

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 318**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10003540 .1**
- 96 Fecha de presentación: **26.01.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2206773**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

54 Título: **Expansión de poblaciones de células madres renovables**

30 Prioridad:
24.01.2002 US 350360 P
30.04.2002 US 376183 P
19.08.2002 US 404137 P
17.11.2002 IL 15290402

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
GAMIDA CELL LTD. (100.0%)
5 NAHUM HAFZADI STREET, OFER BUILDING,
GIVAT SHAUL
95 484 JERUSALEM, IL

72 Inventor/es:
PELED, TONY;
TREVES, AVI y
ROSEN, OREN

74 Agente/Representante:
ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 391 318 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos de expansión de células madre renovables, a poblaciones expandidas de células madre renovables y a sus usos. En particular, la presente invención se refiere a métodos para reducir la expresión y/o actividad de CD38. La expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo* se consigue mediante la regulación negativa de la señalización del receptor de ácido retinoico (RAR), el receptor de retinoides X (RXR), y/o el receptor de la Vitamina D (VDR), a nivel de proteínas mediante antagonistas de RAR, RXR y/o VDR o a nivel de la expresión mediante técnicas de ingeniería genética, tales como técnicas de ARN interferente pequeño (ARNip). La expansión *ex vivo* y/o *in vivo* de células madre se consigue mediante la regulación negativa de CD38 a nivel de proteínas mediante inhibidores de CD38, tales como, por ejemplo, nicotinamida, o a nivel de la expresión mediante técnicas de ingeniería genética, tales como técnicas de ARN interferente pequeño (ARNip). La presente invención se refiere además a aplicaciones terapéuticas en las que se utilizan estos métodos y/o las poblaciones de células madre expandidas obtenidas de este modo.

Ha surgido una necesidad cada vez mayor de cultivos *ex vivo* de células madre hematopoyéticas y no hematopoyéticas, en particular para fines tales como expansión de células madre y transducción génica mediada por retrovirus. Los métodos para generar cultivos *ex vivo* de células madre hasta la fecha, sin embargo, dan como resultado un rápido declive de la actividad de la población de células madre, que da como resultado además un potencial de auto-renovación marcadamente alterado y una reducida transplantabilidad de las poblaciones de células cultivadas. La necesidad de mejorar dichos métodos es obvia. Adicionalmente, las aplicaciones en terapia génica que usan vectores retrovirales necesitan el uso de células madre hematopoyéticas proliferantes, aunque requieren que estas células permanezcan indiferenciadas mientras están en cultivo, para mantener la expresión a largo plazo del gen transducido. Por lo tanto, la capacidad de mantener cultivos *ex vivo* de poblaciones de células madre hematopoyéticas y no hematopoyéticas con capacidad de auto-renovación a largo plazo es de importancia crítica para una amplia serie de aplicaciones médicas y terapéuticas.

Actualmente, la expansión de células madre renovables se ha conseguido cultivando las células madre sobre una capa nutritiva de fibroblastos, o cultivando las células en presencia de las citoquinas de acción temprana trombopoyetina (TPO), interleuquina-6 (IL-6), un ligando de FLT-3 y el factor de células madre (SCF) (Madlambayan GJ et al (2001) J Hematother Stem Cell Res 10: 481, Punzel M et al (1999) Leukemia 13: 92, y Lange W et al (1996) Leukemia 10: 943). Mientras que la expansión de células madre sobre una capa nutritiva da como resultado una amplia, sustancialmente sin fin expansión celular, la expansión de las células madre sin una capa nutritiva, en presencia de las citoquinas de acción temprana, da como resultado un elevado grado de diferenciación (véase los controles descritos en la sección de Ejemplos y Leslie NR et al (Blood (1998) 92: 4798), Petzer AL et al (1996) J Exp Med Jun 183: 2551, Kawa Y et al (2000) Pigment Cell Res 8: 73).

En cualquier caso, usando tecnología actual, las células madre no pueden expandirse a menos que en primer lugar se enriquezcan sustancialmente o se aislen hasta homogeneidad.

La técnica actualmente no consigue enseñar un método eficaz para la expansión de células madre renovables sin una capa nutritiva.

45 CD38 es un miembro de una familia emergente de enzimas citosólicas y unidas a la membrana cuyo sustrato es nicotinamida adenin dinucleótido (NAD), una coenzima distribuida de forma ubicua en la naturaleza. En el ser humano, CD38 es una glucoproteína trans-membrana de tipo II de 45 kDa. Recientemente, se ha demostrado que CD38 es una enzima multifuncional que ejerce actividad NAD⁺ glucohidrolasa y actividad ADP-ribosil ciclasa y, por lo tanto, es capaz de producir nicotinamida, ADP-ribosa (ADPR), ADPR cíclica (cADPR) y ácido nicotínico adenin dinucleótido fosfato (NAADP) a partir de sus sustratos (Howard et al., 1993 Science 252: 1056-1059; Lee et al., 1999 Biol. Chem. 380; 785-793). El dominio soluble de CD38 humano cataliza la conversión de NAD⁺ en ADP cíclico-ribosa y en ADP-ribosa mediante un intermedio covalente común (Sauve, A. A., Deng, H. T., Angelletti, R. H., y Schramm, V. L. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122, 7855-7859).

55 Sin embargo, se descubrió además que CD38 no solamente se caracteriza por actividad multienzimática, sino que es capaz además de movilizar calcio, de transducir señales y de adherirse a hialuronano y a otros ligandos. La interacción con CD38 en diversas subpoblaciones de leucocitos tiene efectos profundos aunque diversos sobre su esperanza de vida (Funaro A, Malavasi F J Biol Regul Homeost Agents, Enero-Marzo de 1999; 13 (1): 54-61 Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker).

60 CD38 se expresa ampliamente en células obtenidas de forma hematopoyética y no hematopoyética. También se ha descubierto que los homólogos de CD38 se expresan en células del estroma de mamíferos (Bst-1) y en células aisladas del invertebrado *Aplysia californica* (Prasad GS, 1996, nature Structural Biol 3: 957-964).

65 Dos de los metabolitos producidos por CD38, cADPR y NAADP, han demostrado inducir la liberación de calcio intracelular en células aisladas de tejidos de plantas, invertebrados y mamíferos, lo que sugiere que estos

metabolitos pueden ser reguladores globales de las respuestas al calcio (Lee et al., 1999 Biol. Chem. 380; 785-793). Se sabe que tanto cADPR como NAADP inducen la liberación de calcio de depósitos de calcio que son distintos de los controlados por receptores de Ip^3 (Clapper, D L et al., 1987, J. Biological Chem. 262: 9561-9568).

5 Por lo tanto, CD38, siendo la ADP-ribosil ciclasa de mamífero mejor caracterizada, se postula para ser una importante fuente de ADP-ribosa cíclica *in vivo*.

10 Los iones de calcio nucleoplásmico (Ca^{+2}) influyen en gran medida sobre funciones nucleares importantes tales como la transcripción génica, apoptosis, reparación de ADN, activación de topoisomerasa y desplegamiento de polimerasa. Aunque los receptores de inositol trifosfato y los receptores rianodina, que son tipos de canal de Ca^{+2} , están presentes en la membrana nuclear, su papel en la homeostasis de Ca^{+2} nuclear sigue sin estar claro.

15 Se descubrió que CD38/ADP-ribosil ciclasa tiene su sitio catalítico dentro del nucleoplasma y, por lo tanto, cataliza la ciclación intranuclear de NAD^+ , para producir cADPR nucleoplásmico. Este último activa los receptores de rianodina de la membrana nuclear interna para desencadenar la liberación de Ca^{+2} nucleoplásmico (Adebanjo OA et al. Nat Cell Biol noviembre de 1999; 1 (7): 409-14 A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca^{2+} homeostasis).

20 Se descubrió además que los agonistas de receptores de rianodina sensibilizan la liberación de calcio mediada por cADPR y los antagonistas de receptores de rianodina bloquean la liberación de calcio dependiente de cADPR (Galione A et al., 1991, Science 253: 143-146). Por lo tanto, se ha propuesto que es probable que cADPR regule las respuestas al calcio en tejidos tales como músculo y páncreas, en los que los receptores de rianodina se expresan (Day et al., 2000 Parasitol 120: 417-422; Silva et al., 1998, Biochem. Pharmacol 56: 997-1003). También se ha demostrado que, en células de músculo liso de mamífero, la liberación de calcio en respuesta a acetilcolina puede bloquearse no solamente con antagonistas del receptor de rianodina, sino también con antagonistas específicos de cADPR tales como 8-NH₂-cADPR o 8-Br-cADPR (Guse, A H, 1999, Cell. Signal. 11: 309-316). Estos descubrimientos, así como otros, indican que los agonistas/antagonistas del receptor de rianodina tales como cADPR pueden regular las respuestas al calcio en células aisladas de diversas especies.

30 Como se ha descrito anteriormente en este documento, la auto-renovación de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HPC), tanto *in vivo* como *in vitro*, está limitada por la diferenciación celular. La diferenciación en el sistema hematopoyético implica, entre otros cambios, la expresión alterada de antígenos de superficie (Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves MF (1982) Changes in cell surface antigen expression during hematopoietic differentiation. Blood 60: 703). En un ser humano normal, la mayor parte de las células madre pluripotentes hematopoyéticas y las células progenitoras comprometidas con linaje son CD34+. La mayoría de las células son CD34+CD38+, con una minoría de células (< 10%) siendo CD34+CD38-. El fenotipo CD34+CD38- parece identificar a las células hematopoyéticas más inmaduras, que son capaces de auto-renovación y diferenciación en múltiples linajes. La fracción celular CD34+CD38- contiene más células de inicio del cultivo a largo plazo (LTC-IC) pre-CFU y muestra un mantenimiento más largo de su fenotipo y una respuesta proliferativa a citoquinas retardada en comparación con células CD34+CD38+. Las CD34+CD38- pueden dar origen a células linfoides y mieloides *in vitro* y tienen una mayor capacidad de repoblar ratones SCID (Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 94: 5320). Además, en pacientes que recibieron trasplante de células sanguíneas autólogas, el número de células CD34+CD38 infundidas se correlacionaba positivamente con la velocidad de la recuperación hematopoyética. En línea con estas características funcionales, las células CD34+CD38- han demostrado tener niveles detectables de telomerasa.

50 Recientemente, se ha descrito que la diferenciación granulocítica de células HL-60 humanas (una línea celular comprometida) puede ser inducida por ácido retinoico y está acompañada por una expresión masiva de CD38. Concomitante con la expresión de CD38 era la acumulación de cADPR, y ambas evoluciones temporales precedían el inicio de la diferenciación, sugiriendo un papel causal para CD38. Consecuentemente, el tratamiento de células HL-60 con un inhibidor de la permeación de CD38, nicotinamida, inhibía la actividad de CD38 y la diferenciación. Un bloqueo más específico de la expresión de CD38 se consiguió usando oligonucleótidos morfolino antisentido dirigidos contra su ARNm, que también produjeron una inhibición correspondiente de la diferenciación (Munshi CB, Graeff R, Lee HC, J Biol Chem, 20 de diciembre de 2002; 277 (51): 49453-8).

60 En vista de los descubrimientos descritos anteriormente con respecto al efecto de CD38 sobre las rutas de transducción de señales de cADPR y rianodina y, por lo tanto, sobre la expansión y diferenciación celulares, los presentes inventores han previsto que modulando la expresión y/o la actividad de CD38, podía controlarse la expresión y diferenciación de células madre. En particular, se formuló la hipótesis de que al reducir la expresión y/o la actividad de CD38, usando agentes que regulan negativamente la expresión de CD38 o inhiben la actividad del mismo, se podría conseguir la expansión de células madre renovables, sin diferenciación.

65 La nicotinamida (NA) es un derivado soluble en agua de la vitamina B, cuyas formas activas fisiológicas son nicotinamida adenin dinucleótido ($NAD^+/NADH$) y nicotinamida adenin dinucleótido fosfato ($NADP^+/NADPH$). Las formas activas fisiológicas de NA sirven como coenzima en diversas reacciones metabólicas importantes. Se sabe

además que la nicotinamida inhibe la actividad enzimática de CD38, para afectar de este modo a la ruta de transducción de señales de cADPR, una característica que se demuestra, por ejemplo, en los estudios descritos anteriormente en este documento (véase, por ejemplo, Munshi CB, Graeff R, Lee HC, J Biol Chem 20 de diciembre de 2002; 277 (51): 49453-8).

Por lo tanto, al diseñar la presente invención, se formuló la hipótesis de que la nicotinamida, así como otros agentes que se sabe que inhiben la actividad enzimática de CD38, pueden utilizarse para expandir poblaciones de células madre mientras se inhibe la diferenciación de las células madre. Se formuló además la hipótesis de que otras moléculas pequeñas, que son capaces de interferir, directa o indirectamente, en la expresión de CD38 pueden usarse de forma similar.

El ácido retinoico (RA), el derivado ácido natural de la Vitamina A (retinol) es un importante regulador del desarrollo embrionario y también influye en el crecimiento y diferenciación de una gran variedad de tipos celulares de adulto. Los efectos biológicos del RA están mediados generalmente mediante su interacción con factores de transcripción nucleares activados por ligando específicos, sus receptores de RA cognados (RAR). Los receptores de la familia del ácido retinoico comprenden RAR, RXR, receptores de Vitamina D (VDR), receptores de hormona tiroidea (THR) y otros. Cuando son activados por ligandos específicos, estos receptores se comportan como factores de transcripción, controlando la expresión génica durante el desarrollo embrionario y del adulto. Las familias de RAR y RXR de receptores muestran únicamente estructuras modulares que alojan distintos dominios de unión a ADN y de unión a ligando. Estos receptores median probablemente sus efectos biológicos uniéndose a elementos reguladores (por ejemplo, elementos de respuesta a ácido retinoico, o RARE) como heterodímeros de RAR-RXR que están presentes en los promotores de sus genes diana específicos (1, 2, 3).

Los receptores de retinoides se comportan, por lo tanto, como reguladores transcripcionales dependientes de ligando, que reprimen la transcripción en ausencia de ligando y activan la transcripción en su presencia. Estos efectos divergentes sobre la transcripción están mediados a través del reclutamiento de co-reguladores: los receptores sin ligando se unen a correpresores (NCoR y SMRT) que se han descubierto dentro de un complejo que muestra actividad de histona desacetilasa (HDAC), mientras que los receptores con ligando reclutan co-activadores con actividad de histona acetilasa (HAT). También puede ser necesaria la remodelación de la cromatina, lo que sugiere una jerarquía de modificaciones de la estructura del promotor en genes diana de RA realizada por múltiples complejos co-reguladores.

El primer receptor de ácido retinoico identificado, denominado RAR-alfa, modula la transcripción de genes diana específicos de una manera que es dependiente de ligando, como se muestra posteriormente para muchos de los miembros de la superfamilia del receptor intracelular de hormona esteroide/tiroidea. El ligando de bajo peso molecular endógeno, del que depende la actividad moduladora de la transcripción de RAR-alfa, es ácido transretinoico total. Los cambios mediados por el receptor del ácido retinoico en la expresión génica dan como resultado alteraciones características en el fenotipo celular, que afectan a múltiples tejidos. Se han identificados genes relacionados con RAR-alfa adicionales, denominados RAR-beta y RAR-gamma, y muestran un alto nivel de homología con RAR-alfa y entre sí (4, 5). La región de unión al ligando de los tres subtipos de receptor RAR tiene una divergencia con la secuencia de aminoácidos primaria de menos de 15%.

Análogamente, se han identificado miembros adicionales de la superfamilia de receptores de esteroides/tiroidea sensibles al ácido retinoico (6), y se han denominado como la familia del receptor de retinoides X (RXR). Al igual que los RAR, también se sabe que los RXR comprenden al menos tres subtipos o isoformas, concretamente RXR-alfa, RXR-beta, y RXR-gamma, con patrones de expresión únicos correspondientes (7).

Aunque tanto los RAR como los RXR se unen al ligando ácido transretinoico total *in vivo*, los receptores difieren en varios aspectos importantes. En primer lugar, los RAR y RXR difieren significativamente en su estructura primaria, especialmente respecto a sus dominios de unión al ligando (por ejemplo, los dominios alfa muestran un simple 27% de identidad de aminoácidos compartida). Estas diferencias estructurales se manifiestan en sus diferentes grados relativos de sensibilidad a diversos metabolitos de Vitamina A y retinoides sintéticos. Adicionalmente, los patrones de distribución tisular son diferentes de forma distinta para RAR y RXR. Los RAR y RXR muestran diferente especificidad por genes diana. Un ejemplo es respecto a la proteína de unión a retinol celular de tipo II (CRBP II) y proteínas de apolipoproteína AI que otorgan sensibilidad a RXR, pero no a RAR. Además, RAR también ha demostrado reprimir la activación mediada por RXR mediante el elemento de respuesta a RXR, CRBP II (8). Estos datos indican que las dos rutas sensibles a ácido retinoico diferentes no son simplemente redundantes, sino que en su lugar manifiestan una compleja interacción.

La Vitamina D (VitD) es un activador potente adicional de uno de los receptores que pertenecen a la superfamilia del receptor de retinoide. La hormona nuclear 1 alfa, 25-dihidroxitamina D (3) (1 alfa, 25 (OH) (2) D (3)) se une a su receptor cognado (VDR) y actúa como factor de transcripción cuando está en contacto combinado con el receptor de retinoides X (RXR), proteínas coactivadoras, y sitios de unión a ADN específicos (VDRE). Los cambios conformacionales mediados por ligando del VDR comprenden el cambio molecular que controla los sucesos de señalización de 1 alfa, 25 (OH) (2) D (3) nuclear.

Los antagonistas de VDR específicos de células revelan el exquisito control y regulación del sistema endocrino de 1

alfa, 25 (OH) (2) D (3) pleotrópica, con consecuencias sobre el mantenimiento de la homeostasis de calcio, la mineralización ósea y otras funciones celulares. Los antagonistas de la VitD demostraron actuar mediante el mismo mecanismo: estabilizan selectivamente una conformación antagónica del dominio del unión al ligando del VDR dentro de complejos VDR-RXR-VDRE, inhibiendo la interacción del la VDR con proteínas coactivadoras y la inducción de la transactivación. Curiosamente, las células tratadas con antagonistas de VitD contienen heterodímeros de VDR-RXR en diferentes conformaciones en comparación con células estimuladas con agonistas de VitD (16).

El ácido retinoico y la VitD pueden estimular de forma cooperativa sucesos transcripcionales que implican un sitio de unión a ADN o un elemento de respuesta a hormona (HRE) común. A la inversa, se ha descubierto que los heterodímeros de VDR/RXR se unen sin polaridad definida y de manera transcripcionalmente improductiva a algunos elementos de respuesta a RA, y en estas circunstancias la Vitamina D inhibe la respuesta a RA. Aunque la competencia por la unión a ADN puede contribuir a esta respuesta inhibitoria, la valoración de coactivadores comunes mediante VDR también parece estar implicada en esta trans-represión. Por lo tanto, la regulación de la respuesta transcripcional a RA y VitD depende de un complejo patrón combinatorio de interacción entre los diferentes receptores, co-activadores (17) y su unión a los sitios de unión a ADN apropiados.

En paralelo a su función como reguladores transcripcionales, los receptores de retinoides tales como RAR y RXR desempeñan papeles importantes en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una serie de tipos celulares, también (18). Los agonistas de RAR tales como ácido transretinoico total (ATRA) se conocen predominantemente por sus efectos en la inducción de la diferenciación celular, como se observa en experimentos que utilizan células cancerosas malignas y células madre embrionarias (19), en los que la potente inducción de la diferenciación terminal era evidente. La diferenciación celular no es un resultado exclusivo, sin embargo, dado que se ha demostrado que RA muestra diferentes efectos sobre células hematopoyéticas cultivadas, dependiendo de su estado de maduración (20). Aunque los retinoides aceleraban el crecimiento y la diferenciación de progenitores de granulocitos en cultivos estimulados con citoquina de células CD34⁺ purificadas, el uso de células madre produjo un efecto opuesto (42). También se ha demostrado que el tratamiento con retinoides inhibe la diferenciación de células pre-adiposas (43).

Mientras que el antagonista de RAR, AGN 193109 ejercía un efecto positivo sobre la diferenciación de células madre hematopoyéticas (41) el agonista de RAR ácido 4-[4-(4-etilfenil)dimetil-cromen-il]jetinil]-benzoico] funciona de manera opuesta. A la inversa, se ha demostrado que los antagonistas de RAR previenen la diferenciación granulocítica en experimentos que utilizan la línea celular promielocítica, HL-60 (41). Análogamente, la creación de líneas celulares mieloides defectuosas en la señalización a través de sus receptores retinoides no experimenta diferenciación granulocítica en presencia de G-CSF (22), y los tejidos deficientes en retinoides adquieren un fenotipo pre-maligno, y una pérdida concomitante de diferenciación (29, 30). Las líneas celulares malignas obtenidas de diversos carcinomas muestran una expresión reducida de ARNm del receptor de ácido retinoico, lo que implica que la pérdida de expresión puede ser un suceso importante en la tumorigénesis (33, 34, 35, 36, 37). Además, la alteración de la actividad del receptor de ácido retinoico, como se demostraba en modelos en ratón *knock-out* con el gen RAR alterado, muestra un bloqueo *in vitro* a la diferenciación granulocítica (38, 39).

Sin embargo, otros estudios que usan un enfoque similar dieron como resultado el desarrollo de líneas celulares hematopoyéticas (23). Las células madre y progenitoras tempranas hematopoyéticas se caracterizan por su expresión superficial del marcador antigénico de superficie conocido como CD34⁺, y la exclusión de la expresión de los marcadores antigénicos de linaje superficiales, Lint. Experimentos que utilizaban varias líneas celulares de leucemia mostraban que el receptor del ácido retinoico mediaba resultados de señalización en la inducción de la expresión del antígeno de la superficie celular marcador de diferenciación CD38, mientras que antagonistas de RAR suprimían la regulación positiva del antígeno CD38 (24, 25).

Por lo tanto, hasta la fecha, los datos son controvertidos como papeles definitivos para VitD y RA en la inducción de diferenciación celular mielomonocítica y promielocítica, o la prevención de estos procesos. Aunque algunos estudios previos con inactivación de RAR, RXR y VDR usando antagonistas, tecnología antisentido o métodos de transducción con receptores truncados, produjeron diferenciación granulocítica y monocítica inhibida, estos estudios se realizaron usando líneas celulares de leucemia que están bloqueadas en la fase de mieloblasto o promielocítica de la diferenciación (19, 22, 64). Como se ha indicado anteriormente, los procedimientos de aislamiento para células madre hematopoyéticas y otras dan como resultado pequeñas poblaciones de células que son difíciles de expandir en cultivos *ex vivo*. Los actuales métodos de cultivo permiten la expansión a gran escala de poblaciones celulares progenitoras y diferenciadas, pero proporcionan una mínima amplificación del componente de células madre. Las aplicaciones y usos de poblaciones de células madre para terapia de sustitución de células, regeneración tisular *in vivo*, formación tisular *ex vivo* y terapia génica, necesitan la adquisición de grandes cantidades de estas poblaciones celulares.

Existe, por lo tanto, una ampliamente reconocida necesidad de, y sería altamente ventajoso contar con, un método para propagar grandes cantidades de células madre en un entorno *ex vivo*. Los métodos que permiten la expansión *ex vivo* de compartimentos de células madre que producen grandes cantidades de estas poblaciones celulares serán pioneros en aplicar posibles terapias con células madre para tratamiento humano, con un impacto claro y directo sobre el tratamiento de un número infinito de patologías y enfermedades.

Algunas afecciones patológicas e inducidas médicamente se caracterizan por un bajo número de células madre auto- o transplantadas renovables *in vivo*, afecciones en las que, será ventajoso tener un agente que pueda inducir la expansión de células madre *in vivo*.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención describe el uso de diversas moléculas para interferir en la actividad y/o expresión de CD38, induciendo de este modo la expansión *ex vivo* y/o *in vivo* de poblaciones de células madre, dando como resultado, cuando se aplica, por ejemplo, a células madre hematopoyéticas, grandes cantidades de células CD34⁺/Lin indiferenciadas (CD33, CD14, CD15, CD4, etc.), así como células CD34⁺/CD38⁻, especialmente células CD34⁺_{dim}/Lin⁻.

Esta nueva y versátil tecnología puede usarse para la expansión *ex vivo* e *in vivo* de células madre, de origen hematopoyético y otros, manteniendo su potencial de auto-renovación para cualquier aplicación *in vivo* o *ex vivo* que requiera grandes cantidades de poblaciones de células madre.

Al llevar la presente invención a la práctica, se descubrió de forma inesperada que la nicotinamida, un inhibidor de CD38 bien conocido, reprime el proceso de diferenciación de células madre y estimula y prolonga la fase de proliferación de células activas y expansión de las células *ex vivo*. Además, se descubrió inesperadamente que una serie de agentes químicos, antagonistas del receptor de ácido retinoico de las superfamilias de RAR y RXR, y antagonistas del receptor de la Vitamina D, que han demostrado afectar a la expresión de CD38, también reprimen el proceso de diferenciación de células madre y estimulan y prolongan, durante hasta 16-18 semanas, la fase de proliferación de células activas y expansión *ex vivo*.

Estos efectos inesperados se obtuvieron sorprendentemente cuando la fuente de células eran células hematopoyéticas enriquecidas en CD34⁺ (células madre y progenitoras tempranas) y, de la forma más sorprendente, cuando la fuente de células incluía toda la fracción de células sanguíneas mononucleares (fracción completa de leucocitos, que incluye células madre, progenitoras y comprometidas).

También se describe el descubrimiento de que cultivos de hepatocitos primarios incubados con los antagonistas descritos anteriormente mostraron un aumento de la proporción de células que producen α -fetoproteína, señalando por lo tanto la proliferación de hepatocitos tempranos. La suplementación de cultivos de hepatocitos con factores de crecimiento en solitario no era suficiente para estimular la proliferación de poblaciones de hepatocitos tempranos, aunque los cultivos tratados con antagonista de RAR suplementados con factor de crecimiento respondían de forma similar a cultivos tratados con antagonista de RAR sin suplementar. Además, el primer pase de cultivos tratados con antagonista de RAR suplementados con factor de crecimiento mostraba la presencia de una gran proporción de células ovaladas, indicativa de células progenitoras de hepatocitos, mientras que los cultivos no tratados suplementados no dieron como resultado evidencias de poblaciones de células ovaladas, por lo tanto, después del segundo pase mostraban cantidades drásticamente reducidas de hepatocitos. Por lo tanto, solamente la presencia del antagonista de RAR es suficiente para estimular la expansión celular de hepatocitos.

Este efecto recientemente descubierto de la nicotinamida así como de los antagonistas del receptor de las superfamilias de RAR, RXR y VDR, se usó para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos tipos de células como se detalla adicionalmente a continuación en este documento.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo se inhibe sustancialmente la diferenciación *ex vivo* de las células madre.

También se describe en este documento un método para expandir *in vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo se inhibe sustancialmente la diferenciación *in vivo* de las células madre, induciendo de este modo la renovación *in vivo* de las células madre.

Es otro objeto más de la presente invención usar las células madre expandidas en diferentes aplicaciones, incluyendo, aunque sin limitarse a, diferenciación cis posterior a la expansión, diferenciación trans posterior a la expansión, modulación genética posterior a la expansión, trasplantes posteriores a la expansión, implantes posteriores a la expansión, inmunoterapia adoptiva y similares.

Es, por lo tanto, otro objeto más específico de la presente invención proporcionar usos para trasplante o implante de células hematopoyéticas.

Es otro objeto más específico más de la presente invención proporcionar un método para modificar genéticamente células madre con un exógeno.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar usos para inmunoterapia adoptiva.

Es otro objeto más de la presente invención un método de movilización de células madre de médula ósea en la

sangre periférica de un donante para recoger las células.

Es un objeto adicional más de la presente invención proporcionar un método de conservación de células madre.

5 Es otro objeto más de la presente invención bolsas de recogida de células madre.

Además se describen, en este documento, ensayos para determinar si un antagonista específico del receptor de ácido retinoico es adecuado para inducir la expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo*.

10 Es otro objeto más de la presente invención los ensayos para determinar si un antagonista específico del receptor de retinoides X es adecuado para inducir expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo*.

Es otro objeto más de la presente invención los ensayos para determinar si un antagonista específico del receptor de la vitamina D es adecuado para inducir expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo*.

15 Es otro objeto más de la presente invención los ensayos para determinar si la señalización específica a través de receptores de ácido retinoico es adecuada para inducir expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo*.

20 Es otro objeto más de la presente invención los ensayos para determinar si la señalización específica mediante receptores de retinoides X es adecuada para inducir expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo*.

Es otro objeto más de la presente invención los ensayos para determinar si la señalización específica mediante receptores de la Vitamina D es adecuada para inducir expansión de células madre *ex vivo* y/o *in vivo*.

25 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un ensayo para determinar si un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X o un antagonista del receptor de la Vitamina D es un agente de expansión celular eficaz. Comprendiendo el ensayo cultivar una población de células madre o células de una línea celular sustancialmente indiferenciada, en presencia del antagonista del receptor de ácido retinoico, el antagonista del receptor de retinoides X o el antagonista del receptor de la Vitamina D y monitorizar la expansión de las células, en el que si se produce una mayor expansión y una menor diferenciación, en comparación con células no tratadas, el antagonista del receptor de ácido retinoico, el antagonista del receptor de retinoides X o el antagonista del receptor de la Vitamina D es un agente de expansión celular eficaz. Preferiblemente, el cultivo de la población de células madre o células de una línea celular sustancialmente indiferenciada se realiza en presencia de una cantidad eficaz de una citoquina, preferiblemente, una citoquina de acción temprana. Este ensayo puede ser usado, por un especialista en la técnica, para determinar cual de los antagonistas enumerados a continuación es más eficaz para el fin de implementar los diversos métodos, preparaciones y artículos de fabricación de la presente invención que se describen adicionalmente en lo sucesivo en este documento.

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

45 En una realización, el método comprende proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir la actividad y/o expresión de CD38, expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

50 En otra realización el método comprende proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

55 En otra realización el método comprende proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

60 En otra realización más, el método comprende proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, , expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

65 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención también se describe un método para expandir una población de células madre *in vivo*, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre

in vivo.

- 5 En una realización, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, el agente sirve para reducir una expresión y/ actividad de CD38.
- 10 En otra realización, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, el agente sirve para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D.
- 15 En otra alternativa más, el método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.
- 20 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para expandir *ex vivo* una población de células madre renovables hematopoyéticas *ex vivo*.
- 25 En una realización, el método comprende obtener de una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y proporcionar a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir la expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.
- 30 En otra realización, el método comprende la obtención de una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y proporcionar a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.
- 35 En otra realización más, el método comprende la obtención de una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y la provisión a las células en la muestra de condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.
- 40 En otra alternativa más, el método descrito comprende obtener una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y proporcionar a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, con nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de
- 45 nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandir de este modo una población de células madre renovables en la muestra.
- 50 De acuerdo además con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método, como se define en las reivindicaciones, para modificar genéticamente células madre con un exógeno.
- 55 En una realización, el método comprende (a) obtener células madre para modificarlas genéticamente; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) modificar genéticamente las células madre con el exógeno.
- 60 En otra realización más, el método comprende (a) obtener células madre para modificarlas genéticamente; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico y/o el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) modificar genéticamente las células madre con el exógeno.
- 65 En otra realización más, el método comprende (a) obtener células madre para modificarlas genéticamente; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de

nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) modificar genéticamente las células madre con el exógeno.

5 En una realización preferida, la modificación genética de las células se realiza mediante un vector, que comprende el exógeno, vector que es, por ejemplo, un vector viral o un vector de ácido nucleico.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan preparaciones de células hematopoyéticas transplantables.

