirez M, Leung W, Yang Y, Gao Z, Civin C. *Ex vivo* culture of cord blood CD34+ cells expands progenitor cell numbers and preserves short and long-term engraftment capacity in NOD/SCID mice. **Blood** 1998; 92 (10): 117a, abstr. 476.
 44. Bock TA, Müller R, Scheding S y col. Long-term repopulating capacity of human umbilical cord blood in NOD/SCID mice is maintained after *ex vivo* culture in serum-free medium containing IL-3, IL-6, SCF, FLT-3 with or without TPO. **Blood** 1998; 92 (10): 645a, abstr. 2665.
 45. Goltry K.L., Manchel I., Robertson W.M., Smith A.K. Increased expansion of primitive hematopoietic cells in unselected cord blood cultures using combinations of stem cell factor, thrombopoietin and Flt3-ligand. **Blood** 1998; 92 (10): 645, abstr. 2664.
 46. Jarosack J., Martin PL, Waters-Pick B y col. A phase I trial of augmentation of unrelated umbilical cord blood transplantation with *ex-vivo* expanded cells. **Blood** 1998; 92 (10): 646a, abstr. 2666.
 47. Shpall EJ, Quinones R, Hami L y col. Transplantation of cancer patients receiving high dose chemotherapy with *ex vivo* expanded cord blood cells. **Blood** 1998; 92 (10): 646a, abstr. 2667.
 48. Shpall E, Quinones R, Jones R y col. Transplantation of adult and pediatric cancer patients with cord blood progenitors expanded *ex vivo*. **Blood** 1999; 94 (10): 712a, abstr. 3145.
 49. Kögler G, Nürnberger W, Fischer J y col. Simultaneous cord blood transplantation of *ex vivo* expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. **Bone Marrow Transpl** 1999; 24: 397-403.
 50. Cairo M, Wagner J. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. **Blood** 1997; 90 (12): 4665-4678.
 51. Zimmerman T, Bender J, Lee W y col. Large scale selection of CD34+ peripheral blood progenitors and expansion of neutrophil precursors for clinical applications. **J Hematol** 1996; 5: 247-253.