10 En una realización, una preparación de células hematopoyéticas transplantables de la presente invención comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente, reduciendo el agente una actividad de CD38, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otra realización se describe una preparación de células hematopoyéticas transplantables que comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente, reduciendo el agente una capacidad de las células madre para responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 También se describe en otra realización una preparación de células hematopoyéticas transplantables que comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente, reduciendo el agente una capacidad de las células madre para responder a la señalización de receptor de ácido retinoico, receptor de retinoides X y/o receptor de la Vitamina D, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En otra realización, se describe una preparación de células hematopoyéticas transplantables de la presente invención comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente seleccionado entre el grupo constituido por nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 De acuerdo además con un aspecto de la presente invención, se proporciona una población expandida *ex vivo* de células madre hematopoyéticas, que comprende una pluralidad de células caracterizada por que 3-20% de las células son reseleccionables para células CD34⁺, de las cuales al menos 40% de las células son CD34⁺_{dim}, donde, en las células CD34⁺ reseleccionables, una mayoría de células que son Lin⁻ también son células CD34⁺_{dim}. En una realización, las células madre hematopoyéticas se obtienen de una fuente seleccionada entre el grupo constituido por médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical de neonato. En otra realización, la población de células tiene un único trasfondo genético. En otra realización más, la población expandida *ex vivo* de células madre hematopoyéticas comprende al menos N células obtenidas de un único donante, en las que N es igual al número medio de células CD34⁺ obtenidas de una muestra de sangre del cordón umbilical de neonato, médula ósea o sangre periférica multiplicada por 1.000. La expresión en la superficie celular de los marcadores CD34 y/o Lin puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis FACS o técnicas de tinción inmunohistológicas. Un potencial de auto-renovación de las células madre puede determinarse mediante formación de colonias a largo plazo (LTC-CFUc) o mediante injerto prendido *in vivo* en un modelo en ratón SCID-Hu.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para conservar células madre que comprende manejar la célula madre en al menos una de las etapas seleccionadas entre el grupo constituido por recogida, aislamiento y almacenamiento, en presencia de una cantidad eficaz de un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y/o un antagonista del receptor de la Vitamina D. Alternativamente, el método comprende manejar la célula madre en al menos una de las etapas seleccionadas entre el grupo constituido por recogida, aislamiento y almacenamiento, en presencia de una cantidad eficaz de nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

40 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención también se describe una bolsa de recogida/cultivo de células suplementada con una cantidad eficaz de un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y/o un antagonista del receptor de la Vitamina D, que inhibe sustancialmente la diferenciación celular, o con una cantidad eficaz de nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, que también inhibe sustancialmente la diferenciación celular; y un tampón de separación y/o lavado de células suplementado con una cantidad eficaz de un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y/o un antagonista del receptor de la Vitamina D, que inhibe sustancialmente la diferenciación celular,

o con una cantidad eficaz de nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, que también inhibe sustancialmente la diferenciación celular.

5 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, también se describe en este documento un método de trasplante o implante de células hematopoyéticas.

10 En una realización preferida, el método comprende (a) obtener células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantar o implantar las células madre en un receptor.

15 En otra realización preferida, el método comprende (a) obtener células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantar o implantar las células madre en un receptor.

20 En otra realización preferida, el método comprende (a) obtener células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantar o implantar las células madre en un receptor.

25 En otra alternativa más, el método puede comprender (a) obtener células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantar o implantar las células madre en un receptor.

35 El donante y el receptor pueden ser un único individuo o diferentes individuos, por ejemplo, individuos alogénicos.

De acuerdo con la presente invención también se describe un método de inmunoterapia adoptiva.

40 El método puede comprender (a) obtener células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) trasplantar las células madre al receptor.

45 En otra alternativa, el método comprende (a) obtener células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) trasplantar las células madre al receptor.

50 En otra alternativa más, el método comprende (a) obtener células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico y/o el receptor de retinoides X y/o el receptor de Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) trasplantar las células madre al receptor.

55 En otra alternativa más, el método comprende (a) obtener células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionar a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) trasplantar las células madre al receptor.

60 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se describe además un método de movilización de células madre de médula ósea en la sangre periférica de un donante para recoger las células.

En una alternativa el método puede comprender (a) administrar una cantidad eficaz de un agente al donante para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recoger las células mediante leucoforesis.

5 En otra alternativa, el método comprende (a) administrar una cantidad eficaz de un agente al donante para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recoger las células mediante leucoforesis.

10 En otra alternativa más, el método comprende (a) administrar una cantidad eficaz de un agente al donante para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico y/o el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recoger las células mediante leucoforesis.

15 En otra alternativa más, el método comprende (a) administrar al donante una cantidad eficaz de un seleccionado entre el grupo constituido por nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recoger las células mediante leucoforesis.

20 Preferiblemente, los métodos de movilización de células madre comprenden además administrar al donante al menos una citoquina, preferiblemente al menos una citoquina temprana.

25 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas a continuación, la reducción de la expresión y/o actividad de CD38 se realiza mediante un agente que regula negativamente la expresión de CD38.

30 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el agente que regula negativamente la expresión de CD38 se selecciona entre el grupo constituido por un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y un antagonista del receptor de la Vitamina D. Como alternativa, este agente es un antagonista para reducir una capacidad de las células madre para responder a ácido retinoico, retinoide y/o Vitamina D.

35 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el agente que regula negativamente la expresión de CD38 puede ser un polinucleótido.

40 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el agente que regula negativamente la expresión de CD38 que es un polinucleótido puede codificar un anticuerpo o anticuerpo intracelular anti CD38, anti receptor del ácido retinoico, anti receptor de retinoides X o anti receptor de la Vitamina D.

45 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el polinucleótido puede ser una molécula de polinucleótido interferente pequeño dirigida para causar la degradación del ARNm del receptor de ácido retinoico, receptor de retinoides X o receptor de la Vitamina D de CD38 intracelular.

De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la molécula del polinucleótido interferente pequeña puede seleccionarse entre el grupo constituido por una molécula de ARNi, una molécula anti-sentido, una molécula de ribozima y una molécula de ADNzima.

50 De acuerdo con las características adicionales de las realizaciones preferidas descritas de acuerdo con la invención, la reducción de la actividad de CD38 se realiza mediante un agente que inhibe la actividad de CD38. El agente es nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

55 El análogo de nicotinamida se selecciona preferiblemente entre el grupo constituido por benzamida, nicotintioamida, ácido nicotínico y ácido α -amino-3-indolpropiónico.

60 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas a continuación, proporcionar a las células madre las condiciones para la proliferación celular *ex vivo* comprende proporcionar a las células nutrientes y citoquinas.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las citoquinas son citoquinas de acción temprana.

65 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las citoquinas de acción temprana se seleccionan entre el grupo constituido por el factor de células madre, ligando FLT3, interleuquina-1,

interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-6, interleuquina-10, interleuquina-12, factor de necrosis tumoral- α y trombopoyetina.

5 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las citoquinas son citoquinas de acción tardía.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las citoquinas de acción tardía se seleccionan entre el grupo constituido por factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, eritropoyetina, FGF, EGF, NGF, VEGF, LIF, Factor de crecimiento de hepatocitos y factor estimulador de colonias de macrófagos.

De acuerdo con otras características más descritas, las células madre se seleccionan entre el grupo constituido por células madre embrionarias y células madre adultas.

15 De acuerdo con la invención, las células madre son células madre hematopoyéticas.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las células madre se obtienen de una fuente seleccionada entre el grupo constituido por médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical de neonato.

20 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la células madre que se someten a expansión están mezcladas (por ejemplo, no separadas de, no enriquecidas) con células comprometidas.

25 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las células madre están enriquecidas en células CD34⁺ hematopoyéticas.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, las células hematopoyéticas se caracterizan por una ausencia, o expresión significativamente reducida de antígenos de la superficie celular CD38, CD3, CD61, CD19, CD33, CD14, CD15 o CD4.

30 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la reducción de la capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización es reversible, por ejemplo, reversible de forma inherente.

35 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la reducción de la capacidad de las células madre de responder a los antagonistas y/o las rutas de señalización anteriores de los receptores anteriores se realiza cultivando *ex vivo* las células madre en presencia de una cantidad eficaz de al menos un antagonista del receptor de ácido retinoico, al menos un antagonista del receptor de retinoides X y/o al menos un antagonista del receptor X de la Vitamina D, preferiblemente, durante un periodo de tiempo de 0,1-50%, preferiblemente, 0,1-25%, más preferiblemente, 0,1-15%, de un periodo completo de cultivo *ex vivo* de las células madre.

El antagonista del receptor de ácido retinoico puede seleccionarse entre el grupo constituido por:

45 AGN 194310; AGN 193109; ácido 3-(4-Metoxi-fenilsulfanil)-3-metil-butírico;
6-Metoxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona, 2,2-Dimetil-4-oxo-tiocroman-6-iltrifluorometano-sulfonato; 4-((2,2-dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il)etinil)-benzoato de etilo; 4-((2,2-dimetil-1-4-trifluorometanosulfoniloxi-(2H)-tiocromen-6-il)etinil)-benzoato de etilo (41);
Tiocromen-6-il]-etinil]-benzoato(il);
1'1'-dióxido del ácido (p-[(E)-2-[3'4'-Dihidro-4,4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotiopiran-6'il]propenil]benzoico;
50 Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-butoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-propoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-pentoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-hexoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-heptoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
55 Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-octoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido (2E,4E,6E)-7-[3-t-butil-5-(1-fenil-vinil)-fenil]-3-metil-octa-2,4,6-trienoico; ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-
{[4,5-sup.3H.sub.2]-n-pentoxi}fenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Éster etílico del ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-tercbutil-2-etoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico;
Ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-tercbutil-2-etoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico;
60 Ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-tercbutil-2-butoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico;
Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-etoxifenil] 3-metil-2,4,6-octatrienoico;
Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-butiloxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico; ácido 4-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-carboxamido)benzoico;
Ácido (2E,4E)-3-metil-5-[(1S,2S)-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-ciclopropil]-penta-2,4-dienoico;
65 1',1'-dióxido del ácido p-[(E)-2-[3',4'-Dihidro-4',4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotiopiran-6'-il]propenil]benzoico;
Ácido 4-(7,7,10,10-Tetrametil-1-piridin-3-ilmetil-4,5,7,8,9,10-hexahidro-1H-nafto[2,3-g]indol-3-il)-benzoico;

5 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-metoxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-etoxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-hexiloxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-octiloxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico; y
 10 Ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-terc-butyl-2-butoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-(3-n-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)-3-metilocta-2,4,6-trienoico, ácido 4-(5H-2,3(2,5 dimetil-2,5-hexano)-5-n-propildibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il)benzoico,
 Ácido 4-(5H-2,3-(2,5-dimetil-2,5-hexano)-5metil-8-nitrodibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il)benzoico,
 Ácido 4-[[4-(4-Etilfenil)2,2-dimetil-(2H)-tiocromen-6-il]etinil]benzoico,
 10 Ácido 4-[4-2metil-1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-il-fenilcarbamoil]benzoico,
 Ácido 4-[4,5,7,8,9,10-hexahidro-7,7,10,10-tetrametil-1-(3-piridilmetil)-antra[1,2-b]pirrol-3-il]benzoico,
 Ácido (3-piridilmetil)-[5-tiaantra[2,1-b]pirrol-3-il]benzoico, y
 Ácido (3-piridilmetil)-antra[2m1-d]pirazol-3-il]benzoico.

15 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el antagonista del receptor de retinoides X descrito puede seleccionarse entre el grupo constituido por:

LGN100572, LGN100574,
 20 1-(3-hidroxil-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)etanona,
 1-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)etanona,
 3-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)but-2-enonitrilo,
 3-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)but-2-enal, ácido (2E,4E,6E)-7-3[-propoxi-5,6,7,8-
 tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-2-il]-3-metilocta-2,4,6-trienoico,
 25 Ácido 4-[3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil]carbonil]benzoico,
 Ácido 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]benzoico,
 Ácido 4-[1(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)ciclopropil]benzoico,
 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil] bencenotetrazol,
 Ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]piridin-5-carboxílico,
 30 Ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etil]piridin-5-carboxílico, etil-2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-
 5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]piridin-5-carboxilato,
 Ácido 5-[1-3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]piridin-2-carboxílico, ácido 2-(1-(3,5,5,8,8-pentametil-
 5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)ciclopropil]piridin-5-carboxílico, 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-
 naftil)ciclopropil]piridin-5-carboxilato de metilo,
 35 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]-N-(4-hidroxifenil)benzamida, ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-
 Pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]piridin-5-carboxílico, ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-Pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-
 naftil)ciclopropil]piridin-5-carboxílico, butiloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-
 naftil)carbonil]benzoico, propiloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 Cianoimina del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 Aliloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 40 4-(ácido 3-metilbut-2-enoico) oxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)carbonil]benzoico, y
 1-aminoetiloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)carbonil]benzoico
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-(3-n-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)-3-metilocta-2,4,6-trienoico, y ácido
 4-(5H-2,3(2,5 dimetil-2,5-hexano)-5-n-propildibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il)benzoico, y
 45 Ácido 4-(5H-2,3-(2,5-dimetil-2,5-hexano)-5metil-8-nitrodibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il)benzoico.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas el antagonista del receptor de la
 Vitamina D descrito puede seleccionarse entre el grupo constituido por: 1 alfa, 25-(OH)-D3-26, 23 lactona; 1alfa, 25-
 dihidroxivitamina D (3); el éster 25-carboxílico ZK159222; (23S)-25-deshidro-1 alfa-OH-D (3); (23R)-25-deshidro-1
 alfa-OH-D (3); 1 beta, 25 (OH) 2 D3; 1 beta, 25 (OH) 2-3-epi-D3; (23S) 25-deshidro-1 alfa (OH) D3-26,23-lactona;
 50 (23R) 25-deshidro-1 alfa (OH) D3-26,23-lactona y Butil-(5Z,7E,22E-(1S,7E,22E-(1S,3R,24R)-1,3,24-trihidroxi-26,27-
 ciclo-9,10-secocolesta-5,7,10(19),22-tetraen-25-carboxilato).

La presente invención aborda con éxito las desventajas de las configuraciones conocidas actualmente
 proporcionando un método de propagación de células, aunque retardando su diferenciación mediante interferencia
 55 en la expresión y/o actividad de CD38, o en la señalización de receptores de ácido retinoico, de retinoides X y/o de
 Vitamina D.

La presente invención aborda además con éxito las desventajas de las configuraciones conocidas actualmente
 permitiendo por primera vez, la expansión de células madre renovables en presencia de células comprometidas,
 60 para obtener una población expandida de células madre renovables, a pesar de su origen de una población de
 células mezcladas, en la que constituyen una fracción de un porcentaje.

Características y ventajas adicionales de los métodos, preparaciones celulares y artículos de fabricación de acuerdo
 con la presente invención serán evidentes para el especialista en la técnica con la lectura de las siguientes
 65 descripciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se describe en este documento, a modo de ejemplo solamente, en referencia a los dibujos adjuntos. En referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los dibujos particulares mostrados lo son a modo de ejemplo y para fines de descripción ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan para proporcionar la que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo la descripción tomada junto con los dibujos evidente, para los expertos en la materia, cómo pueden realizarse en la práctica las diferentes formas de la invención.

En los dibujos:

La figura 1A es un diagrama de análisis FACS que muestra la expresión del marcador de superficie de control con expresión liberal de CD34, CD38 y antígenos relacionados con el linaje.

La figura 1B es un diagrama de análisis FACS que muestra la expresión del marcador de superficie de cultivo celular tratado con antagonista de RAR (10^{-5} M) con un nivel similar de expresión del antígeno CD34, pero una supresión casi completa de la expresión de CD38 y antígeno relacionado con el linaje, en comparación con los controles.

La figura 1C es un diagrama de análisis FACS que muestra la expresión del marcador de superficie de cultivo celular tratado con antagonista de RAR (10^{-6} M) con un nivel similar de expresión del antígeno CD34, pero una supresión casi completa de la expresión de CD38 y antígeno relacionado con el linaje, en comparación con los controles.

La figura 2A es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS que muestra niveles comparables de expansión de células CD34⁺ en cultivos de control y tratados con antagonista de RAR.

La figura 2B es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS que muestra niveles de expansión de células CD34⁺CD38⁺ marcadamente aumentados en respuesta al tratamiento con el antagonista de RAR, a las concentraciones de 10^{-5} o 10^{-7} M, en comparación con los controles.

La figura 2C es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS que muestra niveles de expansión de células CD34⁺Lin⁻ marcadamente aumentados en respuesta al tratamiento con el antagonista de RAR, a las concentraciones de 10^{-5} o 10^{-7} M, en comparación con los controles.

La figura 3A es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS que muestra una expresión en superficie de CD34⁺ comparable, hasta 2 semanas después de la siembra de cultivos de control y tratados. Los cultivos se trataron con un antagonista de RAR, 10^{-5} M y 10^{-7} M [o 41 µg/litro a 0,41 µg/litro] y una combinación de 4 citoquinas (IL-6, TPO, FLT3 y SCF), y se sometieron a una etapa adicional de selección positiva antes del análisis FACS. Se observa un marcado aumento de la expresión, sin embargo, 9 y 11 semanas después de la siembra en cultivos tratados con antagonistas de RAR, en comparación con los controles.

La figura 3B es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS que muestra expresión en superficie de CD34⁺CD38⁻ comparable, hasta 2 semanas después de la siembra de cultivos de control y tratados con antagonista de RAR y citoquina, (como los tratados en 3A), en muestras sometidas a una etapa adicional de selección positiva. Se observa un marcado aumento de la expresión 9 y 11 semanas después de la siembra en cultivos tratados con antagonista de RAR, en comparación con los controles.

La figura 3C es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS que muestra expresión en superficie de CD34⁺Lin⁻ aumentada, a las 2 semanas después de la siembra de cultivos tratados con antagonista de RAR, (como los tratados en 3A), en comparación con los controles, en muestras sometidas a una etapa adicional de selección positiva. Se observa una expresión marcadamente aumentada en los grupos tratados con antagonista de RAR a las 9 y 11 semanas después de la siembra.

La figura 4 es un gráfico de datos recogidos mediante análisis FACS y capacidad de LTC-CFU que muestra altos niveles de proliferación de células CD34⁺ y capacidad de formación de unidades formadoras de colonias a largo plazo en cultivos *ex vivo* tratados con 10^{-7} M del antagonista de RAR y una combinación de las 4 citoquinas, como anteriormente, hasta casi 12 semanas después de la siembra. A las 10 semanas y 11 semanas (CFU y células CD34, respectivamente), estas poblaciones comienzan a disminuir.

La figura 5A es un diagrama de análisis FACS del control negativo que no muestra tinción de fondo.

La figura 5B es un diagrama de análisis FACS del control positivo de cultivos celulares reseleccionados que muestra una abundante tinción de la superficie de células CD34⁺.

La figura 5C es un diagrama de análisis FACS de los cultivos tratados con antagonista de RAR, 2 semanas después de la reselección que muestra un marcado desplazamiento a la izquierda del perfil, coherente con un estado menos diferenciado.

La figura 5D es un diagrama de análisis FACS de los cultivos tratados con antagonista de RAR (10^{-7}) 11 semanas después de la reselección, que muestra abundante tinción de la superficie de células CD34⁺, y un perfil coherente con un estado más diferenciado.

La figura 5E es un diagrama de análisis FACS de los cultivos tratados con antagonista de RAR (10^{-5}) 11 semanas después de la reselección que muestra un marcado desplazamiento a la izquierda del perfil, coherente con un estado menos diferenciado.

La figura 6A es un gráfico de los datos de unidades formadoras de colonias que muestra que tanto cultivos a largo plazo pulsados durante las 3 primeras semanas con los antagonistas como cultivos a los que se

administraba antagonistas de RAR de forma continua mostraban un aumento de 5 veces del contenido de CFU en comparación con los valores de control.

La figura 6B es un gráfico de datos de enumeración celular que muestra que cultivos a largo plazo pulsados durante las 3 primeras semanas con antagonistas, o a los que se administraron antagonistas de RAR de forma continua, revelan un aumento de 5 veces del contenido de CFU en comparación con los valores de control.

La figura 7 es un gráfico de datos de unidades formadoras de colonias mezclados que muestra que tanto cultivos a largo plazo pulsados durante las 3 primeras semanas con los antagonistas como cultivos a los que se administraba antagonistas de RAR de forma continua revelan un aumento dramático del contenido de CFU en comparación con los valores de control, con el tratamiento por pulsos produciendo los valores de CFU más altos.

La figura 8A es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos primarios de tres semanas de edad aislados de ratones. Los hepatocitos se sondearon en busca de la expresión de α -fetoproteína (AFP) y se contratiñeron con hematoxilina. La tinción de AFP moderada es evidente (precipitado de color rojo-marrón).

La figura 8B es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos primarios de tres semanas de edad aislados de ratones. Los hepatocitos se incubaron en presencia de antagonista del receptor de ácido retinoico 10^{-5} M (AGN 194310) y se sondearon de forma similar en busca de la expresión de AFP y se contratiñeron con hematoxilina. Los hepatocitos tratados con AGN 194310 revelaron un marcado aumento de la expresión de AFP, en comparación con los controles.

La figura 9A es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos murinos primarios, de tres semanas de edad, teñidos con giemsa que revela la morfología celular. En esta muestra se observaron pocas células ovaladas (flecha gruesa), en contraste con numerosos hepatocitos con morfología típica (flecha estrecha)

La figura 9B es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos primarios teñidos con giemsa incubados en presencia de agonista del receptor de ácido retinoico 10^{-5} M (AGN 194310). Las células tratadas con el antagonista mostraban un marcado aumento de la población de células ovaladas (flecha).

La figura 9C es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos primarios teñidos con giemsa incubados en presencia de agonista del receptor de ácido retinoico 10^{-5} M (AGN 194310) seguido de tripsinización y resiembra en placas, a una proporción de 1:2, en un medio de cultivo desprovisto de citoquinas. Estos cultivos revelaban, de forma similar, morfología de hepatocitos característica

La figura 10A es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos primarios de tres semanas de edad aislados de ratones, y suplementados con EGF (20 ng/ml) y HGF (20 ng/ml). Los hepatocitos se trataron con antagonista de RAR AGN 194310 a 10^{-5} M y 10^{-7} M, se sondearon en busca de la expresión de albúmina y se contratiñeron con hematoxilina. No existe tinción de fondo apreciable. Lo que indicaba que las células expandidas en cultivos suplementados con el antagonista son hepatocitos por naturaleza.

La figura 10B es una fotomicrografía de cultivos de control de hepatocitos primarios de tres semanas de edad aislados de ratones, suplementados de forma similar con EGF y HGF y sondeados en busca de la expresión de albúmina. En este caso, también es evidente una tinción de fondo despreciable.

La figura 10C es una fotomicrografía de cultivos tratados con antagonista de RAR de hepatocitos primarios de tres semanas de edad aislados de ratones, suplementados de forma similar con EGF y HGF y sondeados en busca de la expresión de α -fetoproteína. Una fuerte tinción de AFP significativa es evidente (precipitado de color rojo-marrón), lo que indicaba expansión de células progenitoras.

La figura 10D es una fotomicrografía de cultivos de control de hepatocitos primarios de tres semanas de edad aislados de ratones, suplementados de forma similar con EGF y HGF y sondeados en busca de la expresión de α -fetoproteína. Una tinción despreciable es evidente, lo que indicaba un fenotipo celular más diferenciado. Todas las figuras se fotografiaron a $10\times/0,3$ aumentos.

La figura 11A es una fotomicrografía de cultivos de control de hepatocitos de primer pase aislados de ratones y suplementados con EGF y HGF, división 1:2 después de 2 semanas en cultivo y cultivados durante una semana adicional antes de sondear en busca de la expresión de albúmina, como anteriormente. Numerosos hepatocitos típicos (flecha pequeña) son evidentes.

La figura 11B es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos tratados con antagonista de RAR, AGN 194310 (10^{-5} - 10^{-7} M) de primer pase, aislados de ratones cultivados como en A y sondeados en busca de la expresión de albúmina. La morfología de hepatocitos típica (flecha pequeña) es evidente también en este marco.

La figura 11C es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos tratados con antagonista de RAR de primer pase, cultivados y sondeados como en B. Numerosas células ovaladas características son evidentes (flecha grande) en el campo. Aumento - $20\times/0,5$.

La figura 11D es una fotomicrografía con menos aumentos de la figura 11C, que revela numerosos islotes de células ovaladas en los cultivos tratados con antagonista de RAR, coherente con un fenotipo menos diferenciado.

La figura 11E es una fotomicrografía de cultivos de control de hepatocitos de segundo pase aislados de ratones y suplementados con EGF y HGF, división 1:2 después de 2 semanas en cultivo, cultivados durante una semana adicional antes de la división 1:4, y después de un cultivo final de 4 días adicionales, sondeo en busca de la expresión de albúmina, como anteriormente. Pocos hepatocitos son evidentes.

La figura 11F es una fotomicrografía de cultivos de hepatocitos de segundo pase aislados y cultivados de forma similar tratados con el antagonista de RAR AGN 194310 (10^{-5} M a 10^{-7} M). Números significativamente mayores de hepatocitos son evidentes en los cultivos en comparación con los controles.

Aumento - 20x/0,5.

La figura 12A es un diagrama que presente el análisis FACS de cultivos tratados con citoquinas solamente (control), el antagonista de RAR, AGN 194310 (10^{-7} M) y una combinación de antagonista de RAR (10^{-7} M) y antagonista de RXR, 3 semanas después de la reselección. Se demuestra un marcado desplazamiento hacia la izquierda del perfil del tratamiento combinado con antagonistas de RAR y RXR, coherente con un estado menos diferenciado, en comparación con el control no tratado y el tratamiento con antagonista de RAR.

La figura 12B es un diagrama que presenta un análisis FACS de cultivos tratados con citoquinas solamente (control), el antagonista de RAR AGN 194310 (10^{-7} M), al antagonista de RXR LGN 100754 (10^{-7} M) y una combinación de antagonistas de RAR y RXR (10^{-7} M), 5 semanas después de la reselección. Se demuestra un marcado desplazamiento hacia la izquierda del perfil del tratamiento combinado con antagonistas de RAR y RXR, coherente con un estado menos diferenciado, en comparación con el tratamiento con antagonista de RAR.

La figura 13A es un diagrama de barras que presenta los datos obtenidos mediante análisis FACS de cultivos tratados con un antagonista de RAR AGN 194310, un antagonista de RXR LGN 100754 y una combinación de los mismos. Niveles de expresión en superficie de $CD34^{+}$ comparables determinados 3 y 5 semanas después de la siembra, son evidentes. Se demuestra un marcado aumento de la expresión en cultivos tratados con una combinación de los antagonistas de RAR y RXR, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente), los tratamientos con antagonista de RAR y el antagonista de RXR.

La figura 13B es un diagrama de barras que presenta los datos obtenidos mediante análisis FACS de cultivos tratados con un antagonista de RAR AGN 194310, un antagonista de RXR LGN 100754 y una combinación de los mismos. Son evidentes niveles de expresión superficial de $CD34^{+}/38^{-}$ comparables determinados 3 y 5 semanas después de la siembra. Se demuestra un marcado aumento de la expresión en cultivos tratados con la combinación de antagonistas de RAR y RXR, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente), tratamientos con el antagonista de RAR y el antagonista de RXR.

La figura 13C es un diagrama de barras que presenta los datos obtenidos mediante análisis FACS de cultivos tratados con un antagonista de RAR AGN 194310, un antagonista de RXR LGN 100754 y una combinación de los mismos. Son evidentes niveles de expresión superficial de $CD34^{+}/Lin^{-}$ comparables determinados 3 y 5 semanas después de la siembra. Se demuestra un marcado aumento de la expresión en cultivos tratados con la combinación de los antagonistas de RAR y RXR, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente), tratamientos con el antagonista de RAR y el antagonista de RXR.

La figura 13D es un diagrama de barras que presenta la densidad celular total de cultivos tratados con un antagonista de RAR AGN 194310, un antagonista de RXR LGN 100754 y una combinación de los mismos. Es evidente un número comparable de células determinados 3 y 5 semanas después de la siembra. Se demuestra un aumento significativo de la densidad celular en cultivos tratados con antagonista de RAR+RXR 5 semanas después de la siembra, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente), los tratamientos con antagonista de RAR y el antagonista de RXR.

La figura 13E es un diagrama de barras que presenta los datos de unidades formadoras de colonias (CFU) de cultivos tratados con un antagonista de RAR AGN 194310, un antagonista de RXR LGN 100754 y una combinación de los mismos. Son evidentes niveles de CFU comparables determinados 3 y 5 semanas después de la siembra. Se demuestra un marcado aumento de CFU en cultivos tratados con la combinación de RAR y RXR, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente), tratamientos con el antagonista de RAR y el antagonista de RXR.

La figura 14 es un diagrama de barras que presenta la densidad de células $CD34^{+}$ enumerada en cultivo de 3 semanas. El cultivo celular se suplementó con citoquinas SCF, TPO, FLT3, IL-6 y IL-3, con o sin nicotinamida a concentraciones de 1 mM y 5 mM. Se demuestra un marcado aumento de la densidad de células $CD34^{+}$ en los cultivos tratados con nicotinamida.

La figura 15 es un diagrama de barras que presenta los datos obtenidos mediante análisis FACS de células $CD34^{+}/CD38^{-}$ en cultivo de 3 semanas. El cultivo celular se suplementó con citoquinas SCF, TPO, FLT3, IL-6 y IL-3, con o sin nicotinamida a concentraciones de 1 mM y 5 mM. Se demuestra un marcado aumento de la densidad de células $CD34^{+}/CD38^{-}$ en los cultivos tratados con nicotinamida.

La figura 16 es un diagrama de barras que presenta los datos obtenidos mediante análisis FACS de células $CD34^{+}/Lin^{-}$ en cultivo de 3 semanas. El cultivo celular se suplementó con citoquinas SCF, TPO, FLT3, IL-6 e IL-3, con o sin nicotinamida a concentraciones de 1 mM y 5 mM. Se demuestra un marcado aumento de la densidad de células $CD34^{+}/Lin^{-}$ en los cultivos tratados con nicotinamida.

La figura 17 es un diagrama de barras que presenta los datos obtenidos mediante análisis FACS de células $CD34^{+}/(HLA-DR38)^{-}$ en cultivo de 3 semanas. El cultivo celular se suplementó con citoquinas SCF, TPO, FLT3, IL-6 e IL-3, con o sin nicotinamida a concentraciones de 1 mM y 5 mM. Se demuestra un marcado aumento de la densidad de células $CD34^{+}/(HLA-DR38)^{-}$ en los cultivos tratados con nicotinamida.

La figura 18a es un diagrama de puntos que presenta un análisis FACS de células $CD34^{+}$ reseleccionadas de un cultivo de 3 semanas tratado con citoquinas, con o sin nicotinamida 5 mM. Las células $CD34^{+}/CD38^{-}$ se muestran en la parte superior izquierda del diagrama, lo que demuestra un marcado aumento de células $CD34^{+}/CD38^{-}$ en el cultivo tratado con nicotinamida.

La figura 18b es un diagrama de puntos que presenta un análisis FACS de células $CD34^{+}$ reseleccionadas de un cultivo de 3 semanas tratado con citoquinas, con o sin nicotinamida 5 mM, 3 semanas después de la reselección. Las células $CD34^{+}/Lin^{-}$ muestran en la parte superior izquierda del diagrama, lo que demuestra

un marcado aumento de células CD34⁺/Lin⁻ en el cultivo tratado con nicotinamida.

La figura 18c es un diagrama de puntos que presenta un análisis FACS de células CD34⁺ reseleccionadas de un cultivo de 3 semanas tratado con citoquinas, con o sin nicotinamida 5 mM, 3 semanas después de la reselección. Las células CD34⁺/(HLA-DR38)⁻ se muestran en la parte superior izquierda del diagrama, lo que demuestra un marcado aumento de células CD34⁺/(HLA-DR38)⁻ en el cultivo tratado con nicotinamida.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se refiere a métodos para expandir una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células *ex vivo* y/o *in vivo*. En una realización, la invención facilita el uso eficaz como una preparación de células cultivadas *ex vivo* terapéutica, que incluye una gran población expandida de células madre renovables, en la que la diferenciación se inhibió mientras se propagaba la expansión celular. Específicamente a este respecto, la presente invención puede usarse para proporcionar poblaciones expandidas *ex vivo* de células madre, que pueden usarse para aplicaciones en trasplantes de células hematopoyéticas, y en la generación de células madre adecuadas para manipulaciones genéticas, que pueden usarse para terapia génica celular. Las aplicaciones adicionales pueden incluir, aunque no se limitan a, inmunoterapia adoptiva, tratamientos para múltiples enfermedades, tales como, por ejemplo, β-hemoglobinopatía, implante de células madre en un entorno de diferenciación *cis* y diferenciación *trans in vivo*, y manipulación tisular *ex vivo* en entornos de diferenciación *cis* y diferenciación *trans*. La presente invención se refiere además a preparaciones de células madre expandidas y a artículos de fabricación para prepararlas.

La presente invención describe el uso de diversas moléculas (también denominadas en este documento como agentes), para interferir en la expresión y/o actividad de CD38, induciendo de este modo la expansión *ex vivo* de poblaciones de células madre, dando como resultado, cuando se aplican, por ejemplo, a células madre hematopoyéticas, grandes cantidades de células CD34⁺/Lin⁻ (CD33, CD14, CD15, CD4, etc.), así como CD34⁺/CD38⁻ indiferenciadas, especialmente células CD34⁺_{dim}/Lin⁻. Esta nueva y versátil tecnología puede usarse para la expansión *ex vivo* y/o *in vivo* de células madre, de origen hematopoyético y otros, manteniendo su potencial de auto-renovación para cualquier aplicación *in vivo* o *ex vivo* que requiera una gran población de células madre.

A la hora de llevar la presente invención a la práctica, se descubrió de forma inesperada que una serie de moléculas que son capaces de interferir en la expresión y/o actividad de CD38, reprimen el proceso de diferenciación de células madre y estimulan y prolongan, durante hasta 16-18 semanas, la fase de proliferación y expansión activa de células *ex vivo*. Después de aproximadamente 16-18 semanas de expansión, la células comienzan a diferenciarse; por lo tanto, el efecto de estas moléculas es reversible. En otras palabras, el tratamiento de las células *ex vivo* como se describe en este documento no da como resultado que las células se transformen en una línea celular.

Este inesperado efecto se obtuvo sorprendentemente cuando la fuente de células eran células hematopoyéticas enriquecidas en CD34⁺ (células madre y progenitoras tempranas) y, de la forma más sorprendente, también cuando se usó la fuente de células que incluía la fracción completa de células sanguíneas mononucleares (fracción total de leucocitos, que incluye células madre, progenitoras y comprometidas). Como se describe en la sección de trasfondo, actualmente no existe tecnología descrita mediante la cual expandir células madre no enriquecidas.

Además, los cultivos de hepatocitos primarios incubados con agentes tales como antagonistas del receptor de ácido retinoico de las superfamilias de RAR y RXR, revelaron un aumento de la proporción de células que producen α-fetoproteína, induciendo, por lo tanto, la proliferación de poblaciones hematopoyéticas tempranas. Los cultivos de hepatocitos tratados con antagonista cultivados sin citoquinas persistieron durante al menos 3 semanas en cultivo, un descubrimiento en contraste agudo con datos previos indicaba casi una imposibilidad de cultivar hepatocitos primarios durante periodos prolongados de tiempo en cultivo, especialmente en ausencia de citoquinas (Wick M, et al. ALTEX. 1997; 14 (2): 51-56; Hino H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 5 de marzo de 1999; 256 (1): 184-91; y Tatenò C, y Yoshizato K. Am J Pathol. 1996; 148 (2): 383-92). La suplementación con factores de crecimiento en solitario era insuficiente para estimular la proliferación de hepatocitos, solamente el tratamiento con antagonista de RAR de cultivos de hepatocitos dio como resultado la proliferación de poblaciones de hepatocitos tempranas y su persistencia en el cultivo, evidente incluso después del primer y segundo pases.

Este efecto recién descubierto de las moléculas utilizables en el contexto de la presente invención se usó para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos tipos de células como se detalla adicionalmente en lo sucesivo en este documento en la siguiente sección de Ejemplos.

Los principios y funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y descripciones y ejemplos adjuntos.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y a la disposición de los componentes mostradas en la siguiente descripción o ilustrados en la sección de Ejemplos.

CD38 es un miembro de una familia emergente de enzimas citosólicas o unidas a membrana cuyo sustrato es nicotinamida adenin dinucleótido (NAD). Dos de los metabolitos producidos por CD38, cADPR y NAADP, han demostrado inducir la liberación de calcio intracelular en células aisladas de tejidos de plantas, invertebrados y mamíferos, lo que sugiere que estos metabolitos pueden ser reguladores globales de la respuestas al calcio (Lee et al., 1999 Biol. Chem. 380; 785-793).

Recientemente, se ha descrito que la diferenciación granulocítica de la línea celular comprometida humana de células HL-60 puede inducirse mediante ácido retinoico y está acompañada por una expresión masiva de CD38. Concomitante con la expresión de CD38 era la acumulación de cADPR, y ambas evoluciones temporales precedían el inicio de la diferenciación, lo que sugiere un papel causal para CD38. De forma consecuente, el tratamiento de células HL-60 con un inhibidor de la permeación de CD38, nicotinamida, inhibía tanto la actividad como la diferenciación de CD38. El bloqueo más específico de la expresión de CD38 se consiguió usando oligonucleótidos morfolino antisentido dirigidos a su ARNm, que también producían una inhibición correspondiente de la diferenciación (Munshi CB, Graeff R, Lee HC, J Biol Chem, 20 de diciembre de 2002; 277 (51): 49453-8).

Otros estudios han mostrado un efecto opuesto de la señalización de CD38 sobre la diferenciación de células progenitoras. El tratamiento a corto plazo de células progenitoras humanas con cADPR mediaba un aumento significativo del tamaño de las colonias y la productividad de la colonia, lo que implica una correlación directa entre la señalización de CD38 y la expansión de células madre *ex vivo* (Podesta (2000) FASEB J. 14: 680-690). En un estudio más reciente presentado por el mismo grupo, se abordaron los efectos de cADPR sobre el injerto prendido de células madre hemopoyéticas en ratones NOD/SCID irradiados (Podesta (2002) FASEB J. 3 de diciembre *e-publicación antes de la impresión*). En este estudio, se demostró *in vivo* un efecto doble de cADPR sobre progenitoras humanas hemopoyéticas, esencialmente, proliferación aumentada de progenitoras comprometidas responsables de la mejora del injerto prendido a corto plazo; y la expansión de células madre humanas con un aumento de injerto prendido humano a largo plazo en receptores secundarios. Por lo tanto, estos resultados sugieren el uso de cADPR para conseguir la expansión a largo plazo de células madre humanas.

Por lo tanto, los estudios de la técnica anterior realizados en células madre humanas, hasta la fecha, enseñan el uso de cADPR, un producto resultante de la catálisis de CD38, para la expansión *ex vivo* o *in vivo* de células madre humanas.

Al llevar la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto de forma sorprendente que la inhibición de la actividad o expresión de CD38 da como resultado la expansión *ex vivo* de células madre humanas y, al mismo tiempo, la diferenciación limitada de las células.

Evidentemente, las enseñanzas de la técnica anterior descrita anteriormente se alejan de la presente invención.

Los receptores de retinoides tales como RAR, RXR y VDR y sus agonistas, tales como Vitamina A y sus metabolitos activos y Vitamina D y sus metabolitos activos están implicados en la regulación de rutas de expresión génica asociadas con la proliferación y diferenciación celular.

La Vitamina D, que demostró ser un inductor de la diferenciación de células mielomonocíticas, transduce sus señales mediante la inducción de la heterodimerización de los receptores de retinoides RXR-VDR (28), mientras que la heterodimerización RAR-RXR o RXR-RXR es esencial para retinoides que inducen la diferenciación granulocítica.

Se demostró que los retinoides son esenciales para el mantenimiento de la diferenciación normal en muchos tejidos. Por ejemplo, en el sistema epitelial (29), los tejidos deficientes en retinoides adquieren un fenotipo pre-maligno, que se caracteriza por una mayor actividad mitótica y pérdida de diferenciación (30). El gen RAR- β se expresa en tejido epitelial normal, donde su expresión está regulada positivamente mediante tratamiento con ácido retinoico (31, 32). En muchas líneas celulares malignas obtenidas de diversos carcinomas, el nivel de ARNm de RAR- β 2 es reducido o indetectable (33-37), lo que indicaba que la pérdida específica de la expresión de ARNm de RAR- β 2 puede ser un suceso importante en la tumorigénesis.

La alteración de la actividad del receptor de ácido retinoico (RAR) caracteriza a la leucemia promielocítica aguda humana (APL) y se asocia con un bloqueo de la diferenciación granulocítica, lo que indicaba que los RAR son reguladores críticos de diferenciación mieloides normal. Además, ratones *knockout*, deficientes en receptores de ácido retinoico muestran un bloqueo *in vitro* de la diferenciación de granulocitos (38, 39).

Aunque las anteriores pruebas presentan claramente un importante papel para los RAR en la regulación de la mielopoyesis, varias preguntas críticas siguen sin tener respuesta. Si la actividad de RAR depende de la concentración de ligando, entonces ¿Cuál es el mecanismo mediante el cual la actividad de RAR regula la diferenciación mieloides de células que están expuestas a las uniformes concentraciones "fisiológicas" de retinoides que están presentes presumiblemente en la sangre y en la médula ósea? Lo que es más importante desde el punto de vista clínico, ¿por qué solamente las células de leucemia pro-mielocítica aguda (APL) muestran una dramática respuesta a retinoides mientras que el 90% restante de leucemias mielógenas agudas no, incluso aunque estas otras leucemias mielógenas agudas expresen RAR normales (40)?

El efecto biológico de los retinoides y receptores de retinoides sobre células madre hematopoyéticas normales, no leucémicas, fue descrito por Purton et al. (41).

Purton et al. (41) demostraron que los niveles farmacológicos (1 μmol) de ácido transretinoico total (ATRA) aumentaron la generación de células formadoras de colonias (CFC) y unidades formadoras de colonias del bazo (CFU-S) en cultivos en suspensión líquida de precursoras hematopoyéticas murinas $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$. Purton et al. (41) investigaron adicionalmente los efectos de ATRA así como un antagonista de RAR, AGN 193109, sobre la generación de células transplantables, incluyendo pre-CFU-S, células madre de repoblación a corto plazo (STRC), y células madre de repoblación a largo plazo (LTRC). Purton et al. (41) demostraron que ATRA potenciaba el mantenimiento y la producción *ex vivo* de STRC y LTRC de repoblación competitiva de células $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$ cultivadas en suspensión líquida durante 14 días. Además, el ATRA impedía la diferenciación de estas células madre primitivas en pre-CFU-S más maduras durante los 14 días de cultivo. En marcado contraste, las células $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$ cultivadas con AGN 193109, un antagonista de RAR, durante 7 días no tenía virtualmente capacidad de repoblación a corto o largo plazo, pero mostraba un aumento de aproximadamente 6 veces en la población de pre-CFU-S. La conclusión de Purton et al. (41) a partir de estos estudios era que el agonista de RAR, concretamente ácido retinoico, potencia el mantenimiento y la auto-renovación de células madre de repoblación a corto y largo plazo. Por el contrario, el antagonista de RAR, AGN 193109 suprime la capacidad de reconstitución, de la forma más probable promoviendo la diferenciación de las células madre primitivas. Purton et al. (41) aducen que estos resultados implican un importante e inesperado papel de los retinoides en la regulación de la diferenciación de células madre hematopoyéticas (41).

Aunque los retinoides aceleran el crecimiento y la diferenciación de progenitoras de granulocitos en cultivos estimulados con citoquinas de células CD34^+ purificadas (42), a niveles de las células madre, los retinoides muestran un efecto opuesto.

Aunque en un tejido no hematopoyético, pero de acuerdo con Purton et al. (41), Kamei también demostró que los retinoides, especialmente el ácido transretinoico total, inhiben la diferenciación de células pre-adiposas (43).

Por lo tanto, en el sistema hematopoyético, los receptores de retinoides nucleares estaban fuertemente implicados en rutas que controlan y promueven la diferenciación cadena abajo de células comprometidas con linaje. Como se mostró con detalle para varios modelos de línea celular de leucemia, tales como HL-60, NH4 y 32D, que son células comprometidas con linaje que están bloqueadas en la fase de mieloblasto o promielocítica de la diferenciación, la inactivación de estos receptores por antagonistas específicos, antisentido o transducción con receptores truncados está asociada con la inhibición de la diferenciación granulocítica y monocítica inducida.

Al contrario que las células normales, en la leucemia existe una alteración entre rutas reguladoras que controlan la proliferación y la diferenciación celulares. Estas rutas están estrictamente acopladas en células normales. La única excepción en la que estos dos procesos, proliferación y compromiso con la diferenciación no están acoplados, es la ruta de proliferación por auto-renovación de las células madre. Por lo tanto, ninguno de los estudios anteriores enseña el papel de los receptores de retinoides a nivel de las células madre conjuntamente (19, 22, 64).

Al llevar la presente invención a la práctica se demostró que los antagonistas del ácido retinoico, cuando se añaden a cultivos hematopoyéticos o de hepatocitos *ex vivo* durante solamente un periodo de tiempo corto y limitado, permiten una expansión a largo plazo prolongada de células madre auto-renovables.

Los antagonistas no tenían ningún efecto positivo o negativo significativo sobre la expansión de células global y de células CD34^+ durante los cultivos a corto plazo. Además, el antígeno CD34^+ se expresa en células madre comprometidas así como en multipotentes. Solamente una pequeña fracción de toda la población CD34^+ , las células $\text{CD34}^+/\text{CD38}^-$ y $\text{CD34}^+/\text{Lin}^-$, pertenece al compartimento de la célula madre y la progenitora temprana.

El análisis del contenido de estas dos raras subpoblaciones en cultivos *ex vivo* de dos semanas reveló que los cultivos suplementados con un antagonista de RAR contenían porcentajes más altos de células $\text{CD34}^+/\text{CD38}^-$ y células $\text{CD34}^+/\text{Lin}^-$ en comparación con cultivos tratados solamente con las citoquinas de acción temprana Trombopoyetina (TPO), interleuquina-6 (IL-6), y ligando FLT-3 y factor de células madre (SCF). El antagonista suprimía completamente la expresión del antígeno CD38. También existía la inhibición de una serie de otros antígenos específicos de linaje (Lin). El efecto del antagonista es específico y está dirigido aparentemente a genes reguladores clave situados en el punto de control de la auto-renovación y el compromiso con la decisión de diferenciación. Estas conclusiones se obtienen de los resultados descritos en este documento en la sección de Ejemplos, que muestran que el antagonista de RAR regula negativamente solamente la expresión de antígenos asociados a la diferenciación, pero no de antígenos asociados con el fenotipo de células madre tales como el antígeno CD34. Los porcentajes y números absolutos de células CD34^+ no estaban afectados por el antagonista durante el cultivo a corto plazo.

Un apoyo adicional para efectos específicos del antagonista sobre sucesos reguladores de auto-renovación y compromiso con la diferenciación procede de experimentos realizados en este documento con cultivos de hepatocitos primarios y sometidos a pases. Los cultivos primarios incubados con los antagonistas revelaron un

aumento de la proporción de células que producen α -fetoproteína, y del número de células ovaladas histológicamente distintas, sucesos asociados con la proliferación de poblaciones de hepatocitos tempranos. Estas poblaciones de hepatocitos tempranos persistieron durante al menos 3 semanas en cultivo, incluso en ausencia de citoquinas suplementarias, un descubrimiento del todo sin precedentes. Además, la suplementación de los cultivos con factores de crecimiento no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de poblaciones de hepatocitos tempranos, sin embargo, el tratamiento con el antagonista de RAR permitió la expansión de esta población incluso después del primer pase, y demostró poblaciones de hepatocitos significativamente aumentadas después del segundo pase, lo que indicaba además un papel de los antagonistas en la capacidad de auto-renovación celular.

Además de su efecto sobre cultivos a corto plazo, al llevar la presente invención a la práctica, se demostró que el tratamiento a corto plazo con la molécula antagonista también permitió la expansión *ex vivo* a largo plazo y la auto-renovación de células madre, por ejemplo células CD34⁺/Lin⁻ y CD34⁺38⁻. Curiosamente, la exposición limitada al antagonista era suficiente para producir una significativa e impresionante prolongación de los cultivos a largo plazo y a largo plazo prolongados, como se demuestra mediante análisis FACS de células madre y la LTC-CFUc funcional. Durante los cultivos a largo plazo y a largo plazo prolongado, el contenido de CFUc y CFU-mezcla aumentó de forma impresionante en comparación con el contenido de CFU en cultivos tratados solamente con las citoquinas, que realmente disminuye durante los cultivos a largo plazo. De hecho, muchos de los cultivos de control fueron incapaces de mantener cualquier potencial de CFU en el cultivo a largo plazo y a largo plazo prolongado. Al contrario que los cultivos tratados durante 3 semanas con el antagonista, que mostraban un dramático y continuo aumento de CFU-mezcla durante el periodo de cultivo a largo plazo prolongado, los cultivos tratados con citoquina solamente no permitieron la expansión o incluso el mantenimiento de colonias de mezcla durante todo el periodo de cultivo. La expansión de células madre, como se reveló a partir de la caracterización del fenotipo, está completamente de acuerdo con el potencial de auto-renovación a largo plazo, según lo medido mediante el ensayo LTC-CFUc funcional. Ambos ensayos demuestran la expansión superior y prolongada de células madre auto-renovantes en cultivos pulsados con la molécula antagonista.

Se ha demostrado que los antagonistas de RAR inhibían la diferenciación granulocítica inducida por RA de células HL-60 promielocíticas comprometidas (25). También se demostró que la transfección génica de un RAR truncado inhibía la respuesta de la línea celular de leucemia mieloide obtenida de ratón, 32D, a G-CSF (22). Estos estudios, sin embargo, se realizaron con líneas celulares leucémicas comprometidas con linaje y muestran específicamente solamente la inhibición de la diferenciación granulocítica inducida por RA o G-CSF. Por lo tanto, no puede realizarse regulación a nivel de las células madre a partir de los anteriores estudios.

El estudio presentado en este documento es el primero en demostrar que una molécula antagonista de RAR puede regular procesos de diferenciación *ex vivo* de células madre normales.

En oposición a Purton et al. (41), cuyas enseñanzas se han descrito anteriormente, se ha demostrado en este documento, usando moléculas antagonistas de receptores de retinoides y cultivos de células madre humanas, que los receptores de retinoides están implicados en la regulación de la auto-renovación de células madre. Se ha demostrado además en este documento que la adición de estas moléculas durante solamente un periodo limitado a corto plazo a los medios de cultivos *ex vivo* permite la proliferación continua de células madre sin alteración de su fenotipo durante periodos de tiempo prolongados. Además, estos efectos de antagonistas del receptor de ácido retinoico no implicaban ninguna transformación celular y no dan como resultado ninguna formación de línea celular.

Al contrario que líneas celulares obtenidas ocasionalmente mediante transducción con un RAR truncado negativo dominante (22-23), en este documento se muestra que, si el antagonista se suplementó durante solamente las primeras dos a tres semanas o de forma continua durante todo el periodo de cultivo, todas las células cultivadas experimentaron diferenciación mieloide, eritroide y linfocida normal y perdieron completamente cualquier capacidad de proliferación celular 16-18 semanas después del inicio de los cultivos.

En oposición a las modificaciones genéticas obtenidas mediante procedimientos de transducción que inducen alteraciones infinitivas en la expresión génica y las funciones celulares (a menos que el gen transducido esté desactivado), el tratamiento continuo con el antagonista de RAR no dio como resultado una expansión o mantenimiento infinitivos del fenotipo CD34⁺/Lin⁻. Por lo tanto, el mecanismo de actividad de un receptor negativo dominante es muy diferente del mecanismo de moléculas antagonistas de RAR. Datos de apoyo adicionales de un modo de acción diferente proceden de experimentos que demuestran que las células transducidas con un RAR negativo dominante siguen siendo inmaduras en presencia de un inductor de diferenciación (22), lo que definitivamente no es el caso con células no leucémicas normales, tratadas con un antagonista de RAR.

Comenzando con células de médula ósea (BM) obtenida de ratón normal y después de la transducción con un receptor de RAR truncado, Collins (23) obtuvo ocasionalmente una línea de células madre de ratón. Sin embargo, usando las mismas células obtenidas de ratón y un antagonista de RAR, Purton et al. (41) demostraron que un antagonista de RAR aceleraba la diferenciación de las células madre, mientras que el ácido retinoico apoyaba la expansión *ex vivo* de células madre (41). Estos datos proporcionados por Purton et al. (41) y Collins (23) favorecen la existencia de dos mecanismos no relacionados diferentes, como se describe en este documento.

Además del efecto de los receptores de retinoides sobre el tejido hematopoyético, se demostró que los receptores que pertenecen a la familia del receptor de retinoide están implicados en diferentes rutas que controlan la embriogénesis normal así como el desarrollo de tejidos adultos.

5 Múltiples anomalías fetales se producen en animales deficientes en vitamina A, así como en ratones “*knockout*” para el gen del receptor de ácido retinoico, lo que indica que el ácido retinoico (un metabolito activo de la vitamina A) realiza algunas funciones esenciales en el desarrollo normal. Se sabe también desde hace tiempo que los retinoides incluyen en la morfología de la piel. Cuando se administran antagonistas de RAR tarde en la gestación, 14 días después de la concepción (dpc), éstos retrasan la diferenciación y maduración de la piel fetal y los folículos pilosos en ratón (65).

15 La ablación de RXR-alfa da como resultado la hiperplasia epidérmica interfolicular con hiperproliferación de queratinocitos y diferenciación terminal aberrante, acompañada por una reacción inflamatoria de la piel. Se demostró además que heterodímeros de RXR-alfa/VDR desempeñan un papel principal en el control del ciclo del pelo, y se sugirió que rutas de señalización adicionales mediadas por RXR-alfa heterodimerizado con otros receptores nucleares están implicadas en el crecimiento de folículo piloso postnatal (66).

20 Tomando conjuntamente los datos anteriores, se concluye que a nivel de las células madre, señales positivas y negativas mediante receptores que pertenecen a la familia del receptor de retinoides, controlan el equilibrio fisiológico entre la auto-renovación y el compromiso con la diferenciación de células madre hematopoyéticas y no hematopoyéticas normales.

25 El nuevo método de regulación negativa *ex vivo* de la diferenciación celular, permitió una gran expansión de células madre hematopoyéticas y no hematopoyéticas embrionarias y adultas, y puede utilizarse para el trasplante de células hematopoyéticas, terapia génica, terapia de sustitución de células o cualquier otra aplicación, que requiera cantidades en aumento de células madre.

30 La utilización de una pequeña molécula para obtener una gran expansión de células madre es un método factible, económico y seguro.

35 Por lo tanto, durante el presente estudio se descubrió que una serie de agentes químicos que se unen a los receptores de ácido retinoico, retinoide X y/o Vitamina D interfieren en la apropiada señalización del receptor. Esta interferencia puede inhibir de forma reversible (retardar) el proceso de diferenciación *ex vivo* de células madre, estimulando y prolongando de este modo la expansión activa de células madre.

40 Este efecto recién descubierto de la aplicación de antagonista del receptor es utilizable para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos tipos de células incluyendo células hematopoyéticas, hepatocitos y células madre embrionarias. Dichas células expandidas *ex vivo* pueden aplicarse en varias situaciones clínicas. A continuación se enumeran varias.

45 **Trasplante de células hematopoyéticas:** el trasplante de células hematopoyéticas se ha convertido en el tratamiento preferido para una serie de enfermedades heredadas o malignas. Mientras que los procedimientos de trasplante temprano utilizaban toda la población de médula ósea (BM), recientemente se han usado poblaciones más definidas, enriquecidas en células madre (células CD34⁺) (44). Además de de la médula, dichas células podían obtenerse de otras fuentes tales como sangre periférica (PB) y sangre del cordón umbilical del neonato (CB) (45). El comparación con la BM, el trasplante con células de PB acorta el periodo de pancitopenia y reduce los riesgos de infección y hemorragia (46-48).

50 Una ventaja adicional del uso de PB para trasplantes es su accesibilidad. El factor limitante para trasplantes de PB es el bajo número de células madre/progenitoras pluripotentes circulantes.

55 Para obtener suficientes células madre obtenidas de PB para el trasplante, estas células se “recogen” mediante leucoforesis repetida después de su movilización desde la médula a la circulación mediante tratamiento con quimioterapia y citoquinas (46-47). Dicho tratamiento, obviamente, no es adecuado para donantes normales.

El uso de células madre expandidas *ex vivo* para el trasplante tiene las siguientes ventajas (49-50):

60 Reduce el volumen de sangre necesario para la reconstitución de un sistema hematopoyético adulto y puede obviar la necesidad de inmovilización y leucoforesis (46).

Permite el almacenamiento de pequeñas cantidades de células madre de PB o CB para un potencial uso futuro.

65 En el caso de trasplante autólogo de receptores con tumores, la contaminación de células tumorales en infusión autóloga a menudo contribuye a la recurrencia de la enfermedad (46). La selección y expansión de células madre CD34⁺ reducirá la carga de células tumorales en el trasplante final.

Los cultivos proporcionan un agotamiento significativo de linfocitos T, que puede ser útil en el entorno de trasplante

allogénico para reducir la enfermedad de injerto contra huésped.

Estudios clínicos indican que el trasplante de células expandidas *ex vivo* obtenidas de una pequeña cantidad de células CD34⁺ de PB puede restaurar la hematopoyesis en receptores tratados con altas dosis de quimioterapia, aunque los resultados aún no permiten sacar conclusiones sobre las capacidades hematopoyéticas *in vivo* a largo plazo de estas células cultivadas (46-47).

Para un trasplante con éxito, el acortamiento de la duración de la fase citopénica, así como injerto prendido a largo plazo, es crucial. La inclusión de células progenitoras intermedias y tardías en el trasplante podría acelerar la producción de células maduras obtenidas de un donante, acortando de este modo la fase citopénica. Es importante, por lo tanto, que las células expandidas *ex vivo* incluyan, además de células madre, células progenitoras más diferenciadas para optimizar la recuperación a corto plazo y la restauración a largo plazo de la hematopoyesis. La expansión de células progenitoras intermedias y tardías, especialmente aquellas comprometidas a los linajes neutrófilos y megacariocíticos, concomitante con la expansión de células madre, debe servir para este propósito (51).

Dichos cultivos pueden ser útiles para restaurar la hematopoyesis en receptores con la médula ósea completamente extirpada, así como para proporcionar una medida de apoyo para acortar la recuperación de la médula ósea del receptor después de radio- o quimioterapias convencionales.

Terapia génica: Para una terapia génica a largo plazo con éxito, una alta frecuencia de células madre modificadas genéticamente con transgenes integrados de forma estable dentro de su genoma, es un requisito obligatorio. En el tejido de BM, aunque la mayoría de las células son progenitoras y precursoras en ciclo, las células madre constituyen solamente una pequeña fracción de la población celular y la mayoría de ellas están un estado quiescente, no en ciclo. Los vectores basados en virus (por ejemplo, retrovirales) requieren una división celular activa para la integración del transgen en el genoma del huésped. Por lo tanto, la transferencia génica a células madre de BM fresca es altamente ineficaz. La capacidad para expandir una población purificada de células madre y para regular su división celular *ex vivo* posibilitaría una mayor probabilidad para su modificación genética (52).

Inmunoterapia adoptiva: se han estudiado subpoblaciones linfoides definidas expandidas *ex vivo* y se han usado para inmunoterapia adoptiva de diversos tumores, inmunodeficiencias, enfermedades víricas y genéticas (53-55).

El tratamiento mejora la respuesta inmune requerida o sustituye funciones deficientes. Este enfoque fue usado clínicamente por primera vez por Rosenberg et al. (56) usando gran número de células T asesinas no específicas expandidas *ex vivo* autólogas, y posteriormente linfocitos de infiltración en tumores específicos expandidos *ex vivo*.

Células que presentan el antígeno, funcionalmente activas también podían cultivarse a partir de de una población de partida de células CD34⁺ de PB en cultivos apoyados con citoquina. Estas células pueden presentar antígenos proteicos solubles para células T autólogas *in vitro* y, por lo tanto, ofrecer nuevas posibilidades para la inmunoterapia de enfermedad residual mínima después de quimioterapia a dosis alta. La expansión *ex vivo* de células dendríticas que presentan el antígeno también se ha estudiado, y es una prometedora aplicación adicional de la tecnología propuesta actualmente (57-59).

Ejemplos adicionales de aplicaciones *ex vivo* e *in vivo*:

Las aplicaciones adicionales de la expansión de células madre y progenitoras incluyen regeneración cutánea, regeneración hepática, regeneración muscular y estimulación del crecimiento óseo para aplicaciones en osteoporosis.

Movilización de células madre de médula ósea en la sangre periférica (periferización): Los efectos de antagonistas del receptor de ácido retinoico, retinoide y/o Vitamina D tienen aplicaciones *in vivo* adicionales. Como se ha mencionado anteriormente, las células madre obtenidas de la PB para el trasplante se "recogen" mediante leucoforesis repetida después de su movilización desde la médula a la circulación mediante tratamiento con quimioterapia y citoquinas (46-47).

El uso de quimioterapia no es, por supuesto, adecuado para donantes normales. La administración de antagonistas, al donante podría aumentar la mezcla de células madre de médula, que se moviliza a continuación a la periferia mediante G-CSF endógeno o inyectado.

Estimulación de la producción de hemoglobina fetal: Se ha demostrado que la hemoglobina fetal aumentada mejora síntomas clínicos en receptores que padecen β-hemoglobinopatías, tales como anemia de células falciformes y β-talasemia (61).

La hemoglobina fetal, que normalmente comprende el 1% de la hemoglobina total, se vuelve elevada en la eritropoyesis acelerada (por ejemplo, después de la hemólisis aguda o hemorragia o administración de eritropoyetina) (62).

Se ha sugerido que este fenómeno está asociado con la aceleración del proceso de maduración/diferenciación de precursores de eritroides (63). La administración de antagonistas del receptor de ácido retinoico, retinoide y/o Vitamina D a receptores con β -hemoglobinopatías podría aumentar en primer lugar y sincronizar su mezcla de progenitoras de eritroides tempranas, bloqueando la diferenciación de progenitoras.

5 Después del cese de la administración del fármaco y su retirada del cuerpo, esta población temprana podría a continuación sufrir maduración acelerada, que puede dar como resultado una producción elevada de hemoglobina fetal.

10 La siguiente descripción proporciona más detalles relacionados con aspectos y realizaciones específicas de la presente invención, estando la invención definida en las reivindicaciones.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un método para expandir *ex vivo* una población de células madre hematopoyéticas, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de dichas células madre *ex vivo*. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se realiza proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

20 Como se usa en este documento, la frase "células madre" se refiere a células pluripotentes que, dadas las condiciones de crecimiento correctas, pueden desarrollarse a cualquier linaje celular presente en el organismo a partir del que se obtuvieron. La frase, como se usa en este documento, se refiere tanto a la población de células renovables más tempranas responsables de generar la masa celular en un tejido o cuerpo como a las mismas células progenitoras tempranas, que están algo más diferenciadas, aunque aún no comprometidas y pueden revertir fácilmente para convertirse en una parte de la población de células renovables más tempranas. Los métodos para cultivar *ex vivo* células madre de diferentes orígenes tisulares se conocen bien en la técnica del cultivo celular. A tal efecto, véase por ejemplo, el libro de texto "Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición, cuyas enseñanzas se incorporan por la presente como referencia.

30 Como se usa en este documento, el término "inhibir" se refiere a ralentizar, reducir, retardar, impedir o suprimir.

35 Como se usa en este documento el término "diferenciación" se refiere a cambios relativamente generalizados o especializados durante el desarrollo. La diferenciación celular de diversos linajes es un proceso bien documentado y no requiere descripción adicional en este documento. Como se usa en este documento, el término diferenciación es distinto de maduración que es un proceso, aunque algunas veces asociado a división celular, en el que un tipo celular específico madura para funcionar y a continuación muere, por ejemplo, mediante muerte celular programada.

40 La frase "expansión celular" se usa en este documento para describir un proceso de proliferación celular sustancialmente desprovisto de diferenciación celular. Las células que sufren expansión mantienen, por lo tanto, sus propiedades de renovación celular y se denominan a menudo en este documento como células renovables, por ejemplo, células madre renovables.

45 Como se usa en este documento, el término "*ex vivo*" se refiere a un proceso en el que las células se retiran de un organismo vivo y se propagan fuera del organismo (por ejemplo, un tubo de ensayo). Como se usa en este documento, el término "*ex vivo*", sin embargo, no se refiere a un proceso mediante el cual se cultivan células que se sabe que se propagan solamente *in vitro*, tales como diversas líneas celulares (por ejemplo, HL-60, MEL, HeLa, etc.). En otras palabras, las células expandidas *ex vivo* de acuerdo con la presente invención no se transforman en líneas celulares en las que eventualmente sufren diferenciación.

50 Proporcionar a las células cultivadas *ex vivo* condiciones para la proliferación de células *ex vivo* incluye proporcionar a las células nutrientes y preferiblemente una o más citoquinas, como se detalla adicionalmente a continuación en este documento.

55 Como se ha mencionado anteriormente en este documento, concomitante con el tratamiento de las células con condiciones que permiten que las células madre proliferen *ex vivo*, las células se tratan a corto plazo o se tratan a largo plazo para reducir la expresión y/o actividad de CD38.

60 La reducción de la actividad de CD38 se realiza proporcionando a las células un agente que inhibe la actividad de CD38 (es decir, un inhibidor de CD38).

Como se usa en este documento un "inhibidor de CD38" se refiere a un agente que es capaz de regular negativamente o suprimir la actividad de CD38 en células madre.

65 Un inhibidor de CD38 de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede ser un "inhibidor directo" que inhibe la actividad intrínseca de CD38 o un "inhibidor indirecto" que inhibe la actividad o expresión de los componentes de señalización de CD38 (por ejemplo, las rutas de señalización de cADPR y rianodina) u otras rutas

de señalización que se realizan mediante actividad de CD38.

De acuerdo con realizaciones conocidas actualmente de este aspecto de la presente invención, la nicotinamida es un inhibidor de CD38 preferido.

5 Por lo tanto, en una realización, el método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se realiza proporcionando a las células la propia nicotinamida, o un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

10 Como se usa en este documento, la fase "análogo de nicotinamida" se refiere a una molécula que se sabe que actúa de forma similar a la nicotinamida, concretamente benzamida, nicotintioamida (el análogo de tior de nicotinamida), ácido nicotínico y ácido α -amino-3-indol-propionico.

15 La frase "un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida" se refiere a cualquier derivado estructural de la propia nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, concretamente benzamidas sustituidas, nicotinamidas y nicotintioamidas sustituidas y nicotinamidas y nicotintioamidas N-sustituidas. Además dichos derivados, como se describen en este documento, incluye, sin limitación, benzamidas sustituidas, nicotinamidas y nicotintioamidas sustituidas.

20 La frase "un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida" se refiere a productos que se obtienen de nicotinamida o de análogos de la misma, concretamente NAD, NADH y NADPH.

25 Además, se describe un inhibidor de CD38 que puede ser un anticuerpo que neutraliza la actividad que se una, por ejemplo, al dominio catalítico de CD38, inhibiendo de este modo la actividad catalítica de CD38. Se observará, no obstante, que puesto que CD38 es una proteína intracelular, se toman medidas para usar inhibidores que puedan administrarse a través de la membrana plasmática. A este respecto se usa preferiblemente un anticuerpo fragmentado tal como un fragmento Fab (descrito a continuación en este documento).

30 El término "anticuerpo" como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, $F(ab')_2$, y Fv que son capaces de unirse a macrófagos. Estos fragmentos de anticuerpo funcionales se definen de la siguiente manera:

35 Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse mediante digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

40 Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de la reducción, para dar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando al anticuerpo completo con la enzima pepsina sin la posterior reducción; $F(ab')_2$ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos mediante dos puentes disulfuro;

45 Fv, definido como un fragmento manipulado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y

50 Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), una molécula manipulada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un polipéptido enlazador adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

55 Los métodos para preparar estos fragmentos se conocen en la técnica. (Véase por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, incorporado en este documento como referencia).

Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento.

60 Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tior, y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de puentes disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patentes

de Estados Unidos N° 4.036.945 y 4.331.647, y referencias contenidas en esos documentos, patentes que se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. Véase también Porter, R. R., *Biochem. J.*, 73: 119-126, 1959. También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en el documento Inbar et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69: 2659-62, 1972. Como alternativa, las cadenas variables pueden estar unidas por un puente disulfuro intermolecular o reticuladas mediante productos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Métodos para producir sFv se describen, por ejemplo, por Whitlow y Filpula, *Methods*, 2: 97-105, 1991; Bird et al., *Science* 242: 423-426, 1988; Pack et al., *Bio/Technology* 11: 1271-77, 1993; y Ladner et al., Patente de Estados Unidos N° 4.946.778, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry, *Methods*, 2: 106-10, 1991.

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de la misma (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen un anticuerpo de receptor de inmunoglobulina humana en el que restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos de marcos Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos de importación, que se toman típicamente de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedor con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR son sustituidos con restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991)). Análogamente, pueden hacerse humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que recuerda estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reorganización génica, montaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992);

Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

5 También se describe la realización del método proporcionando a las células madre cultivadas *ex vivo* un agente que regula negativamente la expresión de CD38.

10 Un agente que regula negativamente la expresión de CD38 se refiere a cualquier agente que afecta a la síntesis (decelera) o a la degradación (acelera) de CD38 al nivel del ARNm o al nivel de la proteína. Por ejemplo, una molécula de polinucleótido interferente pequeño que está diseñada para regular negativamente la expresión de CD38 puede usarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención.

15 Un ejemplo de una molécula de polinucleótido interferente pequeño que puede regular negativamente la expresión de CD38 es un ARN interferente pequeño o ARNip, tal como, por ejemplo, los oligonucleótidos morfolino antisentido descritos por Munshi et al. (Munshi CB, Graeff R, Lee HC, J Biol Chem, 20 de diciembre de 2002; 277 (51): 49453-8), que incluye oligonucleótidos bicatenarios que dirigen la degradación específica de secuencia de ARNm mediante el mecanismo descrito anteriormente de interferencia de ARN (ARNi) (Hutvagner y Zamore (2002) Curr. Opin. Genetics and Development 12: 225-232).

20 Como se usa en este documento, la frase "oligonucleótido bicatenario" se refiere a una estructura de oligonucleótido o miméticos de la misma, que está formada por una única cadena de ácido nucleico auto-complementaria o por al menos dos cadenas de ácido nucleico complementarias. El "oligonucleótido bicatenario" de la presente invención puede estar compuesto por ARN de cadena doble (ARNdc), un híbrido de ADN-ARN, ARN de cadena sencilla (ARNcs), ARN aislado (es decir, ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro), ARN sintético y ARN producido de forma recombinante.

25 Preferiblemente, el oligonucleótido bicatenario interferente pequeño específico de la presente invención es un oligorribonucleótido compuesto principalmente por ácidos ribonucleicos.

30 Instrucciones para la generación de oligonucleótidos bicatenarios capaces de mediar la interferencia de ARN se proporcionan en www.ambion.com.

35 Por lo tanto, la molécula del polinucleótido interferente pequeño de acuerdo con la presente invención puede ser una molécula de ARNi (molécula de ARN de interferencia).

Como alternativa, una molécula de polinucleótido interferente pequeño puede ser un oligonucleótido tal como una molécula antisentido específica de CD38 o una molécula de ribozima, que se describen adicionalmente a continuación en este documento.

40 Los oligonucleótidos diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención pueden generarse de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, tal como síntesis enzimática o síntesis en fase sólida. El equipo y los reactivos para realizar síntesis en fase sólida están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Applied Biosystems. Cualquier otro medio para dicha síntesis también puede emplearse; la propia síntesis de los oligonucleótidos está dentro de las capacidades de un especialista en la técnica.

45 Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta realización de la presente invención son los que tienen una longitud seleccionada entre un intervalo de 10 a aproximadamente 200 bases preferiblemente 15-150 bases, más preferiblemente 20-100 bases, de la forma más preferible 20-50 bases.

50 Los oligonucleótidos de la presente invención pueden comprender nucleósidos heterocíclicos constituidos por purinas y las bases pirimidínicas, unidas en un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

55 Los oligonucleótidos usados preferiblemente son aquellos modificados en la cunea principal, enlaces internucleosídicos o bases, como se describe ampliamente a continuación en este documento. Dichas modificaciones pueden facilitar a veces la captación de oligonucleótidos y la resistividad a las condiciones intracelulares.

60 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos preferidos útiles de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N^o, 687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

65 Las cadenas principales de oligonucleótidos modificadas preferidas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos,

fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil fosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquileo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotrioésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de éstos, y los que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósido están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También pueden usarse diversas sales, sales mezcladas y formas de ácido libre.

Como alternativa, cadenas principales de oligonucleótidos modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en su interior tienen cadenas principales que se forman mediante enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos mezclados de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formado en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales metilen formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilnimino y metilhidrazino; cadenas principales sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes componentes mezcladas de N, O, S y CH₂, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

Otros oligonucleótidos que pueden usarse son los modificados tanto en el azúcar como en el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para que se complementen con el polinucleótido diana apropiado. Un ejemplo para dicho mimético de oligonucleótido, incluye ácido nucleico peptídico (ANP). Un oligonucleótido ANP se refiere a un oligonucleótido en el que la cadena principal de un azúcar se sustituye por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las Patentes de Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de ANP incluyen, aunque no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos N° 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia. Otras modificaciones de la cadena principal, que pueden usarse en la presente invención se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.303.374.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases. Como se usa en este documento, bases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases modificadas incluyen, aunque no se limitan a, otras bases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Bases adicionales incluyen las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 3.687.808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, y las descritas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Dichas bases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad de la cadena doble de ácido nucleico en 0,6-1,2°C. [Sanghvi YS et al. (1993) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton 276-278] y son sustituciones de base actualmente preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilo azúcar.

Otra modificación de los oligonucleótidos implica enlazar químicamente a los oligonucleótidos uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen aunque no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto de palmitilo, o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.303.374.

No es necesario que todas las posiciones en una molécula de oligonucleótido dada, estén modificadas de forma uniforme, y de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente pueden incorporarse en un único compuesto o en un único nucleósido en un oligonucleótido.

Como se ha descrito anteriormente en este documento, los oligonucleótidos son preferiblemente moléculas antisentido, que son moléculas quiméricas. Las “moléculas quiméricas antisentido” son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, constituida cada una por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos típicamente contienen al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado para otorgar al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasa, mayor captación celular, y/o mayor afinidad de unión por el polinucleótido diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. Un ejemplo de éstas incluyen ARNasa H, que es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de una pareja ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, aumentando enormemente de este modo la eficacia de la inhibición oligonucleotídica de la expresión génica. Por consiguiente, a menudo pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con oligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en la técnica.

Las moléculas quiméricas antisentido pueden formarse como estructuras compuestas por dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, como se ha descrito anteriormente. Las Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, aunque no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos N° 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922, cada una de las cuales se incorpora completamente en este documento como referencia.

Los oligonucleótidos pueden comprender además una secuencia de ribozima. Las ribozimas se están usando cada vez más para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de ARNm. Varias secuencias de ribozima pueden fusionarse a los oligonucleótidos de la presente invención. Estas secuencias incluyen, aunque no se limitan a, ANGIOZYME que inhibe específicamente la formación del VEGF-R (receptor de factor de crecimiento vascular endotelial), un componente clave en la ruta de angiogénesis, y HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el ARN del virus de la Hepatitis C (HCV), (Rybozyme Pharmaceuticals, Página Web incorporada).

Como alternativa adicional, una molécula de polinucleótido interferente pequeño puede ser una ADNzima.

Las ADNzimas con moléculas de ácido nucleico catalíticas de cadena sencilla. Se ha propuesto un modelo general (el modelo “10-23”) para la ADNzima. Las ADNzimas “10-23” tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su ARN sustrato en las uniones purina:pirimidina (Santoro, S. W. & Joyce, G. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 199; para una revisión de ADNzimas véase Khachigian, LM Curr Opin Mol Ther 2002; 4: 119-21).

Los ejemplos de construcción y amplificación de ADNzimas sintéticas manipuladas que reconocen sitios de escisión diana de cadena sencilla y doble se han descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.326.174 de Joyce et al. Se observó recientemente que las ADNzimas de diseño similar dirigidas contra el receptor de uroquinasa humano inhiben la expresión del receptor de uroquinasa, e inhiben con éxito la metástasis celular de cáncer de colon *in vivo* (Itoh et al, 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.asgt.org). En otra aplicación, las ADNzimas complementarias a oncogenes bcr-ab1 tuvieron éxito en la inhibición de la expresión de oncogenes en células de leucemia, y rebajando las tasas de recidiva en trasplante de médula ósea autóloga en casos de CML y ALL.

Como alternativa, como se ha descrito anteriormente en este documento, inhibidores de la superfamilia del receptor de retinoide (por ejemplo, antagonistas, moléculas de ARNip, molécula antisentido, anticuerpos, etc.) que regulan negativamente o suprimen la actividad y/o expresión del receptor de retinoide pueden usarse para regular negativamente la expresión de CD38.

En resumen, como se ha descrito anteriormente en este documento, se ha descrito que los receptores de retinoide tales como RAR, RXR y VDR están implicados en la regulación de rutas de expresión génica asociadas con la proliferación y diferenciación celular y en particular en la regulación de la expresión de CD38 (24, 25). Por lo tanto, los agentes preferidos que regulan negativamente la expresión de CD38 de acuerdo con la presente invención incluyen antagonistas de RAR, antagonistas de RXR y antagonistas de VDR o, como alternativa, antagonistas para reducir la capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoide y/o Vitamina D.

Como se usa en este documento el término “antagonista” se refiere a un agente que contrarresta o suprime los efectos de un agonista o un ligando natural de un receptor. Características adicionales relacionadas con dichos antagonistas se detallan a continuación en este documento.

Cada uno de los agentes descritos anteriormente en este documento puede reducir la expresión o actividad de CD38 individualmente. Sin embargo, la presente invención también pretende abarcar el uso de cualquier sub-combinación de estos agentes.

Se observará que los agentes proteicos (por ejemplo, anticuerpos) de la presente invención pueden expresarse a partir de un polinucleótido que codifica los mismos y proporcionarse a células madre cultivadas *ex vivo* que emplean un vehículo/método de administración de genes apropiado y una construcción de ácido nucleico como se describe adicionalmente a continuación en este documento.

Los ejemplos de construcciones adecuadas incluyen, aunque no se limitan a pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, PzeoSV2 (+/-), pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto cada una de las cuales está disponible en el mercado de Invitrogen Co. (www.invitrogen.com). Los ejemplos de vector retroviral y sistemas de empaquetado son los comercializados por Clontech, San Diego, Calif., incluyendo vectores Retro-X pLNCX y pLXSN, que permiten la clonación en múltiples sitios de clonación y el transgen se transcribe a partir del promotor CMV. También se incluyen vectores obtenidos de Mo-MuLV tales como pBabe, donde el transgen se transcribirá a partir del promotor 5'LTR.

Como método para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*, se realiza modulando la expresión y/o actividad de CD38, a nivel de proteínas, usando antagonistas de RAR, RXR o VDR o un inhibidor de CD38 tal como nicotinamida y análogos de la misma, o a nivel de la expresión mediante técnicas de ingeniería genética, como se ha detallado anteriormente en este documento, se proporcionan además, varios métodos preferidos para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

En un particular, un método para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo* se realiza proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

La reducción de capacidad de las células de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, o a señalización del receptor de ácido retinoico, de retinoides X y/o de Vitamina D puede realizarse, por ejemplo, mediante la administración de inhibidores químicos, incluyendo antagonistas de receptores.

En otro particular, el método para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo* se realiza proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para proliferación celular *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

La reducción de la capacidad de las células de responder a sucesos de señalización del receptor de ácido retinoico, de retinoides X y/o de Vitamina D, incluye tratar a las células con antagonistas suministrados de forma continua o durante un corto periodo de pulsos, y se realiza mediante una disminución o supresión de rutas de señalización celular a través de de sus receptores cognados respectivos.

Las concentraciones finales de los antagonistas pueden estar, dependiendo de la aplicación específica, en los intervalos micromolar o milimolar. Por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 100 μM , preferiblemente entre aproximadamente 4 μM y aproximadamente 50 μM , más preferiblemente entre aproximadamente 5 μM y aproximadamente 40 μM .

De acuerdo con la invención, el método para expandir *ex vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo* se realiza proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular *ex vivo* y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo la población de células madre mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*.

Las concentraciones finales de la nicotinamida o los análogos, derivados o metabolitos de la misma están preferiblemente, dependiendo de la aplicación específica, en los intervalos milimolares. Por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 20 mM, preferiblemente entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 10 mM.

La expansión *ex vivo* de poblaciones de células madre, de acuerdo con las características descritas anteriormente en este documento, puede utilizarse para expandir una población de células madre renovables hematopoyéticas *ex vivo*.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para expandir *ex vivo* una población de células madre renovables hematopoyéticas *ex vivo*. En este documento se describe la obtención de una muestra de leucocitos totales del cordón umbilical de adulto o de neonato (también conocidas en la técnica

como fracción de células mononucleares) o de células de médulas ósea totales y proporcionando a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir la expresión y/o actividad de CD38, como se ha descrito anteriormente en este documento, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.

5 En una realización particular de este aspecto de la presente invención, el método puede realizarse obteniendo una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y proporcionando a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides
10 y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.

15 En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, el método descrito también puede realizarse obteniendo una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y proporcionando a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.

20 En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, el método se realiza obteniendo una muestra de leucocitos totales de cordón umbilical de adulto o de neonato o células de médula ósea totales y proporcionando a las células en la muestra condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación de células madre *ex vivo* y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de células madre renovables en la muestra.

25 La expansión de la población de células madre puede utilizarse adicionalmente, de acuerdo con la presente invención, en entornos *in vivo*, de modo que se describe un método para expandir *in vivo* una población de células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *in vivo*. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se realiza administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, el agente sirve para reducir una expresión y/o actividad de CD38, de acuerdo con las características descritas anteriormente en este documento.

30 En una realización particular de este aspecto de la presente invención, el método puede realizarse administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, que sirve para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, como se ha definido anteriormente en este documento.

35 En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, el método también puede realizarse administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, que sirve para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, como se ha definido anteriormente en este documento.

40 En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, el método también puede realizarse administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente seleccionado entre el grupo constituido por nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

45 Como se usa en todo este documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad del agente que se está administrando que reducirá la expansión de células madre aunque limitará la diferenciación de las mismas.

Los métodos descritos anteriormente en este documento para expandir *ex vivo* poblaciones de células madre pueden dar como resultado, *inter alia*, una población expandida de células madre.

55 Por lo tanto, de acuerdo además con un aspecto de la presente invención, se proporciona una población expandida *ex vivo* de células madre hematopoyéticas que comprende una pluralidad de células caracterizada por que 3-20% de las células son células CD34⁺ reseleccionables, de las cuales al menos 40% de las células son CD34⁺_{dim} es decir, están por debajo de la intensidad mediana en un análisis FACS, en el que, en las células CD34⁺ reseleccionables, una mayoría de células que son Lin⁻ también son células CD34⁺_{dim}. En una realización, las células madre hematopoyéticas se obtienen de una fuente seleccionada entre el grupo constituido por médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical de neonato. En otra realización, la población de células tiene un único trasfondo genético. En otra realización más, la población expandida *ex vivo* de células madre hematopoyéticas comprende al menos N células obtenidas de un único donante, en las que N es igual al número medio de células CD34⁺ obtenidas de una muestra de sangre del cordón umbilical de neonato, médula ósea o sangre periférica
60 multiplicado por 1.000. La expresión en la superficie celular de los marcadores CD34 y/o Lin puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis FACS o técnicas de tinción inmunohistológicas. Un potencial de auto-renovación de
65

las células madre puede determinarse *in vitro* mediante formación de colonias a largo plazo (LTC-CFUc), como se ejemplifica adicionalmente en la siguiente sección de Ejemplos, o mediante injerto prendido *in vivo* en el modelo en ratón SCID-Hu. El modelo en ratón SCID-Hu emplea ratones C.B-17 scid/scid (SCID) transplantados con timo fetal humano y tejido hepático o tejido de médula ósea fetal y proporciona un modelo apropiado para la evaluación de supuestas células madre hematopoyéticas humanas. Debido a la reconstitución de los ratones SCID con tejido fetal humano, el modelo proporciona la proliferación de células madre, en este caso células madre hematopoyéticas humanas a proliferar, y funciona en el microentorno hematopoyético de origen humano. Los ratones típicamente se irradian y a continuación se administran células madre a los injertos, y la reconstitución se mide mediante cualquier número de métodos, incluyendo FACS e inmunohistoquímica de órganos repoblados (Humeau L., et al Blood (1997) 90: 3496).

Adicionalmente, los métodos descritos anteriormente en este documento pueden utilizarse para producir preparaciones de células hematopoyéticas transplantables, de modo que de acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona una preparación de células hematopoyéticas transplantables, que comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente, que reduce la expresión y/o actividad de CD38, como se ha descrito anteriormente en este documento, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, las poblaciones de células de la invención pueden administrarse en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina estéril y soluciones tampón acuosas. El uso de dichos vehículos y diluyentes se conoce bien en la técnica.

En una realización particular de este aspecto de la presente invención, se describe una preparación de células hematopoyéticas transplantables que comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente, que reduce una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, la preparación de células hematopoyéticas transplantables que comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente, que reduce una capacidad de las células madre para responder a la señalización del receptor de ácido retinoico, receptor de retinoides X y/o receptor de la Vitamina D, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, la preparación de células hematopoyéticas transplantables comprende una población expandida de células madre hematopoyéticas propagadas *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de un agente seleccionado entre el grupo constituido por nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La capacidad de los agentes de la presente invención para inhibir la diferenciación de células madre puede usarse además en diversas aplicaciones técnicas:

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de conservación de células madre. El método se realiza manejando a las células madre en al menos una de las siguientes etapas: recogida, aislamiento y/o almacenamiento, en presencia de una cantidad eficaz de un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y/o un antagonista del receptor de la Vitamina D. De manera alternativa, el método se realiza manejando a las células madre en al menos una de las siguientes etapas: recogida, aislamiento y/o almacenamiento, en presencia de una cantidad eficaz de nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe una bolsa de recogida/cultivo de células. La bolsa de recogida/cultivo de células de la presente invención se suplementa con una cantidad eficaz de un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y/o un antagonista del receptor de la Vitamina D, que inhibe sustancialmente la diferenciación celular. Como alternativa, la bolsa de recogida/cultivo de células de la presente invención se suplementa con una cantidad eficaz de nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se describe un tampón de separación y/o lavado de células. El tampón de separación y/o lavado se suplementa con una cantidad eficaz de un antagonista del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X y/o un antagonista del receptor de la Vitamina D, que inhibe sustancialmente la diferenciación celular. Como alternativa, la bolsa de recogida/cultivo de células de la presente invención se suplementa con una cantidad eficaz de nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

Como se detalla adicionalmente a continuación, las células madre pueden servir para ejercer terapia génica celular.

Terapia génica, como se usa en este documento, se refiere a la transferencia de material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés en un huésped para tratar o prevenir una enfermedad o afección o fenotipo genético o adquirido. El material genético de interés codifica un producto (por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido, ARN funcional, antisentido) cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una hormona, receptor, enzima, polipéptido o péptido de valor terapéutico. Para una revisión véase, en general, el texto "Gene Therapy" (Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997).

Se han desarrollado dos enfoques básicos: (i) terapia génica *ex vivo* o celular; y (ii) terapia génica *in vivo*. En la terapia génica *ex vivo* las células se retiran de un paciente, y mientras se están cultivando se tratan *in vitro*. Generalmente, un gen de sustitución funcional se introduce en las células mediante un método/vehículo de administración de genes apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y a continuación las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al huésped/paciente. Estas células genéticamente re-implantadas han demostrado expresar el material genético transfectado *in situ*.

Por lo tanto, de acuerdo además con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para modificar genéticamente células madre con un exógeno. El método, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se realiza (a) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (b) modificando genéticamente las células madre con el exógeno. Está claro que el orden de la etapa (a) y (b) puede invertirse.

El método puede realizarse (a) obteniendo células madre para modificarlas genéticamente; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) modificando genéticamente las células madre con el exógeno.

El método también puede realizarse (a) obteniendo células madre para modificarlas genéticamente; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico y/o el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) modificando genéticamente las células madre con el exógeno. De acuerdo con la presente invención, el método se realiza (a) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (b) modificando genéticamente las células madre con el exógeno.

En una realización preferida, la modificación genética de las células se realiza mediante un vector, que comprende el exógeno o transgen, vector que es, por ejemplo, un vector viral o un vector de ácido nucleico. Se conocen muchos vectores virales adecuados para su uso en terapia génica celular, a continuación en este documento se proporcionan ejemplos. Análogamente, un intervalo de vectores de ácido nucleico puede usarse para transformar genéticamente las células expandidas de la invención, como se describe adicionalmente a continuación.

Por consiguiente, las células expandidas de la presente invención pueden modificarse para expresar un producto génico. Como se usa en este documento, la frase "producto génico" se refiere a proteínas, péptidos y molécula de ARN funcionales. Generalmente, el producto génico codificado por la molécula de ácido nucleico es el producto génico deseado a suministrar a un sujeto. Los ejemplos de dichos productos génicos incluyen proteínas, péptidos, glucoproteínas y lipoproteínas producidas normalmente por un órgano del sujeto receptor. Por ejemplo, productos génicos que pueden suministrarse a modo de sustitución génica a órganos defectuosos en el páncreas incluyen insulina, amilasa, proteasa, lipasa, tripsinógeno, quimotripsinógeno, carboxipeptidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, triacilglicerol lipasa, fosfolipasa A2, elastasa, y amilasa; los productos génicos producidos normalmente por el hígado incluyen factores de coagulación sanguínea tales como el Factor VIII y el Factor IX de coagulación sanguínea, UDP glucuronil transferasa, ornitina transcarbamilasa, y enzimas del citocromo p450, y adenosin desaminasa, para el procesamiento de adenosina del suero o la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad; los productos génicos producidos por el timo incluyen factor tímico del suero, factor tímico humoral, timopoyetina, y timosina α_1 ; los productos génicos producidos por células del tracto digestivo incluyen gastrina, secretina, colecistoquinina, somatostatina, serotonina y sustancia P.

Como alternativa, el producto génico codificado es uno, que induce la expresión del producto génico deseado por la célula (panel lateral, el material genético introducido codifica un factor de transcripción, que induce la transcripción

del producto génico a suministrar al sujeto).

En otra realización más, el gen recombinante puede proporcionar una proteína heteróloga, por ejemplo, no nativa a la célula en la que se expresa. Por ejemplo, diversos componentes del MHC humano pueden proporcionarse a células no humanas para apoyar el injerto prendido en un receptor humano. Como alternativa, el transgen es uno, que inhibe la expresión o acción de un producto génico del MHC de un donante expresado normalmente en el explante micro-orgánico.

Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula está en una forma adecuada para la expresión en la célula del producto génico codificado por el ácido nucleico. Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico incluye secuencias codificantes y reguladoras requeridas para la transcripción de un gen (o porción del mismo) y, cuando el producto génico es una proteína o péptido, traducción de la molécula de ácido nucleico incluye promotores, potenciadores y señales de poliadenilación, así como secuencias necesarias para el transporte de una proteína o péptido codificado, por ejemplo secuencias señal N-terminales para el transporte de proteínas o péptidos a la superficie de la célula o secreción.

Las secuencias de nucleótidos que regulan la expresión de un producto génico (por ejemplo, secuencias promotoras y potenciadoras) se seleccionan en base al tipo de célula en la que el producto génico debe expresarse y el nivel deseado de expresión del producto génico. Por ejemplo, puede usarse un promotor que se sabe que otorga expresión específica del tipo de célula de un gen unido al promotor. Un promotor específico para la expresión génica de mioblastos puede unirse a un gen de interés para otorgar expresión específica de músculo de ese producto génico. Los elementos reguladores específicos de músculos, que se conocen en la técnica, incluyen regiones cadena arriba del gen de distrofina (Klamut et al., (1989) Mol. Cell Biol. 9: 2396), el gen de creatina quinasa (Buskin y Hauschka, (1989) Mol. Cell Biol. 9: 2627) y el gen de troponina (Mar y Ordahl, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 6404). Los elementos reguladores específicos de otros tipos celulares se conocen en la técnica (por ejemplo, el potenciador de albúmina para la expresión específica del hígado; elementos reguladores de insulina para la expresión específica de células de los islotes pancreáticos; diversos elementos reguladores específicos de células neurales, incluyendo distrofina neural, enolasa neural y promotores amiloides A4).

Como alternativa, puede usarse un elemento regulador, que puede dirigir la expresión constitutiva de un gen en una serie de diferentes tipos celulares, tales como un elemento regulador viral. Los ejemplos de promotores virales usados habitualmente para controlar la expresión génica incluyen los obtenidos del virus del polio, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40, y LTR retrovirales.

Como alternativa, puede usarse un elemento regulador, que proporciona expresión inducible de un gen unido a éste. El uso de un elemento regulador inducible (por ejemplo, un promotor inducible) permite la modulación de la producción del producto génico en la célula. Los ejemplos de sistemas reguladores inducibles potencialmente útiles para su uso en células eucariotas incluyen elementos regulados por hormonas (por ejemplo, véase Mader, S. y White, J. H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607), elementos regulados por ligando sintético (véase, por ejemplo, Spencer, D. M. et al 1993) Science 262: 1019-1024) y elementos regulados por radiación ionizante (por ejemplo, véase Manome, Y. Et al. (1993) Biochemistry 32: 10607-10613; Datta, R. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1014-10153). También pueden usarse, de acuerdo con la invención, sistemas reguladores específicos de tejido o inducibles adicionales, que pueden desarrollarse.

Existen varias técnicas conocidas en la técnica para introducir material genético en una célula que puede aplicarse para modificar una célula de la invención.

En una realización, el ácido nucleico está en forma de una molécula de ácido nucleico desnudo. En esta situación, la molécula de ácido nucleico introducida en una célula a modificar está constituida solamente por el ácido nucleico que codifica el producto génico y los elementos reguladores necesarios.

Como alternativa, el ácido nucleico que codifica el producto génico (incluyendo los elementos reguladores necesarios) está contenido dentro de un vector plasmídico. Los ejemplos de vectores de expresión plasmídicos incluyen CDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195).

En otra realización, la molécula de ácido nucleico a introducir en una célula está contenida en un vector viral. En esta situación, el ácido nucleico que codifica el producto génico se inserta en el genoma viral (o genoma viral parcial). Los elementos reguladores que dirigen la expresión del producto génico pueden incluirse con el ácido nucleico en lugar de en el genoma viral (es decir, unidos al gen insertado en el genoma viral) o pueden ser proporcionados por el propio genoma viral.

Los ácidos nucleicos desnudos pueden introducirse en las células usando transfección mediada por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas, inyección directa, y captación mediada por un receptor.

Al ácido nucleico desnudo, por ejemplo, ADN, puede introducirse en células formando un precipitado que contiene el

ácido nucleico y fosfato cálcico. Por ejemplo, una solución salina tamponada con HEPES puede mezclarse con una solución que contiene cloruro cálcico y ácido nucleico para formar un precipitado y el precipitado se incubaba a continuación con células. Puede añadirse una etapa de choque con glicerol o dimetil sulfóxido para aumentar la cantidad de ácido nucleico captado por algunas células. La transfección mediada por CaPO_4 puede usarse para transfectar de forma estable (o de forma transitoria) a células y solamente es aplicable a la modificación *in vitro* de células. Los protocolos para la transfección mediada por CaPO_4 pueden encontrarse en el documento Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sección 9.1 y en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Secciones 16.32-16.40 u otros manuales de laboratorio convencionales.

El ácido nucleico desnudo puede introducirse en las células formando una mezcla del ácido nucleico y DEAE-dextrano e incubando la mezcla con las células. Puede añadirse una etapa de choque con dimetilsulfóxido o cloroquina para aumentar la cantidad de captación de ácido nucleico. La transfección con DEAE-dextrano solamente es aplicable a la modificación *in vitro* de células y puede usarse para introducir ADN de forma transitoria en las células pero no se prefiere para crear células transfectadas de forma estable. Por lo tanto, este método puede usarse para la producción a corto plazo de un producto génico pero no es un método de elección para la producción a largo plazo de un producto génico. Los protocolos para la transfección mediada por DEAE-dextrano pueden encontrarse en el documento Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates (1989), Sección 9.2 y en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Secciones 16.41-16.46 u otros manuales de laboratorio convencionales .

El ácido nucleico desnudo también puede introducirse en las células incubando las células y el ácido nucleico juntos en un tampón apropiado y sometiendo a las células a un pulso eléctrico de alta tensión. La eficacia con la que el ácido nucleico se introduce en las células mediante electroporación está influida por la fuerza del campo aplicado, la longitud del pulso eléctrico, la temperatura, la conformación y concentración del ADN y la composición iónica de los medios. Puede usarse electroporación para transfectar de forma estable (o de forma transitoria) una gran variedad de tipos celulares y solamente es aplicable a la modificación *in vitro* de células. Protocolos para electroporar células pueden encontrarse en el documento Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sección 9.3 y en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Secciones 16.54-16.55 u otros manuales de laboratorio convencionales.

Otro método mediante el cual el ácido nucleico desnudo puede introducirse en las células incluye transfección mediada por liposomas (lipofección). El ácido nucleico se mezcla con una suspensión de liposomas que contiene lípidos catiónicos. El complejo de ADN/liposoma se incuba a continuación con células. La transfección mediada por liposomas puede usarse para transfectar de forma estable (o de forma transitoria) células en cultivo *in vitro*. Pueden encontrarse protocolos en el documento Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sección 9.4 y otros manuales de laboratorio convencionales. Adicionalmente, la administración de genes *in vivo* se ha realizado usando liposomas. Véase, por ejemplo, Nicolau et al. (1987) Meth. Enz. 149: 157-176; Wang y Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851-7855; Brigham et al. (1989) Am. J. Med. Sci. 298: 278; y Gould-Fogerite et al. (1989) Gene 84: 429-438.

El ácido nucleico desnudo también puede introducirse en las células inyectando directamente el ácido nucleico en las células. Para un cultivo *in vitro* de células, el ADN puede introducirse mediante microinyección. Puesto que cada célula se microinyecta de forma individual, este enfoque exige un trabajo muy intenso cuando se modifican grandes cantidades de células. Sin embargo, una situación en la que la microinyección es un método de elección es en la producción de animales transgénicos (descrito con más detalle a continuación). En esta situación, El ADN se introduce de forma estable en un oocito fertilizado, al que a continuación se le deja desarrollarse hasta un animal. El animal resultante contiene células que portan el ADN introducido en el oocito. La inyección directa también se ha usado para introducir ADN desnudo en células *in vivo* (véase, por ejemplo, Acsadi et al. (1991) Nature 332: 815-818; Wolf et al. (1990) Science 247: 1465-1468). Puede usarse un aparato para administración (por ejemplo, una "pistola génica") para inyectar ADN en células *in vivo*. Dicho aparato está disponible en el mercado (por ejemplo, de BioRad).

El ácido nucleico desnudo puede complejarse con un catión, tal como polilisina, que está acoplado a un ligando para un receptor de la superficie celular que será captado por endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu, G. y Wu, C. H. (1988) J. Biol. Chem. 263: 14621; Wilson et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 963-967; y Patente de Estados Unidos Nº 5.166.320). La unión del complejo ácido nucleico-ligando al receptor facilita la captación del ADN por endocitosis mediada por el receptor. Los receptores a los que se ha dirigido un complejo ADN-ligando incluyen el receptor de transferrina y el receptor de asialoglucoproteína receptor. Un complejo ADN-ligando unido a cápsidas de adenovirus que rompe de forma natural los endosomas, liberando de este modo material al citoplasma, puede usarse para evitar la degradación del complejo mediante lisosomas intracelulares (véase por ejemplo Curiel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8850; Cristiano et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2122-2126). La captación de ADN mediada por receptor puede usarse para introducir ADN en las células *in vitro* o *in vivo* y, adicionalmente, tiene la característica añadida de que el ADN puede dirigirse de forma selectiva a un tipo celular particular mediante el uso de un ligando que se une a un receptor expresado de forma selectiva en una célula diana de interés.

Generalmente, cuando se introduce ADN desnudo en células en cultivo (por ejemplo, mediante una de las técnicas de transfección descritas anteriormente) solamente una pequeña fracción de células (aproximadamente 1 de 10⁵) integran típicamente el ADN transfectado en sus genomas (es decir, el ADN se mantiene en la célula de forma episómica). Por lo tanto, para identificar células, que han captado ADN exógeno, es ventajoso transfectar ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable en la célula junto con el(los) ácido(s) nucleico(s) de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen los que otorgan resistencia a fármacos tales como G418, higromicina y metotrexato. Los marcadores seleccionables pueden introducirse en el mismo plásmido que el(los) gen(es) de interés o pueden introducirse en un plásmido diferente.

Un enfoque preferido para introducir ácido nucleico que codifica un producto génico en una célula es mediante el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc, que codifica el producto génico. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de células reciben el ácido nucleico, lo que puede obviar la necesidad de selección de células que hayan recibido el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, un ADNc contenido en el vector viral, se expresan de forma eficaz en células que hayan captado ácido nucleico del vector viral y pueden usarse sistemas de vector viral *in vitro* o *in vivo*.

Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia génica para fines de terapia génica (para una revisión véase Miller, A. D. (1990) *Blood* 76: 271). Puede construirse un retrovirus recombinante que tiene un ácido nucleico que codifica un producto génico de interés insertado en el genoma retroviral. Adicionalmente, pueden retirarse porciones del genoma retroviral para hacer al retrovirus defectuoso en replicación. El retrovirus defectuoso en replicación se empaqueta a continuación en viriones, que pueden usarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus ayudante mediante técnicas convencionales. Protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con dichos virus pueden encontrarse en el documento *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de líneas de virus de empaquetado adecuadas incluyen ψ Crip, ψ Crip, ψ 2 y ψ Am. Los retrovirus se han usado para introducir una serie de genes en muchos tipos celulares diferentes, incluyendo células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos, células de médula ósea, *in vitro* y/o *in vivo* (véase por ejemplo Eglitis, et al. (1985) *Science* 230: 1395-1398; Danosand Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3014-3018; Armentano et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8039-8043; Feri et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254: 1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3: 641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10892-10895; Hwu et al (1993) *J. Immunol.* 150: 4104-4115; Patente de Estados Unidos N° 4.868.116; Patente de Estados Unidos N° 4.980.286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573). Los vectores retrovirales requieren división de células diana para que el genoma retroviral (y el ácido nucleico extraño insertado en éste) se integre en el genoma del huésped para introducir de forma estable ácido nucleico en la célula. Por lo tanto, puede ser necesario estimular la replicación de la célula diana.

El genoma de un adenovirus puede manipularse de modo que codifique y exprese un producto génico de interés pero está inactivado en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase por ejemplo Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6: 616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252: 431-434; y Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68: 143-155. Los vectores adenovirales adecuados obtenidos de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son bien conocidos por los expertos en la materia. Los adenovirus recombinantes son ventajosos ya que no requieren células en división para ser vehículos de administración de genes eficaces y pueden usarse para infectar una gran variedad de tipos celulares, incluyendo el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld et al. (1992) mencionado anteriormente), células endoteliales (Lemarchand et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6482-6486), hepatocitos (Herz y Gerard (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2812-2816) y células musculares (Quantin et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2581-2584). Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en su interior) no se integra en el genoma de una célula huésped sino que sigue siendo episómico, evitando de este modo problemas potenciales que pueden producirse como resultado de mutagénesis insercional en situaciones en las que el ADN introducido se vuelve integrado en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para ADN extraño es amplia (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de administración de genes (Berkner et al. mencionado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham (1986) *J. Virol* 57: 267). La mayoría de los vectores adenovirales defectuosos en replicación actualmente en uso tienen deletados todos o partes de los genes E1 y E3 virales pero conservan hasta el 80% del material genético adenoviral.

Un virus adenoasociado (AAV) es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un herpes virus, como virus ayudante para una eficaz replicación y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión véase Muzyczka et al. *Curr. Topics In Micro. And Immunol.* (1992) 158: 97-129). Es también uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células no en división, y muestra una alta frecuencia de integración estable (véase por ejemplo Flotte et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7: 349-356 ; Samulski et al. (1989) *J.*

Virol. 63: 3822-3828; y McLaughlin et al (1989) J. Virol. 62: 1963-1973). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de AAV pueden empaquetarse y pueden integrarse. El espacio para ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV tal como el descrito en el documento Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 puede usarse para introducir ADN en las células. Una serie de ácidos nucleicos se han introducido en diferentes tipos celulares usando vectores de AAV (véase por ejemplo Hermonat et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6466-6470; Tratschin et al. (1985) Mol. Cell Biol. 4: 2072-2081; Wondisford et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2: 32-39; Tratschin et al. (1984) J. Virol. 51: 611-619; y Flotte et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 3781-3790).

La eficacia de un sistema de vector de expresión particular y método para introducir ácido nucleico en una célula puede evaluarse mediante enfoques convencionales usados de forma rutinaria en la técnica. Por ejemplo, el ADN introducido en una célula puede detectarse mediante un técnica de hibridación sobre filtro (por ejemplo, transferencia de Southern) y el ARN producido mediante transcripción del ADN introducido puede detectarse, por ejemplo, mediante transferencia de Northern, protección contra ARNasa o transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El producto génico puede detectarse mediante un ensayo apropiado, mediante detección inmunológica de una proteína producida, tal como con un anticuerpo específico, o mediante un ensayo funcional para detectar una actividad funcional del producto génico, tal como un ensayo enzimático. Si el producto génico de interés a expresar por una célula no es fácilmente ensayable, un sistema de expresión puede optimizarse en primer lugar usando un gen informador unido a los elementos reguladores y al vector a usar. El gen informador codifica un producto génico, que es fácilmente detectable y, por lo tanto, puede usarse para evaluar la eficacia del sistema. Los genes informadores convencionales usados en la técnica incluyen genes que codifican β -galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, luciferasa y hormona del crecimiento humana.

Cuando el método usado para introducir ácido nucleico en una población de células da como resultado la modificación de una gran proporción de las células y la expresión eficaz del producto génico por las células (por ejemplo, como es el caso a menudo cuando se usa un vector de expresión viral), la población modificada de células puede usarse sin aislamiento o subclonación adicional de células individuales dentro de la población. Es decir, puede haber la suficiente producción del producto génico por la población de células, de modo que no se necesita aislamiento de células adicional. Como alternativa, puede ser deseable cultivar una población homogénea de células modificadas de forma idéntica a partir de una única célula modificada para aislar células, que expresa eficazmente el producto génico. Dicha población de células uniformes puede prepararse aislando una única célula modificada limitando la clonación de dilución seguida por la expansión de la única célula en cultivo en una población clonal de células mediante técnicas convencionales.

Como se ha descrito en detalle anteriormente en este documento, la expansión *ex vivo* de células madre puede utilizarse ventajosamente en el trasplante o implante de células hematopoyéticas. Por lo tanto, se describe un método de trasplante o implante de células hematopoyéticas. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se realiza (a) obteniendo células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantando o implantando las células madre en un receptor.

El método puede realizarse (a) obteniendo células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantando o implantando las células madre en un receptor.

El método también puede realizarse (a) obteniendo células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico, el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantando o implantando las células madre en un receptor.

Como alternativa, el método puede realizarse (a) obteniendo células madre hematopoyéticas que serán trasplantadas desde un donante; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo la población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre *ex vivo*; y (c) trasplantando o implantando las células madre en un receptor. La invención proporciona usos médicos correspondientes.

El donante y el receptor pueden ser un único individuo o diferentes individuos, por ejemplo, individuos alogénicos.

Cuando se realiza el trasplante alogénico, deben realizarse regímenes para reducir el rechazo del implante y/o la enfermedad de injerto contra huésped, como se conocen bien en la técnica. Dichos regímenes se ponen en práctica actualmente en terapia humana. Los regímenes más avanzados se describen en publicaciones de Slavin S. et al., por ejemplo, *J Clin Immunol* (2002) 22: 64, y *J Hematother Stem Cell Res* (2002) 11: 265), Gur H. et al. (*Blood* (2002) 99: 4174), y Martelli MF et al. (*Semin Hematol* (2002) 39: 48), que se incorporan en este documento como referencia.

Se describe además un método de inmunoterapia adoptiva. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se realiza (a) obteniendo células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) transplantando las células madre al receptor.

El método se puede realizarse (a) obteniendo células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) transplantando las células madre al receptor.

El método también puede realizarse (a) obteniendo células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y, al mismo tiempo, para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico y/o el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) transplantando las células madre al receptor.

Como alternativa, el método se realiza (a) obteniendo células madre hematopoyéticas de un receptor; (b) proporcionando a las células madre condiciones de cultivo *ex vivo* para la proliferación celular y nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (c) transplantando las células madre al receptor. La invención proporciona usos médicos correspondientes.

El efecto de los agentes que reducen la expresión o actividad de CD38 usados en el contexto de la presente invención no se limita a entornos *ex vivo*. Por lo tanto, en base a los descubrimientos descritos en este documento, se prevén nuevas aplicaciones *in vivo* para estos agentes.

Además, en este documento se describe un método de movilización de células madre de médula ósea en la sangre periférica de un donante para recoger las células. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se realiza (a) administrando una cantidad eficaz de un agente al donante para reducir la expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recogiendo las células mediante leucoforesis.

El método puede realizarse (a) administrando una cantidad eficaz de un agente al donante para reducir una capacidad de las células madre de responder a ácido retinoico, retinoides y/ Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recogiendo las células mediante leucoforesis.

El método también puede realizarse (a) administrando una cantidad eficaz de un agente al donante para reducir una capacidad de las células madre de responder a rutas de señalización que implican el receptor de ácido retinoico y/o el receptor de retinoides X y/o el receptor de la Vitamina D, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recogiendo las células mediante leucoforesis.

El método también puede realizarse (a) administrando al donante una cantidad eficaz de un agente seleccionado entre el grupo constituido por nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, expandiendo de este modo una población de las células madre, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células madre; y (b) recogiendo las células mediante leucoforesis.

Los métodos de movilización de células madre pueden comprender además administrar al donante al menos una citoquina, preferiblemente al menos una citoquina temprana, que se usan actualmente para inducir la movilización celular en la sangre periférica.

Se describe además un método de deceleración de la maduración/diferenciación de células precursoras de eritroides para el tratamiento de pacientes β -hemoglobinopáticos. El método se realiza administrando al paciente un agente

para reducir la expresión y/o actividad de CD38, expandiendo de este modo una población de células precursoras de eritroides, mientras al mismo tiempo, se inhibe sustancialmente la diferenciación de las células precursoras de eritroides, de modo que después de la retirada del agente del cuerpo, las células experimentan una maduración acelerada, dando como resultado una elevada producción de hemoglobina fetal.

5 El agente usado de acuerdo con este método puede ser un agente para suprimir o reducir una capacidad de las células de responder a ácido retinoico, retinoides y/o Vitamina D, un agente para suprimir o reducir una capacidad de las células de responder a señalización del receptor de ácido retinoico, de retinoides X y/o Vitamina D o un agente tal como nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida.

10 En entornos *in vivo*, la administración de los agentes que reducen la expresión o actividad de CD38, por ejemplo, antagonistas del receptor de ácido retinoico, retinoide y/o Vitamina D, o nicotinamida, un análogo de nicotinamida, un derivado de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida y/o un metabolito de nicotinamida o de un análogo de nicotinamida, puede ser mediante una composición farmacéutica que incluye a los mismos, que puede incluir además espesantes, vehículos, tampones, diluyentes, agentes tensioactivos, conservantes, y similares, como se conoce bien en la técnica.

15 La composición farmacéutica puede administrarse de diversas maneras, dependiendo de la preferencia por tratamiento local o sistémico, y en el área a tratar. La administración puede realizarse por vía tópica (incluyendo por vía oftálmica, por vía vaginal, por vía rectal, por vía intranasal), por vía oral, mediante inhalación, o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso o inyección intraperitoneal, subcutánea, subdural, intramuscular o intravenosa, o mediante un dispositivo de administración implantable.

20 Las formulaciones para administración tópica pueden incluir, aunque no se limitan a, lociones, pomadas, geles, cremas, supositorios, gotas, líquidos, pulverizadores y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, pulverulentas u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarias o deseables.

25 Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, sobrecitos, cápsulas o comprimidos. Espesantes, diluyentes, aromatizantes, ayudantes de dispersión, emulsionantes o aglutinantes pueden ser deseables.

30 Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir, aunque no se limitan a, soluciones estériles, que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados.

35 Las formulaciones para dispositivos de administración implantables pueden incluir, análogamente, aunque no se limitan a, soluciones estériles, que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados.

40 La dosificación depende de la sensibilidad de la afección al tratamiento, pero normalmente será de una o más dosis al día, con un curso de tratamiento que dura de varios días a varios meses o hasta que se alcanza un efecto requerido. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Los regímenes de administración de liberación lenta pueden ser ventajosos en algunas aplicaciones.

45 De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, proporcionar a las células madre las condiciones para la proliferación celular *ex vivo* comprende proporcionar a las células nutrientes y citoquinas. Preferiblemente, las citoquinas son citoquinas de acción temprana, tales como, aunque sin limitarse a, factor de células madre, ligando FLT3, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-6, interleuquina-10, interleuquina-12, factor de necrosis tumoral- α y trombopoyetina. Se observará a este respecto que continuamente se descubren nuevas citoquinas, algunas de las cuales pueden usarse en los métodos de expansión de células de la presente invención.

50 También pueden usarse citoquinas de acción tardía. Éstas incluyen, por ejemplo, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, eritropoyetina, FGF, EGF, NGF, VEGF, LIF, factor de crecimiento de hepatocitos y factor estimulador de colonias de macrófagos.

55 Las células madre pueden ser células madre embrionarias o células madre adultas. Las células madre embrionarias y métodos para su recuperación se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Trounson AO (Reprod Fertil Dev (2001) 13: 523), Roach ML (Methods Mol Biol (2002) 185: 1), y Smith AG (Annu Rev Cell Dev Biol (2001) 17: 435). Las células madre adultas son células madre, que se obtienen de tejidos de adultos y también se conocen bien en la técnica. Los métodos para aislar o enriquecer en células madre adultas se describen en, por ejemplo, Miraglia, S. et al. (1997) Blood 90: 5013, Uchida, N. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14720, Simmons, P. J. et al. (1991) Blood 78: 55, Prockop DJ (Cytotherapy (2001) 3: 393), Bohmer RM (Fetal Diagn Ther (2002) 17: 83) y Rowley SD et al (Bone Marrow Transplant (1998) 21: 1253), Stem Cell Biology Daniel R. Marshak (Editor) Richard L. Gardner (Editor), Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) y Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Anthony D. Ho (Editor) Richard Champlin (Editor), Publisher: Marcel Dekker (2000).

Una fuente de células madre adultas es el sistema hematopoyético. De acuerdo con la presente invención las células madre son células madre hematopoyéticas. Dichas células madre pueden obtenerse de médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical de neonato. Los métodos para enriquecer leucocitos (células mononucleares) en células madre se conocen bien en la técnica, incluyendo, seleccionar células que expresan CD34⁺. Las células CD34⁺ incluyen células madre pluripotentes y células progenitoras muy tempranas, que, en las condiciones apropiadas pueden revertir a células madre, ya que no son células comprometidas.

Un resultado más sorprendente obtenido al llevar la presente invención a la práctica era que las células madre presentes en la fracción de células mononucleares de la sangre (es decir, leucocitos), puede sufrir expansión usando los métodos de la presente invención de manera similar a la fracción de células CD34⁺ enriquecidas en células madre de la sangre. Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención, las células madre que sufren expansión están mezcladas (por ejemplo, no separadas de, no enriquecidas) con células comprometidas. Esta realización de la presente invención es una ventaja particular puesto que libera de la tediosa necesidad de separación de células antes de cultivar *ex vivo* las células.

En otra realización, las células están enriquecidas en células CD34⁺ hematopoyéticas y se caracterizan por una ausencia, o una expresión significativamente reducida de antígenos de la superficie celular CD38 y antígenos específicos de linaje (Lin, incluyendo: CD3, CD61, CD19, CD33, CD14, CD15 y/o CD4).

Se descubrió experimentalmente que la reducción de la capacidad de las células madre de responder a las rutas de señalización descritas es reversible, por ejemplo, reversible de forma inherente. En algunos experimentos, después de 16-18 semanas en cultivo las células dejaron de expandirse y comenzaron a diferenciarse. En otras palabras, las células se expandieron usando los protocolos de la presente invención para no transformarlas en líneas celulares. Por lo tanto, exponiendo a dichas células después de la suficiente expansión a condiciones de cultivo mediante las cuales se induce la diferenciación, se podría ser capaz de dirigir la diferenciación *ex vivo* de las células en la dirección deseada, incluyendo diferenciación *cis*- y *trans*- *ex vivo* e *in vivo*.

Como se usa en este documento "diferenciación *cis*" se refiere a la diferenciación de células madre adultas en un tejido del que se obtuvieron. Por ejemplo, la diferenciación de células hematopoyéticas CD34⁺ en diferentes células comprometidas/sanguíneas maduras constituye diferenciación *cis*.

Como se usa en este documento "diferenciación *trans*" se refiere a la diferenciación de células madre adultas en un tejido del que no se obtuvieron. Por ejemplo, la diferenciación de células hematopoyéticas CD34⁺ en células de diferente origen tisular, por ejemplo, miocitos constituye diferenciación *trans*.

Las células madre usadas para la expansión celular en el contexto de la presente invención pueden obtenerse de cualquier tejido de cualquier organismo multicelular incluyendo tanto animales como plantas. Se demostró que las células madre existen en muchos órganos y tejidos y se cree que existen en todos los tejidos de animales, incluyendo, aunque sin limitarse a, médula ósea (Rowley SD et al (1998) Bone Marrow Transplant 21: 1253), sangre periférica (Koizumi K, (2000) Bone Marrow Transplant 26: 787, hígado (Petersen BE et al (1998) Hepatology 27: 433) y cerebro (Pagano SF et al (2000) Stem Cells 18: 295). Se anticipa que todas dichas células pueden expandirse usando los métodos de la presente invención.

La reducción de la capacidad de las células madre de responder a los antagonistas anteriores y/o las rutas de señalización de los receptores anteriores se realiza cultivando *ex vivo* las células madre en presencia de una cantidad eficaz de al menos un antagonista del receptor de ácido retinoico, al menos un antagonista del receptor de retinoides X y/o al menos un antagonista del receptor de la Vitamina D, preferiblemente, durante un periodo de tiempo de 0,1-50%, preferiblemente, 0,1-25%, más preferiblemente, 0,1-15%, de un periodo completo de cultivo *ex vivo* de las células madre o durante todo el periodo. A este respecto, se descubrió sorprendentemente que una exposición de pulso inicial a un antagonista es suficiente para ejercer expansión de células mucho después de que el antagonista se retirara del sistema de cultivo.

Muchos antagonistas de RAR, RXR y VDR se conocen actualmente, algunos de los cuales se enumeran a continuación.

El antagonista del receptor de ácido retinoico usado en el contexto de los diferentes aspectos puede ser:

AGN 194310; AGN 109; ácido 3-(4-Metoxi-fenilsulfanil)-3-metil-butírico;
6-Metoxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona, 2,2-Dimetil-4-oxo-tiocroman-6-iltrifluorometano-sulfonato; 4-((2,2 dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il)etil)benzoato de etilo; 4-((2,2-dimetil-4-trifluorometanosulfoniloxi-(2H)-tiocroman-6-il)etil)benzoato de etilo (41);
Tiocroman-6-il-etil]benzoato(il);
1'1'-dióxido del ácido (p-[(E)-2-[3'4'-Dihidro-4,4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotiopiran-6'il]propenil]benzoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-butoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-propoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-pentoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;

Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-hexoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
 Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-heptoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
 Ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-n-octoxifenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
 5 Ácido (2E,4E,6E)-7-[3-t-butil-5-(1-fenil-vinil)-fenil]-3-metil-octa-2,4,6-trienoico; ácido 2E,4E,6E-[7-(3,5-Di-t-butil-4-
 {[4,5-sup.3H.sub.2]-n-pentoxi}fenil)-3-metil]-octa-2,4,6-trienoico;
 Éster etílico del ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-tercbutil-2-etoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico;
 Ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-tercbutil-2-etoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico;
 Ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-tercbutil-2-butoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico;
 10 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-etoxifenil] 3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-butiloxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico; ácido 4-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-
 tetrametil-2-naftalen-carboxamido)benzoico;
 Ácido (2E,4E)-3-metil-5-[(1S,2S)-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-ciclopropil]-penta-2,4-dienoico;
 1',1'-dióxido del ácido p-[(E)-2-[3',4'-Dihidro-4',4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotiopiran-6'-il]propenil]benzoico;
 ácido 4-(7,7,10,10-Tetrametil-1-piridin-3-ilmetil-4,5,7,8,9,10-hexahidro-1H-nafto[2,3-g]indol-3-il)-benzoico;
 15 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-metoxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-etoxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-hexiloxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico;
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-[3,5-di-tercbutil-2-octiloxifenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico; y
 20 Ácido (2E,4E)-(1RS,2RS)-5-[2-(3,5-di-terc-butil-2-butoxi-fenil)-ciclopropil]-3-metil-penta-2,4-dienoico
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-(3-n-propoxi-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)-3-metil-octa-2,4,6-trienoico, y ácido
 4-(5H-2,3(2,5 dimetil-2,5-hexano)-5-n-propilidibenzo[b, e][1, 4]diazepin-1 1-il)benzoico, y
 Ácido 4-(5H-2,3(2,5 dimetil-2,5-hexano)-5metil-8-nitrodibenzo[b, e][1,4]diazepin-11-il)benzoico, y
 Ácido 4-[[4-(4-Etilfenil)2,2-dimetil-(2H)-tiocromen-6-il]etinil]benzoico, y
 25 Ácido 4-[4-2metil-1,2-dicarba-closo-dodecaboran-1-il-fenilcarbamoil]benzoico,
 y ácido 4-[4,5,7,8,9,10-hexahidro-7,7,10,10-tetrametil-1-(3-piridinilmetil)-antra[1,2-b]pirrol-3-il]benzoico, y
 ácido (3-piridilmetil)-[5-tiaantra[2,1-b]pirrol-3-il]benzoico, y
 ácido (3-piridilmetil)-antra[2ml-d]pirazol-3-il]benzoico.

El antagonista del receptor de retinoides X usado en el contexto de los diferentes aspectos puede ser:

30 LGN100572,
 1-(3-hidroxi-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)etanona,
 1-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)etanona,
 3-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)but-2-enonitrilo,
 35 3-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)but-2-enal,
 ácido (2E,4E,6E)-7-[3-propoxi-5,6,7,8-tetrahydro 5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-2-il]-3-metil-octa-2,4,6-trienoico,
 Ácido 4-[3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil]carbonil]benzoico,
 Ácido 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]benzoico,
 Ácido 4-[1(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)ciclopropil]benzoico,
 40 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]benzenotetrazol,
 Ácido 2-[1-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]piridin-5-carboxílico,
 Ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etil]piridin-5-carboxílico, etil-2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-
 5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]piridin-5-carboxilato,
 45 Ácido 5-[1-3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]piridin-2-carboxílico,
 Ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)ciclopropil]piridin-5-carboxílico,
 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)ciclopropil]piridin-5-carboxilato de metilo,
 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]-N-(4-hidroxifenil)benzamida,
 Ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-Pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)etenil]piridin-5-carboxílico,
 50 Ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-Pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)ciclopropil]piridin-5 carboxílico,
 Butiloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 Propiloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 Cianoimina del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 Aliloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)carbonil]benzoico,
 55 4-(ácido 3-metilbut-2-enoico) oxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)carbonil]benzoico, y
 1-aminoetiloxima del ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftil)carbonil]benzoico
 Ácido (2E,4E,6Z)-7-(3-n-propoxi-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)-3-metil-octa-2,4,6-trienoico,
 y ácido 4-(5H-2,3(2,5 dimetil-2,5-hexano)-5-n-propilidibenzo[b, e][1,4]diazepin-11-il)benzoico, y 4-(5H-2,3(2,5-dimetil-
 2,5-hexano)-5m.

60 El antagonista del receptor de la Vitamina D usado en el contexto de los diferentes aspectos y realizaciones de la
 presente invención puede ser: 1 alfa, 25- (OH)-D3-26, 23 lactona; 1 alfa, 25-dihidroxivitamina D (3); el éster 25-
 carboxílico ZK159222; (23S)-25-deshidro-1 alfa-OH-D (3); (23R)-25-deshidro-1 alfa-OH-D (3); 1 beta, 25 (OH) 2 D3;
 1 beta, 25 (OH) 2-3-epi-D3; (23S) 25-deshidro-1 alfa (OH) D3-26,23-lactona; (23R) 25-deshidro-1 alfa (OH) D3-26,
 23-lactona y Butil-(5Z,7E,2E)-(1S,7E,22E)-(1S,3R,24R)-1,3,24-trihidroxi-26,27-ciclo-9,10-secocolesta-5,7,10(19),22-
 65 tetraen-25-carboxilato).

Los antagonistas enumerados anteriormente se conocen por su alta afinidad por sus respectivos receptores cognados. Sin embargo, puede ser posible que estas moléculas sean activas para otros receptores.

Se describe, además, un ensayo para determinar si un antagonista específico del receptor de ácido retinoico, un antagonista del receptor de retinoides X o un antagonista del receptor de la Vitamina D es un agente de expansión celular eficaz. El ensayo de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende cultivar una población de células madre, por ejemplo, células hematopoyéticas CD34⁺, o células de una línea celular sustancialmente indiferenciada, tales como, aunque sin limitarse a, USP-1 y USP-3 (Sukoyan MA (2002) Braz J Med Biol Res, 35 (5): 535, C6, c2, Cr/A-3, DB1 y B6-26 (Patente de Estados Unidos N° 6.190.910), y H9.1 y H9.2 (Odorico J. S. (2001) Stem Cells 19: 193) en presencia del antagonista del receptor de ácido retinoico, el antagonista del receptor de retinoides X o el antagonista del receptor de la Vitamina D y monitorizar la expansión de las células a lo largo del tiempo, por ejemplo, de pocas semanas a pocos meses. Si se produce una mayor expansión y una menor diferenciación, en comparación con células no tratadas, el antagonista del receptor de ácido retinoico, el antagonista del receptor de retinoides X o el antagonista del receptor de la Vitamina D ensayado es un agente de expansión celular eficaz. Preferiblemente, el cultivo de la población de células madre o células de una línea celular sustancialmente indiferenciada se realiza en presencia de una cantidad eficaz de una citoquina, preferiblemente, una citoquina de acción temprana o una combinación de dichas citoquinas, por ejemplo, trombopoyetina (TPO), interleuquina-6 (IL-6), un ligando FLT-3 y factor de células madre (SCF). Este ensayo puede ser usado, por un especialista en la técnica, para determinar cual de los antagonistas enumerados a continuación es el más eficaz para el fin de implementar los diversos métodos, preparaciones y artículos de fabricación de la presente invención que se describen adicionalmente en lo sucesivo en este documento. Para determinar las concentraciones y el tiempo de exposición más eficaces para conseguir resultados óptimos con células madre de diferentes orígenes.

Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención serán evidentes para un experto medio en la técnica según los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las realizaciones y aspectos de la presente invención tal y como se detallan y se reivindican en la sección de reivindicaciones, tienen soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes 1-111 Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías que se muestran en las Patentes de Estados Unidos N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes 1-111 Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes 1-111 Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); Los inmunoensayos disponibles se describen de forma extensa en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todas las cuales se incorporan como referencia como se muestra completamente en este documento. Otras referencias generales se proporcionan por todo este documento. Se cree que los procedimientos en esos documentos se conocen bien en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector. Toda la información contenida en esos documentos se incorpora en este documento como referencia.

EJEMPLO 1

ANTAGONISTAS DE RAR Y SU USO EN EXPANSIÓN EX-VIVO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Material y Métodos Experimentales

Síntesis del antagonista de ácido retinoico (RAR) de alta afinidad:

Síntesis del antagonista de RAR ácido 4-[[4-(4-etilfenil)-2,2-dimetil-(2H)-tiocomen-6-il]]-benzoico, (AGN 194310):

- 5 El antagonista de RAR AGN194310 se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Johnson (26), con alguna modificación.

Síntesis de ácido 3-(4-metoxifeniltio)-3-metil-butírico:

- 10 Un tubo con tapón de rosca de paredes gruesas se cargó con ácido 3-metil-2-butenóico (13,86 g) ácido 3,3-dimetilacrílico, (138,4 mmoles), 4-metoxitiofenol (143,2 mmoles), y piperidina (41,6 mmoles) [Aldrich]. La mezcla se calentó a 105-110°C durante 32 horas, y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se disolvió en acetato de etilo (EtOAc) (700 ml) con agitación, y la solución resultante se lavó con HCl acuoso 1 M (50 ml x 2), agua (50 ml), y NaCl acuoso saturado (50 ml). La solución orgánica se secó seguidamente sobre NaSO₄. La concentración de esta solución orgánica a presión reducida produjo un aceite y 2 días de incubación a -20°C produjeron un sólido cristalino. Cuarenta ml de pentano se añadieron al sólido, que a continuación se aplastó y se filtró. El sólido se lavó sobre papel de filtro con pentano (20 ml, 2 veces) para dar el producto ácido 3-(4-metoxifeniltio)-3-metil-butírico, en forma de cristales de color amarillo pálido (31,4 gramos, rendimiento 94,4%, punto de fusión 62-64°C), [¹H-RMN (CDCl₃): d7,5 (t, 2H, J = 8 Hz), d6,9 (t, 2H, J = 6,7 Hz), d3,9 (s, 3H, J = 16,1 Hz), d2,6 (s, 2H), d1,3 (s, 6H)].

Síntesis de cloruro de 3-(4-metoxifeniltio)-3-metil-butirilo:

- 25 93,62 mmoles de cloruro de oxalilo en 10 ml de benceno se añadieron a una solución de ácido 3-(4-metoxifeniltio)-3-metil-butírico en 100 ml de benceno a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Durante la adición del cloruro de oxalilo, la solución se volvió de color amarillo. Después de agitar la mezcla de reacción durante 4 horas a temperatura ambiente, la solución de reacción se enfrió a 5°C y se lavó con NaOH acuoso al 5% enfriado con hielo (5 ml x 6) (un gran volumen de gas se liberó durante este procedimiento), seguido de agua enfriada con hielo (15 ml x 2) y finalmente NaCl acuoso saturado (15 ml). La solución orgánica se secó sobre NaSO₄ y se concentró a presión reducida para dar el producto de cloruro de acilo en forma de un aceite amarillo claro. Este material se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. [¹H-RMN (CDCl₃): d3,8 (s, 3H), d3,1 (s, 2H), d1,4 (s, 6H)].

Síntesis de 6-metoxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona:

- 35 Una solución de cloruro de estaño (IV) en 30 ml de diclorometano se añadió gota a gota a una solución de cloruro de 3-(4-metoxifeniltio)-3-metil-butirilo en 180 ml de diclorometano, a 0°C, produciendo una solución de color rojo oscuro. Después de agitar la mezcla de reacción a 0°C durante 2 horas, la reacción se interrumpió mediante la adición lenta de 115 ml de agua. La mezcla de reacción de color rojo oscuro se volvió amarilla.

- 40 La capa orgánica se lavó con HCl acuoso 1 M (50 ml), NaOH acuoso al 5% (50 ml) y una solución saturada de NaCl (50 ml) y se secó seguidamente sobre sulfato de magnesio. La solución orgánica resultante se concentró a presión reducida, y se destiló al vacío (135-142°C, 0,6 mm de Hg) para obtener 6-metoxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona en forma de un aceite residual amarillo pálido (11 gramos, 80,7%); [¹H-RMN (CDCl₃): d7,6 (s, 1H), d7,1 (s, 1H), d7,0 (s, 1H), d3,8 (s, 3H), d2,86 (s, 2H), d1,46 (s, 6H)].

Síntesis de 6-hidroxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona:

- 50 Tribromuro de boro (20 gramos) en 80 ml de diclorometano se añadió durante un periodo de 20 minutos a una solución de 6-metoxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona en 50 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se enfrió a 23°C y se agitó durante 5 horas, se enfrió a 78°C, y a continuación se inactivó mediante la adición lenta de 50 ml de agua (0,5 horas). Después de calentar a temperatura ambiente, el precipitado incoloro se filtró. Después de la separación de la capa orgánica, la capa acuosa se extrajo con 120 ml de diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ acuoso saturado (50 ml), agua (50 ml) y NaCl acuoso saturado, a continuación se secaron sobre MgSO₄. La retirada del disolvente orgánico a presión reducida dio un sólido de color verde (6 gramos de producto en bruto). Este producto se disolvió en 100 ml de éter dietílico y la solución resultante se diluyó con 300 ml de éter de petróleo. La incubación durante una noche a -15°C produjo un producto cristalino (2,3 gramos, rendimiento 41%, punto de fusión 122-126°C). El filtrado se evaporó al vacío, y el residuo (3,42 gramos) se disolvió en 30 ml de éter dietílico. La solución de éter se diluyó con 150 ml de éter de petróleo y la mezcla resultante se guardó en un congelador a -20°C durante una noche. La precipitación y el filtrado de la solución produjeron 1,5 gramos del producto 6-metoxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona. Este compuesto se precipitó de nuevo mediante disolución en 30 ml de éter dietílico, y a continuación se diluyó con 20 ml de éter de petróleo. La incubación a 4°C durante una noche, produjo 1 gramo (rendimiento 80,7%, punto de fusión 135-142°C, 0,6 mm de Hg) del producto cristalino de color verde, 6-hidroxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona. [¹H-RMN (CDCl₃): d7,8 (s, 1H), d7,7 (s, 1H), d7,1 (s, 1H), d2,8 (s, 2H), d1,45 (s, 6H)].

Síntesis de 2,2-dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il-trifluoro-metanosulfonato:

Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico a una solución agitada de 6-hidroxi-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona en piridina anhidra. La mezcla se agitó durante 4 horas a 0°C, y a continuación se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La concentración a alto vacío produjo un residuo que se trató a continuación con éter dietílico (75 ml). La solución de éter se separó del precipitado resultante de la formación de una sal entre piridina y ácido trifluorometanosulfónico. La solución de éter se lavó con agua, a continuación NaCl acuoso, y se secó sobre MgSO⁴. Después de retirar el éter, el residuo se cristalizó. Los restos de piridina se retiraron al alto vacío. Se obtuvieron 0,7 gramos del producto en bruto, y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna usando 14 gramos de sílice, y una solución de 200 ml de éter de petróleo:acetato de etilo (95:5) (usando 15 ml de solución eluyente x 13). Después de la evaporación de las fracciones de producto, se obtuvieron 0,62 gramos de 2,2-dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il-trifluoro-metanosulfonato en forma de cristales incoloros (rendimiento 76,5%, punto de fusión 70-74°C), [¹H-RMN (CDCl₃): d7,9 (s, 1H), d7,3 (s, 2H), d2,8 (s, 2H), d1,4 (s, 6H)].

Síntesis de 2,2-dimetil-6-trimetilsilanil-etinil-tiocroman-4-ona:

Una solución de 2,2-dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il-trifluoro-metanosulfonato en trietilamina y dimetilformamida se sometió a aspersión con argón durante 10 minutos. Se añadieron Trimetilsililacetileno y cloruro de bis[trifenilfosfina]paladio (II) a esta solución. La mezcla de reacción se calentó en un baño a 95-100°C y se mantuvo una temperatura de reacción de 88-90°C, durante 5 horas. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con 200 ml de agua, y se extrajo con 100 ml de acetato de etilo (60 ml x 3). La fase orgánica resultante se lavó con agua (50 ml x 2), y salmuera (50 ml). Finalmente, la solución orgánica se secó sobre MgSO₄, se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna usando 42 gramos de sílice, y un sistema eluyente compuesto por 400 ml de éter de petróleo:acetato de etilo (97:3), produciendo 2,2-dimetil-6-trimetilsilanil-etinil-tiocroman-4-ona (1,82 gramos, rendimiento 76,4%, punto de fusión 67-70°C); [¹H-RMN (CDCl₃): d7,8 (s, 1H), d7,3 (s, 2H), d2,8 (s, 2H), d1,4 (s, 6H), d0,23 (s, 9H)].

Síntesis de 6-etinil-2,2-dimetiltiocroman-4-ona:

Una solución de 2,2-dimetil-6-trimetilsilanil-etinil-tiocroman-4-ona en metanol y bicarbonato potásico se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El carbonato potásico se disolvió y la reacción se evaporó a un volumen reducido de 30-40 ml, se diluyó con agua (a un volumen aproximado de 70-100 ml), se enfrió en un baño de agua con hielo y se extrajo con éter dietílico (60 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 30 ml de agua y NaCl acuoso saturado (30 ml) y se secaron sobre MgSO₄. La retirada del disolvente a presión reducida produjo 6-etinil-2,2-dimetiltiocroman-4-ona en forma de un sólido de color naranja (1,3 gramos, rendimiento 97,7%, punto de fusión 63-66°C) [¹H-RMN (CDCl₃): d7,8 (s, 1H), d7,3 (s, 2H), d3,0 (s, 1H), d2,8 (s, 2H), d1,4 (s, 6H)].

Síntesis de 4-yodobenzoato de etilo:

Una mezcla de ácido 4-yodobenzoico, 25 ml de alcohol etílico y 20 ml de solución de HCl seco en alcohol etílico se llevó a la temperatura de reflujo durante 2 horas. El sólido se disolvió después de 1 hora de ebullición. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó al vacío hasta un volumen de 10 ml. Una capa orgánica inferior se formó con la conversión química del ácido al éster. La mezcla resultante se enfrió en un baño de hielo. A esta mezcla se añadieron 80 ml de éter dietílico, hidrógeno carbonato sódico seco (1 gramo) y 50 gramos de hielo. Esta solución se agitó, se lavó mediante disolución de una solución saturada de bicarbonato sódico en 50 ml de agua y agua, se secó sobre sulfato sódico, y se evaporó al vacío, produciendo 4-yodobenzoato de etilo en forma de un producto oleoso líquido (5,43 gramos, rendimiento 96,1%) [¹H-RMN (CDCl₃): d7,8 (s, 1H), d7,79 (s, 1H), 7,6 (s, 1H), d4,4 (d, 2H, J = 7,1 Hz), d1,4 (s, 3H)].

Síntesis de 4-[(2,2-dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il)etinil]-benzoato de etilo:

Una solución de 6-etinil-2,2-dimetil-tiocroman-4-ona y 4-yodobenzoato de etilo en 80 ml de trietilamina se purgó con argón durante 10 minutos. 0,7 gramos de Pd[PPh₃]₂Cl₂ y 0,19 gramos de CuI se añadieron a esta solución. La solución se sometió a aspersión con argón durante 5 minutos adicionales, a continuación se agitó durante 2 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite con un lavado en éter dietílico. El filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo sólido se purificó mediante cromatografía en columna (40 gramos de sílice, éter de petróleo:acetato de etilo 95:5, 750 ml de sistema de disolvente eluyente) para dar 4-[(2,2-dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il)etinil]-benzoato de etilo (1,26 gramos, rendimiento 56,5%, punto de fusión 102-104°C). [¹H-RMN (CDCl₃): d8,275 (s, 2H), d7,6 (s, 3H), d7,5 (s, 1H), d7,2 (s, 1H), d4,3 (t, 2H, J = 7), d2,8 (s, 2H), d1,48 (s, 3H)].

Síntesis de 4-[(2,2-dimetil-4-trifluorometanosulfoniloxi)-(2H)-tiocromen-6-il)etinil]benzoato de etilo:

Una solución de bis(trimetilsilil)amida sódica (solución 0,6 M en tolueno) y 10 ml de tetrahidrofurano se enfrió a -78°C y una solución de 4-[(2,2-Dimetil-4-oxo-tiocroman-6-il)etinil]benzoato de etilo en 10 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente. Después de 30 minutos, una solución de 2-[N,N-bis (trifluorometanosulfonil)amino]piridina en 7 ml de THF se añadió a la mezcla de reacción. Después de 5 minutos, el baño de enfriamiento se retiró y la solución de reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante una noche y se inactivó mediante la adición de una

solución acuosa saturada de NH_4Cl (20 ml). Se formaron dos capas de disolvente. La mezcla de solución se extrajo con acetato de etilo (75 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaOH acuoso al 5% (10 ml), agua (15 ml x 2), se secaron sobre MgSO_4 , y a continuación se concentraron a presión reducida. El producto en bruto (1,74 gramos) se purificó mediante cromatografía en columna con 35 gramos de sílice, y sistema eluyente de acetato de etilo/éter de petróleo (500 ml, 20 x 25 ml) al 2%. Después de la evaporación de las fracciones de producto eluido combinadas, se obtuvo 4-[[2,2-dimetil-4-trifluorometanosulfoniloxi)-(2H)-tiocromen-6-il]etnil]benzoato de etilo (1,16 gramos, rendimiento 71%, punto de fusión 100-104°C), en forma de un sólido de color amarillo pálido. [^1H -RMN (CDCl_3): d8,2 (s, 2H), d7,6 (s, 3H), d7,5 (s, 1H), d7,2 (s, 1H), d6,0 (s, 1H), d4,4 (t, 6H, J = 24 Hz)].

10 **Síntesis de 4-[[4-etilfenil]-2,2-dimetil-[2H]-tiocromen-6-il]-etnil]-benzoato de etilo:**

7,25 ml de $\text{LiC}(\text{CH}_3)_3$ 1,7 M en pentano se añadieron a una solución de p-bromo-etil-benceno (enfriada a -78°C) en 4 ml de THF. Una solución de 658,7 mg de cloruro de zinc en 8 ml de THF se añadió, y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 40 minutos, y a continuación se transfirió a un segundo matraz que contenía 4-[[2,2-Dimetil-4-trifluorometilsulfonil)-(2H)-tiocromen-6-il]etnil]benzoato de etilo y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en 8 ml de THF. La solución resultante se calentó a 50°C durante 2 horas, se agitó a temperatura ambiente durante una noche, y a continuación se inactivó mediante adición de NH_4Cl acuoso saturado (10 ml) durante 10 minutos. Se formaron dos capas. La mezcla se extrajo con 75 ml de acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (10 ml), y NaCl saturado. Después de secar la solución orgánica sobre MgSO_4 , la solución se concentró a presión reducida, y se purificó mediante cromatografía en columna usando 24 gramos de sílice, y un sistema eluyente de éter de petróleo:acetato de etilo (95:5) (200 ml) produciendo 4-[[4-(4-etilfenil)-2,2-dimetil-[2H]-tiocromen-6-il]-etnil]-benzoato de etilo

[^1H -RMN (CDCl_3): d8,2 (s, 2H), d7,6 (s, 2H), d7,4 (s, 2H), d7,2 (s, 1H), d7,1 (s, 2H), d7,0 (s, 2H), d6,0 (s, 1H), d4,4 (t, 2H, J = 24 Hz), d2,8 (t, 2H, J = 15 Hz), d1,6 (s, 6H), d1,4 (t, 3H, J = 14 Hz)].

25

Síntesis de ácido 4-[[4-(4-Etilfenil)-2,2-dimetil-(2H)-tiocroman-6-il]-etnil]benzoico:

Dos ml de una solución 2 M de NaOH se añadieron a una solución de 4[[4-(4-etilfenil)-2,2-dimetil-[2H]-tiocromen-6-il]-etnil]benzoato de etilo en THF y etanol. La solución se calentó a 40°C , se agitó durante una noche, y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 1 N (4 ml). Al comienzo del proceso, la mezcla de reacción formaba un sistema heterogéneo. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (25 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10 ml de agua, NaCl acuoso saturado, y se secaron con NaSO_4 , y el disolvente se retiró a presión reducida. El sólido residual (0,31 gramos) se recristalizó a partir de acetonitrilo (25 ml) para dar ácido 4-[[4-(4-etilfenil)-2,2-dimetil-(2H)-tiocroman-6-il]-etnil]benzoico, (AGN194310) (0,236 gramos, 70%) en forma de un sólido incoloro (punto de fusión $210-212^\circ\text{C}$) [^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$): d8,2 (s, 2H), d7,8 (s, 2H), d7,6 (s, 2H), d7,4 (s, 2H), d7,2 (s, 2H), d7,0 (s, 1H), d6,0 (s, 1H), d2,6 (t, 2H, J = 35 Hz), d1,6 (s, 6H), d1,4 (t, 3H, J = 46 Hz)].

35

Recogida y purificación de la fracción de células mononucleares:

40

Se obtuvieron células de sangre humana de sangre del cordón umbilical de pacientes hembra después de un parto de plazo completo, normal (se obtuvo el consentimiento informado). Las muestras se recogieron y se procesaron dentro de las 12 horas después del parto. La sangre se mezcló con gelatina al 3% (Sigma, St. Louis, MO), se sedimentó durante 30 minutos para retirar la mayoría de los eritrocitos. La fracción rica en leucocitos se recogió y se sembraron en placas sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (1,077 gramos/ml; Sigma) y se centrifugó a 400 g durante 30 minutos. La fracción de células mononucleares en la capa de interfaz se recogió, se lavó tres veces y se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries) que contenía albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA, Fracción V; Sigma).

45

50 **Purificación de células $\text{CD}34^+$, a partir de fracciones de células mononucleares:**

Para purificar células mononucleares $\text{CD}34^+$, la fracción se sometió a dos ciclos de separación inmuno-magnética usando el Kit de aislamiento de células progenitoras $\text{CD}34$ MiniMACS® o Clinimax® (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza de la población $\text{CD}34^+$ obtenida variaba entre el 95% y el 98% según se determinó mediante citometría de flujo (véase a continuación).

55

Para purificar adicionalmente la población $\text{CD}34^+$ en las sub-fracciones $\text{CD}34^+38^-$ o $\text{CD}34^+\text{Lin}^-$, las células $\text{CD}34^+$ purificadas se marcaron adicionalmente para $\text{CD}38$ (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) o antígenos de linaje (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). La fracción marcada negativamente se midió y se clasificó mediante un clasificador FACS.

60

Para la purificación de $\text{CD}34^+\text{Lin}^-$, la fracción $\text{CD}34^+$ se agotó en células que expresan antígenos de linaje usando una columna de selección negativa (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá).

Expansión ex vivo de poblaciones de células CD30⁺:

Las células purificadas que expresan CD34⁺ anteriores se cultivaron en placas de cultivo agrupado de 24 pocillos de Costar (Corning, Inc., Corning, NY) o bolsas de cultivo (American Fluoroseal Corp), a una concentración de 10⁴ células/ml en medio alfa (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, Biological Industries). Se añadieron las siguientes citoquinas recombinantes humanas: Trombopoyetina (TPO), Interleuquina-6 (IL-6), ligando FLT-3 y factor de células madre (SCF), todos a concentraciones finales de 50 ng/ml cada uno, aunque ocasionalmente IL-3, a una concentración de 20 ng/ml, se añadió junto con o en lugar de SCF. Para la diferenciación de células no hematopoyéticas, se usaron FGF, EGF, NGF, VEGF, LIF o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) para suplementar al medio de cultivo, en solitario o en diversas combinaciones. Todas las citoquinas usadas se adquirieron de Perpo Tech, Inc. (Rocky Hill, NJ). Los cultivos se incubaron a 37°C, CO₂ al 5%, en una atmósfera humidificada.

Como alternativa, se aislaron células de la fracción mononuclear completa (MNC), se cultivaron y se suplementaron con citoquinas, como anteriormente.

A intervalos semanales, los cultivos celulares se mejoraron y se semi-despoblaron y se suplementaron con medio de cultivo fresco, suero y citoquinas o se suplementaron con medio de cultivo fresco, en solitario. En puntos temporales predeterminados, las células se recogieron, se tiñeron con azul de tripano, se contaron y la morfología celular se determinó mediante el uso de frotis preparados con centrifuga cytospin (Shandon, UK) y teñidos con soluciones de May-Grunwald/Giemsa.

Suplementación con antagonista de RAR de cultivos de células madre/progenitoras hematopoyéticas ex vivo:

Se prepararon cultivos de CD34⁺ purificadas y MNC totales y se mantuvieron como se ha descrito anteriormente. Se añadió el antagonista de RAR AGN 194310 a cultivos de ensayo a concentraciones que variaban entre 1 x 10⁻³ - 1 x 10⁻¹¹ M [o 410 µg/l y 4,1 x 10⁻⁵ µg/l]. El antagonista se añadió durante un periodo predeterminado, limitado, durante hasta tres semanas o de forma continua durante todo el periodo de cultivo.

Evaluación morfológica:

La caracterización morfológica de las poblaciones de cultivo resultantes se realizó sobre alícuotas de células depositadas sobre portaobjetos de vidrio mediante cytospin (Cytocentrifuge, Shandon, Runcorn, UK). Las células se fijaron, se tiñeron con tinción de May-Grunwald/Giemsa y se examinaron microscópicamente.

Análisis del antígeno de superficie

Las células se recogieron, se lavaron con una solución de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA) y azida sódica al 0,1% (Sigma) y se tiñeron a 4°C durante 60 minutos con anticuerpos conjugados a isotiocinato de fluoresceína o ficoeritrina (todos de Immunoquality Products, Países Bajos). Las células se lavaron a continuación con el mismo tampón y se analizaron mediante citómetros de flujo FACS calibrer o Facstarplus. Las células se pasaron a una velocidad de 1000 células/segundo, usando solución salina como fluido envolvente. Un haz de láser de argón a 488 nm servía como fuente de luz para la excitación. La emisión de diez mil células se midió usando amplificación logarítmica, y se analizó usando el software CellQuest. La tinción de control negativo de células se realizó con IgG-PE de ratón (Dako A/S Glostrup, Dinamarca) e IgG-FITC de ratón (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

Determinación de la expresión de CD34 y otro marcador hematopoyético:

La expresión en superficie de CD34 en cultivos a corto y largo plazo iniciados con células CD34⁺ purificadas o con la fracción de MNC completa se determinó de la siguiente manera: células CD34⁺ se reseleccionaron positivamente (kit Miltenyi) y se contaron. La pureza se confirmó mediante posteriores análisis FACS y de morfología.

Las sub-series de células CD34⁺ reseleccionadas se tiñeron para la siguiente combinación de antígenos: CD34PE/CD38FITC y CD34PE/38, 33, 14, 15, 3, 4, 61, 19 (Lin) FITC. La fracción positiva para CD34 y negativa para CD38 se definió como CD34⁺CD38⁻. La fracción positiva para CD34 y negativa para LIN se definió como la fracción de células CD34⁺Lin⁻.

Cálculos de la población de células:

Los resultados del análisis FACS se dan como valores porcentuales de células. Los números absolutos de las subseries se calculan a partir del número absoluto de células CD34⁺.

La determinación de los niveles de base de células CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺Lin⁻ se realizó de la siguiente manera: células CD34⁺ se purificaron a partir de 3 unidades de cordón umbilical descongeladas y se tiñeron para los

marcadores anteriores. La media de estos experimentos se consideraba como el valor de base.

Los recuentos de células totales, números de células y subseries CD34⁺ y números de CFU se presentan como números acumulativos, suponiendo que los cultivos no se hubieran sometido a pases, es decir el número de células por ml estuviera multiplicado por el número de pases realizado.

Evaluación de la capacidad de formación de Unidades Formadoras de Colonias (CFU):

Las células se clonaron en medio semi-sólido que contenía metilcelulosa suplementado con 2 IU/ml de eritropoyetina (Eprex, Cilag AG Int., Suiza), factor de células madre e IL-3, ambos a 20 ng/ml, y G-CSF y GM-CSF, ambos a 10 ng/ml (todos de Perpo Tech). Los cultivos se incubaron durante 14 días a 37°C, CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada.

Determinación de los valores de LTC-CFU:

En resumen, la capacidad de los cultivos para mantener la auto-renovación se midió mediante determinación del contenido de células de unidades formadoras de colonias en los cultivos a largo plazo y a largo plazo prolongado (LTC-CFUc), como se ha descrito en las referencias anteriormente en este documento.

Resultados Experimentales

El tratamiento con antagonista de RAR de poblaciones de CD34⁺ enriquecidas altera la expresión de marcadores de diferenciación en superficie dando como resultado grandes cantidades de células con un fenotipo menos diferenciado en cultivos a corto plazo:

Para determinar los efectos del antagonista del receptor de retinoide sobre la expansión *ex vivo* de células madre, se iniciaron cultivos enriquecidos en células CD34⁺ en presencia de una combinación de 4 citoquinas con y sin diferentes concentraciones del antagonista del receptor de ácido retinoico AGN 194310. Dos semanas después de la siembra inicial, el porcentaje de células que portan el marcador CD34⁺ (que se considera que son en su mayoría células progenitoras comprometidas), así como el porcentaje de células que portan los marcadores CD34⁺/CD38⁻ y CD34⁺Lin⁻ (que se considera que representan el compartimento de células madre y progenitoras tempranas) se evaluó mediante análisis FACS.

Los diagramas de análisis FACS se muestran en las figuras 1A-C. Los cultivos tratados con antagonistas del receptor de ácido retinoico (RAR) contenían cantidades similares de células totales y CD34⁺ en comparación con cultivos tratados solamente con citoquinas. El tratamiento con antagonista de RAR suprimía completamente la expresión del antígeno CD38 y al mismo tiempo, inhibía significativamente la expresión de los antígenos asociados de diferenciación adicionales CD33, CD14, CD15, CD4, CD3, CD19 y CD61, lo que era un fenómeno totalmente inesperado. La Tabla 1 a continuación resume los datos del análisis FACS.

Tabla 1

	Nº de células (x 10 ⁴)	% de células 34 ⁺	% de células 34 ⁺ /38 ⁻	% de células 34 ⁺ /Lin ⁻
Control (solamente citoquinas)	52	19,41	6,82	3,96
Antagonista de RAR, 10 ⁻⁵ M	42	18,94	17,14	15,18
Antagonista de RAR 10 ⁻⁶ M	52	19,59	17,16	11,91

En una serie adicional de experimentos, los subconjuntos de células madre y progenitoras tempranas se midieron después de 2 semanas de expansión a partir de una fracción de células CD34⁺ re-seleccionadas. Después de dos semanas en cultivo, las células CD34⁺ se re-seleccionaron y se analizaron mediante FACS, como anteriormente, en busca de la presencia de los marcadores de superficie CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺Lin⁻ (Figura 2). Los cultivos tratados con antagonista de RAR de células CD34⁺ re-seleccionadas mostraron un aumento de 1000 veces de la expresión en superficie de CD34⁺CD38⁻ y un aumento de 500 veces de CD34⁺Lin⁻. En un marcado contraste, los cultivos de control re-seleccionados tratados con citoquinas en solitario revelaron solamente una expansión de 36 veces de los compartimentos de CD34⁺CD38⁻ y una expansión de 8 veces de CD34⁺Lin⁻. A pesar de las marcadas diferencias en la expresión del antígeno de superficie, el número total de células, y el número total de células CD34⁺ era comparable en todos los cultivos. Estos resultados indican que los antagonistas de RAR preferiblemente permiten una marcada proliferación, aunque limitada diferenciación del compartimento de células madre. Los antagonistas de RAR, por lo tanto, afectan directamente a la expansión muchas veces de estas raras células durante el periodo de cultivo a corto plazo. También podría llegarse a la conclusión de que los antagonistas no tienen ningún efecto positivo o negativo sobre células CD34⁺ más maduras comprometidas.

El tratamiento con antagonista de RAR de poblaciones enriquecidas en CD34⁺ altera la expresión del marcador de diferenciación en superficie, dando como resultado grandes cantidades de células con un fenotipo menos diferenciado en cultivos a largo plazo:

5 Para descubrir si los antagonistas de RAR potencian una fracción de células madre con mayor capacidad de auto-renovación, se ensayó el efecto de un tratamiento de cultivo con antagonista de RAR limitado, a corto plazo (2-3 semanas) sobre la expansión a largo plazo de células y subconjuntos CD34⁺. Los cultivos se trataron con antagonistas de RAR solamente durante las primeras tres semanas y a continuación se incubaron durante ocho semanas adicionales en ausencia del antagonista. Para determinar el efecto del antagonista sobre la expansión a corto y a largo plazo de células CD34⁺, se tomaron muestras representativas de los cultivos a los intervalos de tiempo indicados (Figura 3), para la reselección de células CD34⁺. La expresión en superficie de CD34⁺ se determinó de nuevo mediante análisis FACS después de una etapa de selección positiva (Figura 5B). Durante las primeras tres semanas de incubación no había diferencias significativas entre cultivos de control y tratados con antagonista de RAR en términos del número de células portadoras de CD34⁺. Después de ocho semanas adicionales de incubación (semana 11 del cultivo), los cultivos pretratados con el antagonista de RAR revelaban una expresión continua aumentada a largo plazo del antígeno CD34⁺ de superficie (Figura 3A) mientras que no podían detectarse células CD34⁺ en los cultivos de control. Se observó un aumento de 92 veces de la expresión en cultivos tratados con antagonista de RAR entre la semana tres y once y una expansión de 1621 veces de este compartimento se producía desde el inicio de los cultivos.

20 La expresión de los marcadores de superficie CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺Lin⁻ se verificó en una fracción CD34⁺ reseleccionada, altamente purificada (Figura 3B-C). Después de dos semanas en cultivo, aunque las muestras de control revelaban un modesto aumento de 10 veces en la expresión en superficie de CD34⁺Lin⁻, los cultivos tratados con antagonista de RAR se expandían en unas marcadas 530 veces. La expresión de CD34⁺Lin⁻ en la semana once, 9 semanas después de la terminación del tratamiento con el antagonista, revelaba un aumento de 16.700 veces de la expresión de CD34⁺Lin⁻. La comparación entre las veces de expansión de los cultivos tratados con antagonista de RAR frente a las de las células de control indica que solamente los primeros permiten una proliferación continua significativa de células madre en cultivos a largo plazo prolongados. La expansión continuada de células madre en ausencia de antagonistas de RAR indica que incluso un pulso relativamente corto con el antagonista es suficiente para modificar respuestas a células madre.

35 En un experimento adicional, los cultivos se trataron durante solamente una semana con citoquinas solamente (control) o con citoquinas y el antagonista de RAR. Se observó un marcado efecto a largo plazo del antagonista de RAR en la semana 13 de incubación, como se demuestra en los resultados presentados en la Tabla 2 a continuación. En la semana 20, los cultivos pretratados con el antagonista de RAR se deterioraban y las células experimentaban una diferenciación normal, aunque a una cinética más lenta que el control. Estos resultados indican que un tratamiento de una semana con antagonista de RAR es suficiente para modular drásticamente la capacidad de proliferación de células madre en condiciones *ex vivo* dado que el antagonista de RAR potencia transitoriamente la proliferación de células madre aunque mantiene su capacidad de auto-renovación.

40

Tabla 2

Tratamiento	Nº de células CD34 ⁺	Nº de CFU*103
Control (semana 13)	0	0
Control (semana 20)	0	0
Antagonista de RAR (10 ⁻⁵ M) (semana 13)	10322	66355
Antagonista de RAR (10 ⁻⁵ M) (semana 20)	0	0

45 La limitada proliferación celular exhaustiva y duradera permitida por el antagonista de RAR se demuestra adicionalmente en otro experimento, en el que se demostró que los cultivos *ex vivo* suplementados con el antagonista de RAR AGN194310 (10⁻⁷ M o 0,41 microgramos/litro) permitían la proliferación celular, solamente hasta 11 semanas después de la siembra inicial de células de cultivo (Figura 4). La capacidad de formación de CFU también se evaluó, aunque la capacidad de formación de unidad de formación de colonias máxima precedía al número absoluto máximo de células CD34⁺ en aproximadamente una semana, con lo que un descenso precipitado de la proliferación era evidente, punto en el que se producía la diferenciación celular, como se demostraba mediante la pérdida de potencial clonogénico (capacidad de formación de CFU) del cultivo. Estos resultados, que describen un comportamiento normal de las células madre, concretamente proliferación exhaustiva seguida de diferenciación están en contraste marcado respecto a informes previos de que la integración de un gen dominante negativo del receptor de retinoides sostiene la proliferación infinita, en otras palabras, dieron como resultado la creación de líneas celulares (Muramatsu M, Biochem Biophys Res Commun 27 de julio de 2001: 285 (4): 891-6 "reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem/progenitor cells), mientras que en la presente invención, las células eran completamente capaces de una diferenciación normal, después de la proliferación *ex vivo* extendida.

60 Un diagrama de cuadros FACS representativo de células CD34⁺ 2 y 11 semanas después de la reselección se muestra en la Figura 5. Aunque los cultivos de control expresaban marcadores para un estado más diferenciado, las muestras tratadas con antagonistas de RAR expresaban un fenotipo menos diferenciado, como se demostraba

mediante el desplazamiento a la izquierda en el perfil de expresión. Estos descubrimientos indicaban que, aunque no eran negativas para linaje, la mayoría de las células CD34⁺ obtenidas de cultivos tratados con antagonista de RAR expresaban menos marcadores de superficie relacionados con el linaje.

5 **El tratamiento con antagonista de RAR de poblaciones de células mononucleares expande una población de células con un fenotipo menos diferenciado**

Las fracciones de células mononucleares cultivadas en presencia de antagonistas de RAR y citoquinas revelaban de forma similar un aumento significativo del número de células CD34⁺Lin⁻ (78%, 24%) como se cuantifica mediante análisis FACS a partir de una fracción de células CD34⁺ reseleccionadas, altamente purificadas, en comparación con los controles, 2 y 5 semanas (respectivamente), después de la siembra inicial (Tabla 3). Sin embargo, lo más remarcable es que estas células respondían a los antagonistas de RAR y expandían una población indiferenciada, incluso en condiciones de cultivo mezclado, sin purificación anterior de la población CD34⁺. El tratamiento con antagonista de RAR era suficiente para estimular la expansión específica del compartimento de células madre/progenitoras, dado que 5 semanas después de la siembra, aunque las MNC de control no tenían población de CD34⁺ detectable, los cultivos tratados con antagonista de RAR revelaban cantidades significativas de células CD34⁺, y aquellas que eran deficientes en el marcador de linaje. Por lo tanto, cualesquiera factores elaborados mediante las células de cultivo MNC que suprimían la supervivencia de células CD34⁺ en muestras de control son insuficientes para invalidar la señal proporcionada por el antagonista de RAR para elaborar este compartimento.

Tabla 3

Expansión de células mononucleares CD34⁺/Lin⁻		
2 semanas		
	Citoquinas solamente	Citoquinas + antagonista de RAR 10 ⁻⁶ M
Nº de células CD34 x 10 ^{4*}	176	169
Nº de células CD34 ⁺ /Lin ⁻ x 10 ^{4*}	1,76	132,5
% de CD34/Lin ⁻	1	78,4
5 semanas		
	Citoquinas solamente	Citoquinas + antagonista de RAR 10 ⁻⁶ M
Nº de células CD34 x 10 ^{4*}	0	985
Nº de células CD34 ⁺ /Lin ⁻ x 10 ^{4*}	0	237,8
% de CD34/Lin ⁻	0	24,1

* Valor acumulativo

25 **El tratamiento con antagonista de RAR potencia la capacidad de formación de unidades formadoras de colonias en cultivo a largo plazo (LTC-CFUc)**

La demostración de la capacidad de un cultivo para formar unidades formadoras de colonias (CFU) es otro método funcional, *in vitro* para verificar la presencia de células madre y progenitoras tempranas con un alto potencial de auto-renovación. En este caso se demuestra que el pre-tratamiento del cultivo con antagonistas de RAR permitió una mayor expansión de células con una capacidad de auto-renovación según se demuestra mediante la presencia de números en aumento de células CFU durante el periodo de cultivo a largo plazo prolongado.

Los cultivos de células CD34⁺ a largo plazo se suplementaron con una combinación de 4 citoquinas, Flt3, TPO, IL-6 e IL-3, con y sin concentraciones predeterminadas variables del antagonista de RAR, AGN 194310. El tratamiento con antagonista de RAR de los cultivos era durante un periodo limitado de tres semanas o era continuo durante todo el periodo de cultivo. La capacidad de formar CFU se determinó para cultivos a largo plazo (6 semanas) tratados con 2 dosis del antagonista de RAR durante un pulso corto o de forma continua y se comparó con muestras de control tratadas con citoquinas en solitario. Los cultivos a largo plazo pulsados durante las 3 primeras semanas con el antagonista revelaban un aumento de 5 veces del contenido de CFU en comparación con los cultivos de control (Figuras 6A y 6B). La enumeración de las colonias mezcladas indicaba que los cultivos de control no contenían ninguna células de unidad formadoras de colonias mezcladas, mientras que los cultivos tratados con el antagonista contenían gran número de células con potencial de CFU-mezcladas (Figura 7).

45 **El tratamiento con antagonista de RAR potencia la capacidad de formación de unidades formadoras de colonias en cultivo a largo plazo prolongado (LTC-CFUc):**

La capacidad de formar CFUc se determinó para cultivos a largo plazo prolongados (8-10 semanas) tratados con el antagonista de RAR, también. Las diferencias en el contenido de CFU eran significativamente más pronunciadas durante este periodo de cultivo. El tratamiento con antagonista de RAR aumentaba marcadamente el contenido de CFUc entre la semana 6 y 10, en comparación con cultivos de control, que perdieron la capacidad de regenerar células con potencial de CFU (Figuras 6A y 6B) el tratamiento con pulsos o tratamiento continuo con antagonista de

RAR aumentaba el contenido de CFU en 15×10^4 . El tratamiento de pulsos con el antagonista produjo el nivel más alto de contenido de CFU-mezcla, también (Figura 7).

EJEMPLO 2

ANTAGONISTAS DE RAR Y SU USO EN EXPANSIÓN DE HEPATOCITOS EX-VIVO

Material y Métodos Experimentales

Aislamiento y Cultivo de Hepatocitos Primarios:

Se recogieron tres hígados intactos de ratones VLVC hembra de 3 semanas de edad (Harlan Laboratories, Jerusalén, Israel), se diseccionaron y se lavaron dos veces con DMEM (Beit Haemek, Israel), se incubaron con DMEM en presencia de 0,05% de colagenasa durante 30 minutos a 37°C, se trituraron y se pasaron a través de un tamiz de 200 μm de malla, produciendo hepatocitos individuales. Las células se lavaron dos veces y se evaluó la viabilidad con azul de tripano. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 35 mm recubiertas de colágeno a una densidad de 4×10^4 células vivas/ml en medio F12 (que contenía Hepes 15 mM, glucosa al 0,1%, bicarbonato sódico 10 mM, 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina, glutamina, 0,5 unidades/ml de insulina, 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona, y suero fetal bovino al 10%). El medio se cambió después de 12 horas, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió nuevo medio. El medio se cambiaba dos veces por semana.

Los hepatocitos también se cultivaron en presencia de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), cadena β del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF-BB), Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF-4) y Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), a 20-50 ng/ml cada uno, durante todo el periodo de cultivo de acuerdo con el método de Schwartz et al. (Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 2002; 109 (10): 1291-302). Los hepatocitos también se cultivaron en medio libre de suero de acuerdo con el método de Runge et al. (Runge D, Runge DM, Jager D, Lubecki KA, Beer Stolz D, Karathanasis S, Kietzmann T, Strom SC, Jungermann K, Fleig WE, Michalopoulos GK. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269 (1): 46-53).

En todas las condiciones de cultivo de hepatocitos mencionadas anteriormente, las células se cultivan en presencia o ausencia del antagonista de ácido retinoico AGN 194310 a concentraciones que variaban entre 10^{-5} M y 10^{-9} M.

Después de un periodo de 3 semanas, los cultivos tratados con antagonista 10^{-5} M se separaron con tripsina al 0,25%, se dividieron y se resembraron en placas a una proporción de 1:2. Las células se inmunotifieron como se describe a continuación, o se visualizaron con tinción de Giemsa.

Cultivos de hepatocitos murinos suplementados con EGF y HGF se evaluaron como cultivos primarios, o después de primeros y segundos pases. Los cultivos de primer pase se cultivaron durante 2 semanas, se dividieron a 1:2 y se inmunotifieron 8 días después en busca de la presencia de albúmina, como se describe a continuación. Los cultivos de segundo pase se cultivaron análogamente durante 2 semanas, se dividieron a 1:2, y se cultivaron durante una semana adicional, a continuación se dividieron a 1:4 y se inmunotifieron de forma similar 4 días después.

Caracterización Histológica:

Los hepatocitos y células expandidas *ex vivo* se fijaron en metanol directamente en sus placas de cultivo celular y cada procedimiento se realizó mediante procedimientos convencionales como se describen a continuación.

La captación celular de aniones orgánicos por hepatocitos en cultivo usados habitualmente como marcadores de la funcionalidad de hepatocitos, fue estudiada mediante captación de tinte verde indocianina (ICG). ICG (Sigma, Jerusalén, Israel) se disolvió en DMEM produciendo una concentración final de 1 mg/ml (Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells.* 2002; 20 (2): 146-54). Los hepatocitos cultivados durante diez días se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 400 μl del tinte durante 15 minutos a 37°C. A continuación se aclararon las muestras 3 veces con PBS, y se visualizaron mediante microscopía óptica.

Las células expandidas *ex vivo* y los hepatocitos se tñieron con tinción de Giemsa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Shandon, Pittsburg, PA) durante 4 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en solución tampón durante 4 minutos y se lavaron 3-4 veces con solución de aclarado.

Inmunocitoquímica

Los hepatocitos se sondearon en busca de la expresión de α -fetoproteína (AFP) usando un anticuerpo policlonal de conejo generado contra una proteína recombinante de origen humano que reacciona de forma cruzada con AFP de

ratón (H-140 Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA), y albúmina usando un antisuero de conejo para albúmina de ratón (Cappel-ICN, Aurora, Ohio). Las células se fijaron en metanol a -20°C durante 10 minutos, se aclararon con PBS durante 5 minutos, y se permeabilizaron con triton-X al 0,1% (Sigma, Jerusalén, Israel) en PBS durante 5 minutos. Las células se lavaron a continuación con solución salina tamponada con Tris (TBS) durante 5 minutos y se incubaron con albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en PBS durante 10 minutos. Las peroxidasa endógenas se inactivaron mediante incubación con bloqueo de peroxidasa (Envision, Dako, Carpintería, CA) durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Las células se incubaron con anticuerpos generados en conejo contra albúmina de ratón (a una dilución de 1:100); o contra α -fetoproteína (a una dilución de 1:25) durante 30 minutos. Las muestras se visualizaron a continuación en busca de actividad peroxidasa (mediante métodos de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el sistema Envision HRP (Dako, Carpintería, CA), y se contratiñeron con hematoxilina (Dako, Carpintería, CA).

Resultados Experimentales

Cultivos primarios obtenidos de hígados de ratón de 3 semanas de edad, cultivados en medios en ausencia de citoquinas, se sondearon en busca de la expresión de marcadores específicos de hepatocitos incluyendo marcadores de desarrollo temprano como α -fetoproteína (que es específica de células progenitoras menos diferenciadas) y albúmina que es un marcador para hepatocitos maduros, después de 3 semanas en cultivo. Las células cultivadas se teñían positivamente (precipitado de color rojo-marrón) para α -fetoproteína (Figura 8A), y para albúmina (no se muestran los datos) indicando la presencia de hepatocitos funcionales. La incubación de los cultivos en presencia del antagonista de ácido retinoico 10^{-5} M dio como resultado un aumento de la fracción de células que se teñían positivamente para α -fetoproteína en comparación con cultivos de control (Figura 8B). Este aumento puede señalar la proliferación de hepatocitos tempranos. Análogamente, la tinción de giemsa de los cultivos revelaba una gran población de células ovaladas (las células progenitoras madre de hepatocitos se definen como células ovaladas) en cultivos tratados con el antagonista de ácido retinoico (Figura 9B) mientras que pocas eran evidentes en cultivos de control no tratados (Figura 9A).

Los cultivos de hepatocitos cultivados en presencia del antagonista y en ausencia de citoquinas durante 3 semanas se tripsinizaron, se dividieron y se sembraron en placas. Las células se volvieron a unir a la placa de cultivo y revelaron una morfología hepatocítica típica (Figura 9C), en oposición a datos previos que indicaban una dificultad para cultivar hepatocitos primarios durante periodos de tiempo prolongados en cultivo, especialmente en ausencia de citoquinas (Wick M, Koebe HG, Schildberg FW. New ways in hepatocyte cultures: Cell immobilization technique ALTEX. 1997; 14 (2): 51-56; Hino H, Tateno C, Sato H, Yamasaki C, Katayama S, Kohashi T, Aratani A, Asahara T, Dohi K, Yoshizato K. A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. Biochem Biophys Res Commun. 5 de marzo de 1999; 256 (1): 184-91; Tateno C, Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. Am J Pathol. 1996; 148 (2): 383-92).

La suplementación de los medios de cultivo con factores de crecimiento en cultivos de hepatocitos primarios tratados con antagonista de RAR revelaron resultados similares a cultivos no suplementados, en que los cultivos suplementados se teñían positivamente para la producción de α -fetoproteína (Figura 10C), en comparación con cultivos de control, suplementados con factores de crecimiento, pero privados del antagonista de RAR, en los que no era evidente la inmunotinción (Figura 10D). La tinción de fondo, según lo determinado sondeando en busca de la expresión de albúmina, era despreciable en cultivos suplementados tratados con antagonista de RAR (Figura 10A) y no tratados (Figura 10B). Por lo tanto, la suplementación del cultivo con factores de crecimiento en solitario es insuficiente para expandir un fenotipo celular menos diferenciado.

Análogamente, el primer y segundo pases de cultivos de hepatocitos suplementados con factor de crecimiento se evaluaron respecto a su capacidad para persistir en cultivo. En cultivos suplementados con factor de crecimiento de primer pase, tanto los cultivos tratados con antagonista de RAR (Figura 11B) como los cultivos de control no tratados (Figura 11A) revelaban la presencia de hepatocitos típicos, sin embargo solamente los cultivos tratados con RAR (Figura 11 C y D) revelaban un gran número de islotes de células ovaladas, lo que era indicativo de una población de células madre de hepatocitos.

Los cultivos suplementados con factor de crecimiento de segundo pase mostraban una marcada disminución del número de hepatocitos evidentes en cultivos de control (Figura 11E), en comparación con cultivos tratados con RAR (Figura 11F), lo que era indicativo de un fallo de la suplementación con factor de crecimiento en solitario para proporcionar hepatocitos expandidos y persistentes en cultivo. Solamente el tratamiento con antagonista de RAR permitió la expansión y el cultivo a largo plazo de poblaciones de hepatocitos.

EJEMPLO 3

ANTAGONISTAS DE RXR Y RAR+RXR Y SU USO EN LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS EX-VIVO

Material y Métodos Experimentales

Síntesis del antagonista de RXR, ácido (2E,4E,6Z)-7-[3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-2-il]-3-metilocta-2,4,6-trienoico] (LGN 100754):

La síntesis de LGN100754 se basó en (i) Canan-Koch et al. J. Med. Chem. 39, 17, 3229-3234 [esquema de reacción, página 3231; y (ii) Protocolos de síntesis de la Solicitud internacional N° PCT/US96/14876 (WO 97/12853) titulada "Dimer-Selective RXR Modulators and Methods for Their Use". Todos los materiales se adquirieron de Ligand Pharmaceuticals Inc.

Síntesis de 6-etinil-1,1,4,4-tetrametil-7-propoxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno:

Oxicloruro de fósforo (0,234 gramos, 0,142 ml, 1,52 mmoles) se añadió gota a gota a dimetil formamida (DMF) (4 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó durante 30 minutos. La 1-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il)etanonona se añadió rápidamente (en una porción) a la solución de color naranja, la solución de reacción se calentó a 60°C y se agitó durante 12 horas. La solución de color marrón oscuro obtenida se vertió en agua con hielo y la capa acuosa se ajustó a pH 7 con hidrógeno carbonato sódico sólido. La extracción con acetato de etilo produjo el producto en bruto, el clorenal (6-[1-hidroxi,2-cloro-etenil]-1,1,4,4-tetrametil-7-propoxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno), 0,128 gramos, en forma de un aceite de color naranja/marrón. Una solución del clorenal en dioxano:agua (3:2; 5 ml) se añadió a una solución de NaOH (0,061 gramos, 1,52 mmoles) en dioxano:H₂O (3:2; 20 ml), a 80°C, y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, para dar una solución de reacción de color naranja. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en salmuera y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para proporcionar un aceite de color naranja que se purificó mediante cromatografía radial (10:1 hexano:acetato de etilo) para dar el producto 6-etinil-1,1,4,4-tetrametil-7-propoxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (39%) en forma de un aceite de color amarillo [¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): d 7,38 (s, 1H, Ar-H), 6,76 (s, 1 H, Ar-H), 3,98 (t, J = 6,6 Hz, 2H, OCH₃), 3,19 (s, 1H, CH), 1,83 (m, 2H, CH₂), 1,66 (m, 2H, 2CH₂), 1,26 (s, 6H, 2CH₃), 1,23 (s, 6H, 2CH₃), 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃)].

Síntesis de 3-(3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametilnaftalen-2-il) propionitrilo:

Bromuro de etilmagnesio (3,33 ml de una solución 1,0 M en THF, 3,32 mmoles) se añadió gota a gota a una solución a temperatura ambiente del éter acetilénico (6-etinil-1,1,4,4-tetrametil-7-propoxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (0,450 gramos, 1,66 mmoles) en THF (10 ml). La solución se calentó a reflujo durante 6 horas y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió cianato de fenilo (0,40 gramos, 0,50 ml, 3,33 mmoles) (neto) a la solución de reacción y se continuó el reflujo durante 2 horas adicionales. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con una solución saturada de cloruro de amonio. El tratamiento final acuoso seguido de cromatografía radial (20:1 hexanos:EtOAc) produjo el producto 3-(5,5,8,8-tetrametil-3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-propionitrilo (80%) en forma de un sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): d 7,44 (s, 1H, Ar-H), 6,78 (s, 1H, Ar-H), 3,97 (t, J = 6,5 Hz, 2H, OCH₂), 1,83 (m, 2H, CH₂), 1,67 (m, 2H, 2CH₂), 1,27 (s, 6H, 2CH₃), 1,24 (s, 6H, 2CH₃), 1,03 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CH₃).

Síntesis de 3-(3-propoxi-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)but-2-enonitrilo:

Un matraz secado a la llama se cargó con una suspensión de yoduro de cobre (I) (0,057 gramos, 0,298 mmoles) en THF (5 ml) y la mezcla se agitó a 0°C en atmósfera de nitrógeno. Metil litio (0,43 ml de una solución 1,4 M en, 0,596 mmoles) se añadió gota a gota para dar una solución incolora. La solución se enfrió a -78°C y produjo un color amarillo/marrón. El acetileno nitrilo 3-(5,5,8,8-tetrametil-3-propoxi-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)propionitrilo (0,040 gramos, 0,135 mmoles) en THF (3,0 ml) se añadió gota a gota y la solución se agitó a -78°C durante 45 minutos y a continuación se inactivó con metanol (5 ml). Un tratamiento final acuoso produjo el cis-alqueno nitrilo 3-(3-propoxi-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)but-2-enonitrilo (97%) en forma de un aceite de color amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): d 7,19 (s, 1H, Ar-H), 6,78 (s, 1H, Ar-H), 5,35 (s, 1H, olefínico), 3,92 (t, J = 6,4 Hz, 2H, OCH₂), 2,27 (s, 3H, CH₃), 1,79 (m, 2H, CH₂), 1,67 (s, 2H, 2CH₂), 1,28 (s, 6H, 2CH₃), 1,27 (s, 6H, 2CH₃), 1,02 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃).

Síntesis de ácido (2E,4E,6Z)-7-3-[propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-2-il]-3-metilocta-2,4,6-trienoico]:

Un matraz de fondo redondo equipado con un burbujeador de N₂, tabiques separadores, y una barra agitadora se cargó con una solución de 3-(3-propoxi-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-but-2-enonitrilo con aductos de hexanos (5 ml) y tolueno (5ml), y se enfrió a continuación a -78°C. DIBAL (3,71 ml de una solución 1,0 M en tolueno, 5,6 mmoles) se añadió gota a gota mediante una jeringa a la solución que se agitó a continuación durante 1,5 horas a -78°C, se inactivó con una solución de tartrato de sodio y potasio (10 ml) y se calentó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La capa acuosa se acidificó (HCl 1,0 M a pH = 4) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron (sulfato sódico), se filtraron y se concentraron para dar el cis-alquenoil, cis-3-(3-propoxi-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)but-2-enal en forma de un aceite de color amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): d 9,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H, CHO), 6,99 (s, 1H, Ar-H), 6,79 (s, 1H, Ar-H), 6,09 (s, J = 8,4 Hz, 1H, olefínico), 3,90 (t, J = 6,5 Hz, 2H, OCH₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,76 (m, 2H, CH₂), 1,68 (s, 2H, 2CH₂), 1,3 (s, 6H, 2CH₃), 1,24 (s, 6H, 2CH₃), 1,00 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃).

Un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con un burbujeador de nitrógeno, tabiques separadores, y una barra agitadora se cargó a continuación con una solución de 3-etoxicarbonil-2-metil-prop-2-enil fosfonato de dietilo (0,417 gramos, 1,58 mmoles, 0,39 ml) en THF (2,0 ml) y 1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU, 0,7 ml). La solución se enfrió a -78°C, y n-butil litio (0,96 ml de una solución 1,5 M en hexanos, 1,44 mmoles) se añadió gota a gota mediante una jeringa. La mezcla de reacción se calentó a 0°C y se agitó durante 15 minutos. La solución resultante se enfrió a continuación a -78°C y cis-3-(3-propoxi-5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il) but-2-enal (1,31 mmoles) se añadió gota a gota mediante una cánula. La solución se calentó a temperatura ambiente. Después de agitar durante 1,5 horas, la reacción se interrumpió con agua (15 ml), y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con CuSO₄ acuoso, agua, y salmuera, se secaron en sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un éster en bruto, éster etílico del ácido (2E,4E,6Z)-7-3[-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-2-il]-3-metil-octa-2,4,6-trienoico. El éster en bruto se hidrolizó con KOH (exceso) en metanol (7 ml) a la temperatura de reflujo y se inactivó con HCl 1 M (5 ml). La solución se concentró, se diluyó con agua (10 ml) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre NaSO₄, se filtraron, se concentraron, se purificaron mediante cromatografía radial seguida de TLC preparativa en gel de sílice para dar ácido (2E,4E,6Z)-7-3[-propoxi-5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalen-2-il]-3-metilocta-2,4,6-trienoico en forma de un sólido de color amarillo pálido; punto de fusión 177-179°C; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,95 (s, 1H, Ar-H), 6,79 (s, 1H, Ar-H), 6,62 (dd, J = 15,3, 11,0 Hz, 1H, olefínico), 6,22 (d ancho appp, 2H, 2* olefínico), 5,76 (s, 1H, olefínico), 3,89 (t, J = 6,5 Hz, 2H, OCH₂), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,13 (s, 3H, 2CH₃) 1,77 (m, 2H, CH₂), 1,68 (s, 4H, 2CH₂), 1,30 (s, 6H, 2CH₃), 1,23 (s, 6H, 2CH₃), 1,01 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃).

Síntesis del antagonista de RAR+RXR ácido 4-[5H-2,3-(2,5-Dimetil-2,5-Hexano)5-Metil-8-nitrodibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il]Benzoico [designado HX 531]:

La síntesis del antagonista de RAR+RXR HX531 se realizó en base al procedimiento descrito por Masyuki Ebisawa et al., Chem. Pharm. Bull., 47 (12): 1778-1786 (1999).

Síntesis de 2,5-Dimetil-2,5-hexanodiol:

Soluciones de peróxido de hidrógeno (1,05 moles) y sulfato ferroso (1 mol y 1 mol de ácido sulfúrico) se añadieron de forma simultánea y equivalente a una solución acuosa de alcohol t-butílico (285 ml o 3 moles en 800 ml de agua que contenía 23 ml de ácido sulfúrico) a 30°C. De este modo se aisló un rendimiento de 36% de productos semi-sólido que poseía un olor similar al alcanfor. El producto 2,5-dimetil-2,5-hexanodiol se purificó mediante secado y recristalización (EtOAc) (punto de fusión (pdf.): 85-87°C).

Síntesis de 2,5-dicloro-2,5-dimetilhexano:

La síntesis se realizó como se ha descrito anteriormente [Mayr, H., et al., Chem. Ber. 124: 203, 1999]. 2,5-Dimetil-2,5-hexanodiol (73,1 gramos, 0,500 moles) se agitó con HCl acuoso al 37% (250 ml) durante 1 hora. La mezcla inicialmente homogénea precipitó para dar un producto cristalino. El producto se extrajo con 600 ml de éter de petróleo y se secó con CaCl₂. La evaporación del disolvente produjo 81,9 gramos (89%) de un sólido RMN-espectroscópicamente puro, que se recristalizó a partir de éter de petróleo (punto de fusión: 68-68,5°C) en forma de 2,5-dicloro-2,5-dimetilhexano.

Síntesis de 6-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftaleno:

Un matraz de fondo redondo de 200 ml equipado con una barra agitadora y un condensador de reflujo se cargó con una solución de bromobenceno (109 mmoles, 17 ml) y 2,5-dicloro-2,5-dimetilhexano (10 gramos, 54,6 mmoles) en diclorometano (30 ml). Cloruro de aluminio (1,45 gramos, 10,9 mmoles) se añadió a la solución lentamente, hasta que el reflujo espontáneo remite. Después de agitar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se vertió en agua con hielo (30 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (5 x 20 ml). La capa orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró, para dar un producto 6-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftaleno.

Una mezcla de 6-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftaleno (30 gramos, 110 mmoles), carbonato potásico (56,1 gramos, 41 mmoles) y yoduro de cobre (4,53 gramos) en o-xileno (300 ml) se calentó a 150°C durante 14 horas. Después de la retirada del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc: n-hexano 1:100) para dar el producto 2-nitro-1-amino-[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftalen]-benceno en forma de placas de color rojo (n-hexano) (36,09 gramos, rendimiento 82% del producto del título, punto de fusión: 118°C).

Una solución de 2-nitro-1-amino-[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftalen]-benceno (500 mg, 1,54 mmoles) en DMF (10 ml) se añadió a una suspensión de NaOH (60%, 92 mg, 2,31 mmoles) en DMF (1 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos, seguido de adición de yoduro de metilo (0,5 ml) y agitación adicional durante 1 hora. Después de la retirada del disolvente, el residuo se recogió en agua, y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre MgSO₄. La retirada del disolvente al vacío dio un producto en bruto 2-nitro-1-

metilamino-[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil-naftalen]benceno (543 mg).

2-Nitro-1-metilamino-[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil-naftalen]benceno (540 mg, 1,53 mmoles) se disolvió en 20 ml de etanol, y se hidrogenó sobre alcohol etílico al 10% (55 mg) durante 1 hora. Después del filtrado y la retirada del disolvente, el residuo se cromatografió sobre gel de sílice (EtOAc: n-hexano 1:8) para dar 2-amino-1-metilamino-[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil-naftalen]benceno como producto.

Cloruro de éster monometílico de ácido tereftálico (381 mg, 1,91 mmoles) se añadió a una solución de 2-amino-1-metilamino-[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil-naftalen]benceno (420 mg, 1,3 mmoles) en benceno (10 ml) y piridina (2 ml). La mezcla se agitó durante 4 horas, a continuación se vertió en ácido clorhídrico 2 N, y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó y a continuación se purificó sobre gel de sílice (EtOAc:n-hexano 1:8) para dar el producto 2-[éster metílico del ácido amido-4-benzoico]-1-metil-amino[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil-naftalen]-Benceno (631 mg).

Una solución de 2-[éster metílico del ácido amido-4-benzoico]-1-metil-amino[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil-naftalen]-Benceno (630 mg, 1,30 mmoles) en diclorometano se añadió a ácido polifosfórico (6,0 gramos) y la mezcla se calentó a 110°C durante 18 horas. Después de enfriar, se añadió agua a la reacción y el producto se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc:n-hexano 1:6) para dar el producto 2-[éster metílico del ácido amido-4-benzoico]-1-metilamino[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftalen]4-nitrobenceno (104 gramos).

KNO₃ (73 mg, 0,72 mmoles) se añadió a una solución de 2-[éster metílico del ácido amido-4-benzoico]-1-metilamino[1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametilnaftalen]4-nitrobenceno (200 mg, 0,44 mmoles) en ácido sulfúrico (12 ml) a 0°C. Después de 2,5 horas, la mezcla se vertió en agua con hielo y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó sucesivamente con NaHCO₃ 1 N, agua y salmuera, y se secó sobre MgSO₄. Después de la evaporación, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (EtOAc:n-hexano 1:8) para dar 4-(5H-2,3-(2,5-dimetil-2,5-hexano)-5-metil-8-nitrodibenzo[b,e] [1,4]diazepin-11-il)benzoato de metilo (100 mg, 45,5%) y el producto se recuperó (84 mg). Este compuesto se hidrolizó en condiciones básicas (NaOH/EtOH 2 N) de la siguiente manera:

Síntesis de ácido 4-(5H-2,3-(2,5-dimetil-2,5-hexano)-5-metil-8-nitrodibenzo[b,e][1,4] diazepin-11-il)benzoico:

Una solución de éster metílico del ácido (5H-2,3-(2,5-dimetil-2,5-hexano)-5-metil-8-nitrobenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il]benzoico (84 mg) en etanol (4 ml) y NaOH 2 N (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se vertió en ácido clorhídrico 2 N, y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio. Después de la evaporación, el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (diclorometano:metanol 20:1, a continuación 8:1) para dar el producto ácido 4-(5H-2,3-(2,5-dimetil-2,5-hexano)-5-metil-8-nitrodibenzo[b,e][1,4]diazepin-11-il)benzoico, o HX531.

Suplementación con antagonistas de RXR, RAR y RAR+RXR de cultivos de células madre/progenitoras hematopoyéticas ex vivo:

Los cultivos se prepararon y se mantuvieron como se ha descrito anteriormente. Antagonistas de RXR, RAR, o RAR+RXR se añadieron a algunos cultivos a concentraciones que variaban entre 10⁻⁴ M y 10⁻⁹ M (100 μM y 10⁻³ M], concentraciones que corresponden a concentraciones de dilución de 1550 μg/l a 0,155 μg/l]. El antagonista se añadió durante un periodo de tiempo limitado, predeterminado, durante hasta tres semanas o de forma continua durante todo el periodo de cultivo.

Todos los demás procedimientos incluyendo recogida y purificación de la fracción de células mononucleares, purificación de células CD34⁺ a partir de fracciones de células mononucleares, expansión ex vivo de poblaciones CD34^{+/+}, evaluación morfológica, análisis de antígeno de superficie, determinación de la expresión de CD34 y otro marcador hematopoyético y cálculos de la población celular se realizaron como se describe en la sección de métodos experimentales del Ejemplo 1.

Resultados Experimentales

Efectos comparativos de antagonistas de RAR, RXR y RAR+RXR y una combinación de antagonistas de RAR y RXR sobre la expansión ex vivo de células madre y progenitoras en cultivo:

Cultivos enriquecidos en células CD34⁺ se iniciaron en presencia de una combinación de 4 citoquinas (TPO, FLT3, IL-6 e IL-3), con y sin diferentes concentraciones de los siguientes antagonistas: (i) un antagonista del receptor de ácido retinoico (RAR) AGN 194310, (ii) un antagonista del receptor de retinoides X (RXR) LGD 100754 y (iii) una combinación del antagonista de RAR AGN 194310 y el antagonista de RXR LGD 100754. Tres y cinco semanas después de la siembra inicial, el porcentaje de células que portan el marcador CD34⁺ (que se considera que son en su mayoría células progenitoras comprometidas), así como el porcentaje de células que portan los marcadores

CD34⁺/CD38⁻ y CD34⁺Lin⁻ (que se considera que representan el compartimento de células madre y progenitoras tempranas) se evaluaron mediante análisis FACS.

Los datos obtenidos de recuentos de población celular, recuentos de CFU y análisis FACS se ilustran en las Figuras 12a-b y 13a-e. Los resultados muestran que, aunque el antagonista de RXR no tiene actividad y el antagonista de RAR ejerce una actividad moderada cuando se suplementaba a los medios de cultivo a una concentración de 10⁻⁷ M y junto con la citoquina IL-3 (acelerador de la diferenciación celular), el tratamiento con la combinación de antagonistas de RAR y RXR dio como resultado niveles sustancialmente más altos de CFU, células CD34⁺, células CD34⁺/38⁻, y células CD34⁺/Lin⁻, en comparación con el control (citoquinas solamente), el tratamiento con antagonista de RAR, y el tratamiento con antagonista de RXR. Claramente, la combinación de antagonistas de RAR y RXR ejerce un efecto sinérgico sobre la expansión *ex vivo* de células madre/progenitoras.

En un experimento adicional, cultivos enriquecidos en células CD34⁺ se iniciaron en presencia de una combinación de 4 citoquinas (TPO, FLT3, IL-6 e IL-3), con y sin el antagonista de RAR+RXR HX-531 (es decir, antagonista de receptores de ácido retinoico y retinoide X) (10⁻⁶ M; Peso molecular = 483). Los niveles de CFU y células CD34⁺ se determinaron 3, 7, 9 y 11 semanas después de la siembra inicial.

Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Tiempo después de la siembra (semanas)	CONTROL (citoquinas solamente)		ANTAGONISTA DE RAR+RXR HX-531 (10 ⁻⁵ M)	
	CFU (x 10 ³)	CD34 ⁺ (x10 ⁴)	CFU (x 10 ³)	CD34 ⁺ (x10 ⁴)
3	2256	181	1920(120 mezclado)	167
5	1338	46	8542	1636
9	307	0	36557	4977
11	0	0	67338	4055

Estos resultados indican que el antagonista de RAR+RXR permite preferiblemente la marcada proliferación, aunque diferenciación limitada del compartimento de células madre, por lo tanto afecta directamente a la expansión de muchas veces de células madre/progenitoras durante el periodo de cultivo a corto y largo plazo.

EJEMPLO 4

Síntesis del antagonista del receptor de la Vitamina D (VDR) 1 alfa, 25-(OH)2D3-26,23-lactona:

La síntesis de los cuatro diastereoisómeros de 1 alfa, 25-(OH) 2D3-26,23-lactona puede realizarse como se describe en Ishizuka, S. et. al, Archives of Biochemistry and Biophysics 242: 82,1985, o de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Síntesis de 4-yodo-2-Metil-Butirato de Metilo:

A una suspensión de litio en 2 ml de éter (seco) en un chorro de nitrógeno, se le añadió gota a gota una solución de bromuro de fenilo en 3 ml de éter. La mezcla de reacción se calentó hasta que se consiguió la completa disolución del litio. Una solución de yoduro de metileno en éter se preparó en un chorro de argón y se enfrió a -78°C. La solución de fenil litio se añadió gota a gota a esta solución mediante una jeringa durante 0,5 horas, y una solución de R)-(+)-3-bromo-2-metilpropionato de metilo en éter (5 ml) se añadió a continuación a ésta. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a 25°C. A continuación se añadió DMSO (7 ml) y el éter se evaporó. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a 100°C.

Síntesis de (1 alfa, 3 Beta, 5E,7E,20R,1'E)-1,3-bis-(terc-butildimetilsililoxi)-20-Metil (2-Metil,1'-Heptenilato)-9,10-secopregna-5,7,10,(19)-trieno:

A una suspensión de metal litio en 2 ml de éter seco, se le añadió gota a gota una solución de bromuro de fenilo en 3 ml de éter seco, en atmósfera de nitrógeno. Se observó una reacción exotérmica durante la disolución del metal litio. La mezcla de reacción se calentó hasta que se consiguió la completa disolución del metal litio.

Trifenilfosfina al 99% (1,447 gramos, 5,52 mmoles) y DMSO se añadieron a la solución de reacción de 4-yodo-2-metil-butirato de metilo descrita anteriormente y la mezcla resultante se calentó a 100°C durante 18 horas. La mezcla se enfrió a continuación a -30°C en atmósfera de nitrógeno, y la solución de fenil litio en éter se añadió a ésta.

Esta mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 hora y seguidamente se añadió una solución en hexano del

aldehído CLP-8 Beta,5E,7E,20R,1'E)-1,3-bis-(terc-butildimetilsililoxi)-9,10-secopregna-5,7,10,(19)-trieno-aldehído. La mezcla obtenida se agitó a 100°C durante una noche. El éter y el hexano se destilaron seguidamente, la mezcla de reacción se enfrió a 60°C y 50 ml de acetato de etilo en 75 ml de agua se añadieron a ésta. La capa orgánica se separó, se lavó con 25 ml de agua y salmuera y se secó sobre sulfato sódico. El disolvente orgánico se evaporó a presión reducida y el residuo se secó a alto vacío y se purificó en columna de gel de sílice (60 gramos) con una mezcla de hexano-EtOAc (98:2) como eluyente, para obtener 60 mg del producto (1 alfa, 3 Beta, 5E,7E,20R,1'E)-1,3-bis-(terc-butildimetilsililoxi)-20-(2-metil,1'heptenilato)-9,10-secopregna-5,7,10,(19)-trieno.

Síntesis de (1 alfa, 3 beta, 5E,7E,20R,1'E)-1,3-bis-(terc-butildimetilsililoxi)-20-(ácido 2-metil-2-hidroxi-1'heptenoico)-9,10-secopregna-5,7,10,(19)-trieno:

(1 alfa, 3 Beta, 5E,7E,20R,1'E)-1,3-bis-(terc-butildimetilsililoxi)-20-(2-metil-1'-heptenilato)-9,10-secopregna-5,7,10,(19)-trieno (60 mg) se disolvió en 3 ml de THF y la solución se enfrió a -78°C en un chorro de argón. LiN(iPr)₂ se añadió a la mezcla de reacción, para obtener el derivado de litio, que se hizo reaccionar además con oxígeno durante 1 hora a -78°C. A continuación se añadió trifenilfosfina y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. La mezcla de reacción resultante se evaporó a continuación al vacío. Una solución de KOH en metanol se añadió al residuo y la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 2,5 horas y seguidamente se diluyó con 0,5 ml de HCl 1 N, y se evaporó al vacío. El residuo se disolvió en cloroformo y el producto se purificó sobre placa de gel de sílice (20 x 20), usando una mezcla de 97:3 hexano-acetato de etilo (2 veces) como eluyente, para obtener 6,3 mg del producto como la fracción 2 (R_f = 0,81).

El producto obtenido se trató a continuación con una solución de 15,2 mg de yodo en 2 ml de cloruro de metileno, en presencia de piridina (12 mg) y la mezcla de reacción se evaporó al vacío y seguidamente en alto vacío. El residuo se disolvió con THF y n-Bu₃SnH (29,1 mg) se añadió a ésta. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y se evaporó seguidamente al vacío.

El residuo se trató con cantidades catalíticas de HCl en metanol a 50°C durante 5 horas. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se purificó sobre placa de TLC de gel de sílice (20 x 20) usando una mezcla de 95:5 cloroformo-metanol como eluyente, para obtener 2,64 mg del producto deseado ácido 9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trien-26-oico, 1,3,23,25-tetrahidroxi-gamma-lactona o (23S,25R)-1 alfa,25-DihidroxivitaminaD3-26,23-lactona, como fracción 1 (R_f = 0,4); FAB-MS: Calculado 426,60, Descubierto 426,88.

EJEMPLO 5

EFEECTO DE LA NICOTINAMIDA SOBRE LA EXPANSIÓN EX-VIVO DE CÉLULAS MADRE/PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Suplementación con nicotinamida de cultivos de células madre/progenitoras hematopoyéticas:

Los cultivos se prepararon y se mantuvieron como se ha descrito anteriormente. Se añadió nicotinamida a cultivos celulares a concentraciones de 1,5 o 10 mM durante un periodo de cultivo de hasta tres semanas. Todos los demás procedimientos incluyendo recogida y purificación de la fracción de células mononucleares, purificación de células CD34⁺ a partir de fracciones de células mononucleares, expansión *ex vivo* de poblaciones de células madre/progenitoras, evaluación morfológica, análisis de antígeno de superficie, la determinación de la expresión de CD34, CD38, Lin y otro marcador hematopoyético y los cálculos de la población de células se realizaron como se describe en la sección de métodos experimentales descritos para el Ejemplo 1.

Resultados Experimentales

Efectos de nicotinamida sobre la expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas:

Los cultivos de células CD34⁺ hematopoyéticas se iniciaron en presencia de una combinación de 5 citoquinas, SCF, TPO, FLT3, IL-6 e IL-3, con o sin diferentes concentraciones de nicotinamida. Después de un periodo de incubación de tres semanas, las células CD34⁺ se re-seleccionaron a partir de cultivo mediante un método de re-purificación por afinidad y se enumeraron. Los resultados, presentados en la Figura 14, muestran que los cultivos suplementados con nicotinamida 1 y 5 mM produjeron 99 x 10⁴ y 180 x 10⁴ células CD34⁺ por ml, respectivamente, en comparación con solamente 35 x 10⁴ células CD34⁺ por ml en el control no tratado (citoquinas solamente). Además, la fracción de células CD34⁺ reseleccionadas se analizó mediante FACS en busca de marcadores de células madre/progenitoras. Los resultados, presentados en las Figuras 15-17 y 18a-b, muestran aumentos sustanciales en la proporción de células CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/Lin⁻ y CD34⁺/(HLA-DR38⁻) en cultivos tratados con nicotinamida. La Figura 15 muestra que los cultivos suplementados con nicotinamida 1 y 5 mM dieron como resultado un aumento de 1,7 y 51,7 veces, respectivamente, de la densidad de células CD34⁺/CD38⁻, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente). La Figura 16 muestra que los cultivos suplementados con nicotinamida 1 y 5 mM dieron como resultado un aumento de 10,5 y 205,5 veces, respectivamente, de la densidad de células CD34⁺/Lin⁻, en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente). La Figura 17 muestra que los cultivos suplementados con nicotinamida 5 mM dieron como resultado un aumento de 11,5 veces de la densidad de células CD34⁺/(HLA-

DR38-), en comparación con el control no tratado (citoquinas solamente). Por lo tanto, se descubrió que la nicotinamida era un agente muy eficaz para promover la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras.

5 En un experimento adicional, los cultivos se trataron con nicotinamida 5 y 10 mM. La Tabla 5 a continuación presenta los resultados obtenidos, que demuestran adicionalmente el potente efecto de nicotinamida sobre la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras tempranas.

Tabla 5

Tratamiento	% de CD34⁺/CD38⁻ de células totales	% de CD34⁺/Lin⁻ de células totales
Control	1,69	0,02
Nicotinamida (5 mM)	9,69	4,11
Nicotinamida (10 mM)	34,67	16,58

10 Se aprecia que algunas características de la invención, que, por motivos de claridad, se describen en el contexto de diferentes realizaciones, también pueden proporcionarse combinadas en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que están, por brevedad, descritas en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

15 Aunque la invención se ha descrito junto con sus realizaciones específicas, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Además, la citación o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

20

REFERENCIAS MENCIONADAS

(En el texto se mencionan referencias adicionales)

- 5 1. Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*. 1995; 83: 859-86
2. Mangelsdorf D, Evans R. The RXR and orphan receptors. *Cell*. 1995; 83: 841-850
3. Minucci S. y Pelicci P. G. Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection. *Semin Cell Dev Biol*. 1999; 10 (2): 215-25.
- 10 4. Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, 1988; 332: 850-53
5. Ishikawa T, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Aburatani H, Stanger BZ, Shibasaki Y, Imawari M, Evans RM, Takaku F. A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol. Endocrin.* 1990; 4: 837-44
- 15 6. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 1990; 345: 224-29
7. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes and Devel*. 1992; 6: 329-44
- 20 8. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*. 1991; 66 (3): 555-61.
9. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*. 1992; 68: 397-406
10. Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, et al. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature*. 1992; 355: 359-61
- 25 11. Levin M. S., y Davis A. E. Retinoic acid increases cellular retinol-binding protein II mRNA and retinol uptake in the human intestinal Caco-2 cell line. *J. Nutr*. 1997; 127: 13-17
12. Suruga K, Mochizuki K, Suzuki R, Goda T, y Takase S. Regulation of cellular retinol-binding protein type II gene expression by arachidonic acid analogue and 9-cis retinoic acid in Caco-2 cells. *Eur. J. Biochem*. 1999; 262: 70-78
- 30 13. Kliewer, SA., Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, y Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathway through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992; 358: 771-774.
- 35 14. Siegenthaler G. Extra- and intracellular transport of retinoids: a reappraisal. *Horm Res*. 1996; 45: 122-127
15. Sherman MI, Gubler ML, Barkai U, Harper MI, Coppola G, Yuan J. Role of retinoids in differentiation and growth of embryonal carcinoma cells. *Ciba Found Symp*. 1985 ; 113: 42-60.
16. Herdick M, Steinmeyer A, Carlberg C. Carboxylic ester antagonists of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D (3) show cell-specific actions. *Chem Biol*. 2000; 7: 885-94.
- 40 17. Jimenez-Lara AM, Aranda A. Interaction of vitamin D and retinoid receptors on regulation of gene expression. *Horm Res*. 2000; 54: 301-5
18. Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor super family. *Science*. 1988; 240: 889-895.
19. Breitman T, Selonick S, Collins S. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77: 2936-2940.
- 45 20. Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin c-kit+ Sca-1+) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors. *Blood*. 1999; 94: 483-495.
21. Louise E. Purton, Irwin D. Bernstein, and Steven J. Collins, All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood*. 2000; 95: 470-477
- 50 22. Muramatsu M, Hanazono Y, Ogasawara Y, Okada T, Mizukami H, Kume A, Mizoguchi H, Ozawa K. Reversible integration of the domain negative retinoid receptor gene for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 891-6
23. Patente de Estados Unidos N° 5.830.760. creating novel hematopoietic cell lines by expressing altered retinoic acid receptors.
- 55 24. Kapil M., Teresa M., Taghi M., Michael A., Steven C., Maher A.. Involvement of retinoic acid receptor mediated signaling pathway in induction of CD38 cell surface antigen, *Blood*. 1997; 89: 3607-3614
25. Ueno H, Kizaki M, Matsushita H, Muto A, Yamato K, Nishihara T, Hida T, Yoshimura H, Koeffler HP, Ikeda Y. A novel retinoic acid receptor (RAR)-selective antagonist inhibits differentiation and apoptosis of HL-60 cells: implications of RAR alpha-mediated signals in myeloid leukemic cells. *Leuk Res*. 1998 ; 22: 517-25
- 60 26. Johnson AT, Wang L, Standeven AM, Escobar M, Chandraratna RA. Synthesis and biological activity of high-affinity retinoic acid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem*. 1999; 7 (7): 1321-38.
27. Endo Y. "Dicarba-closo-dodecaboranes as a pharmacophore. Retinoid antagonists and potential agonists". *Chem Pharm Bull*. 1999; 47 (3): 398-404.
- 65 28. Drayson MT, Michell RH, Durham J, Brown G. Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid. *Exp Cell Res*. 2001; 266 (1): 126-34

29. Gudas, LJ, Sporn, MB, & Roberts, AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: The retinoids: biology, chemistry and medicine. 1994: 443 516.
30. Wolbach, SB & Howe, PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. J Exp Med 1925, 42: 753 777.
- 5 31. De The, H, Marchino, A, Tiollais, P, & Dejean, A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and genes. EMBO J 1989, 8: 429 433
32. De The, H, Vivanco Ruiz, M, Tiollais, P, Stunnenberg, H, & Dejean, A. Identification of retinoic responsive element in the retinoic acid receptor gene. Nature. 1990; 343: 177 180.
- 10 33. Nervi, C, Vollberg, TM, George, MD, Zelent, A, Chambon, P, & Jetten, AM. Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. Exp Cell Res. 1991; 195: 163 170.
34. Swisshelm, K, Ryan, K, Lee, X, Tsou, HC, Peacocke, M, y Sager, R. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. Cell Growth Differ. 1994; 5: 133 141
- 15 35. Caliaro, MJ, Marmouget, C, & Guichard, S. Response of four ovarian carcinoma cell lines to all-trans retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression. Int J Cancer 1994, 56: 743 748.
36. Comerci, JT, Hallam, S, Goldberg, GL, Runowcz, CD, Fields, AL, Wadler, S, & Gallagher, RE. Expression of retinoic acid receptor- β mRNA in normal cervical epithelium and cervical squamous cell carcinoma. Int J Oncology 1997, 11 : 983 988.
- 20 37. Xu, XC, Ro, JY, Lee, JS, Shin, DM, Hong, WK, y Lotan, R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant and malignant head and neck tissues. Cancer Res 1994; 54: 3580 3587
38. Labrecque J., et al. Impaired granulocytic differentiation *in vitro* in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors α 1 and γ Blood 1998; 92: 607-615.
- 25 39. Douer D, Ramezani L, Parker J, Levine AM. All-trans-retinoic acid affects the growth, differentiation and apoptosis of normal human myeloid progenitors derived from purified CD34+ bone marrow cells. Leukemia. 2000; 14: 874-881.
40. Morosetti R, Grignai F, Liberatore C, et al. Infrequent alterations of the RAR gene in acute myelogenous leukemias, retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemias, myelodysplastic syndromes and cell lines. Blood 1996; 87: 4399-4403.
- 30 41. Purton LE, Bernstein ID, y Collins SJ. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. Blood. 2000; 95 (2): 470-477.
42. Douer D, Ramezani L, Parker J, Levine AM. All-trans-retinoic acid affects the growth, differentiation and apoptosis of normal human myeloid progenitors derived from purified CD34+ bone marrow cells. Leukemia. 2000; 14: 874-881
- 35 43. Kamei Y, Kawada T, Mizukami J, Sugimoto E. The prevention of adipose differentiation of 3T3-L1 cells caused by retinoic acid is elicited through retinoic acid receptor α . Life Sci. 1994; 55 (16): PL307-12
44. Van Epps DE, et al. Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. Blood Cells 20: 411, 1994.
- 40 45. Emerson SG. Ex-vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. Blood 87: 3082, 1996.
46. Brugger W, et al. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *in vivo*. N Engl J Med 333: 283, 1995.
47. Williams SF, et al. Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. Blood 87: 1687, 1996.
- 45 48. Zimmerman RM, et al. Large-scale selection of CD34+ peripheral blood progenitors and expansion of neutrophil precursors for clinical applications. J Heamatotherapy 5: 247, 1996.
49. Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. Blood 82: 378, 1993.
- 50 50. Lebkowski JS, et al. Rapid isolation and serum-free expansion of human CD34+ cells. Blood Cells 20: 404, 1994.
51. Sandstrom CE, et al. Effects of CD34+ cell selection and perfusion on *ex vivo* expansion of peripheral blood mononuclear cells. Blood 86: 958, 1995.
52. Palmiter RD. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. Proc Natl Acad Sci USA 91 (4): 1219-1223, 1994.
- 55 53. Freedman AR, et al. Generation of T lymphocytes from bone marrow CD34+ cells *in vitro*. Nature Medicine 2: 46, 1996.
54. Heslop HE, et al. Long term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. Nature Medicine 2: 551, 1996.
- 60 55. Protti MP, et al. Particulate naturally processed peptides prime a cytotoxic response against human melanoma *in vitro*. Cancer Res 56: 1210, 1996.
56. Rosenberg SA, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. J Natl Cancer Inst 85: 622, 1993.
- 65 57. Bernhard H, et al. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. Cancer Res 10: 99, 1995.

58. Fisch P, et al. Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens *ex vivo* from peripheral blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol* 26: 595, 1996.
59. Siena S, et al. Massive *ex vivo* generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Expt Hematol* 23: 1463, 1996.
- 5 60. Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models. *Molecular Medicine Today*. Dec. 1997. págs. 554-561
61. Schechtez AN et al. Sickle cell anemia. En: *Molecular basis of blood diseases*. Stamatoyannaopoulos G, Nienhuis AW, Leder P and Majerus PW Eds. págs. 179-218, Sounders Philadelphia.
62. Alter BP. Fetal erythropoiesis in stress hemopoiesis. *Experimental Hematology* 7: 200, 1979.
- 10 63. Blau CA et al. Fetal hemoglobin in acute and chronic stage of erythroid expansion. *Blood* 81: 227, 1993.
64. Lala DS, Mukherjee R, Schulman IG, Koch SS, Dardashti LJ, Nadzan AM, Croston GE, Evans RM, Heyman RA. Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. *Nature*. 1996; 383: 450-3.
- 15 65. Kochhar DM, Jiang H, Penner JD, Johnson AT, Chandraratna RA. The use of a retinoid receptor antagonist in a new model to study vitamin A-dependent developmental events. *Int. J. Dev. Biol.* 1998; 42 (4): 601-8
66. Li M, Chiba H, Warot X, Messaddeq N, Gerard C, Chambon P, Metzger D. RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development*. 2001; 128 (5): 675-88.

REIVINDICACIONES

1. Un método de expansión de una población de células madre hematopoyéticas CD34+ *ex vivo*, mientras al mismo tiempo, se inhibe la diferenciación de dichas células madre *ex vivo*, comprendiendo el método:
- 5 a) cultivar dichas células madre *ex vivo* CD34+ bajo condiciones que permiten la proliferación celular, comprendiendo dichas condiciones las que proporcionan nutrientes, suero y una combinación de citoquinas incluyendo factor de células madre, trombopoyetina, ligando FLT3, IL-6 e IL-3, y
- 10 b) en el mismo medio de cultivo añadir nicotinamida en una cantidad de entre 1,0 mM a 10 mM,
- en el que dichas células son cultivadas durante un período de cultivo que da como resultado la expansión de la población de células madre hematopoyéticas CD34+ mientras se inhibe la diferenciación de dichas células madre hematopoyéticas CD34+ *ex vivo*, para producir una población expandida de células madre hematopoyéticas CD34+ con una mayor proporción de células CD34+/Lin- y CD34+/CD38- en el cultivo expandido, en comparación con las
- 15 células CD34+ cultivadas en presencia de citoquinas y nutrientes, sin nicotinamida añadida exógenamente.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células madre hematopoyéticas se obtienen de una fuente seleccionada entre el grupo constituido por: médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical de neonato.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células hematopoyéticas expandidas están caracterizadas además por una ausencia, o una expresión significativamente reducida de antígenos de superficie celular, CD3, CD61, CD19, CD33, CD14, CD15 o CD4.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha combinación de citoquinas comprende además al menos una citoquina seleccionada de entre el grupo que consiste en: interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-10, interleuquina-12 y factor de necrosis tumoral.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha combinación de citoquinas comprende además, citoquinas de acción tardía.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dichas citoquinas de acción tardía se seleccionan entre el grupo constituido por: factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, eritropoyetina, FGF, EGF, NGF, VEGF, LIF, factor de crecimiento de hepatocitos y factor
- 35 estimulador de colonias de macrófagos.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo de dichas células en presencia de dicha nicotinamida añadida exógenamente es para un período de hasta tres semanas.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, donde dichas células se cultivan en presencia de 1,0 mM de nicotinamida añadida exógenamente.
9. El método de la reivindicación 1, donde dichas células se cultivan en presencia de 5,0 mM de nicotinamida añadida exógenamente.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, donde dichas células se cultivan en presencia de 10,0 mM de nicotinamida añadida exógenamente.

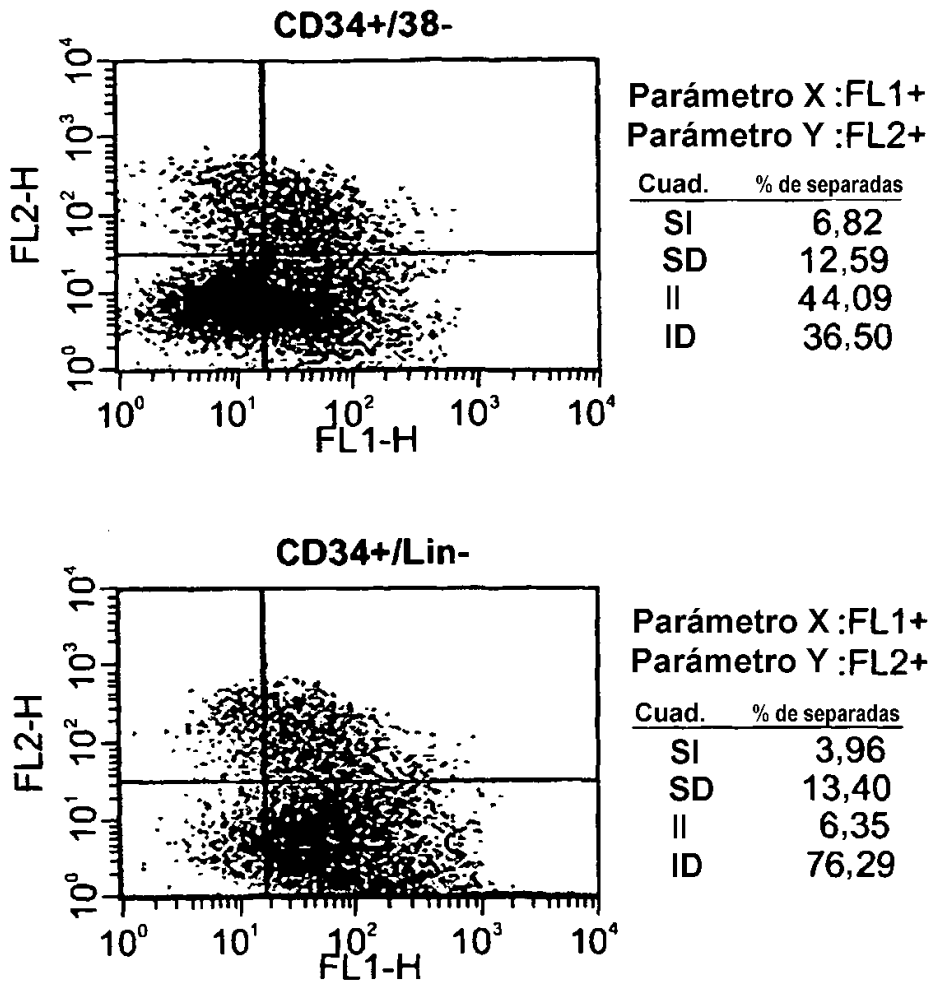


Fig. 1a

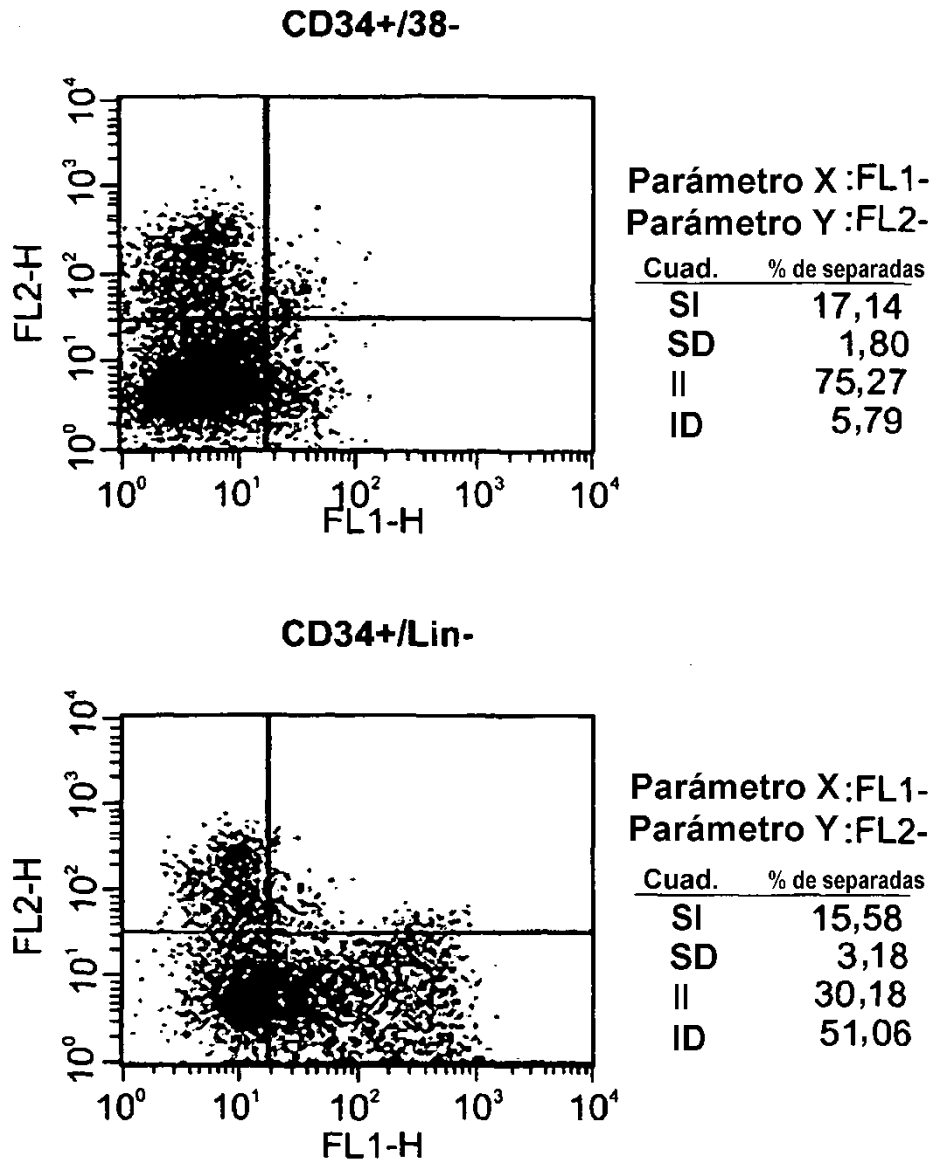


Fig. 1b

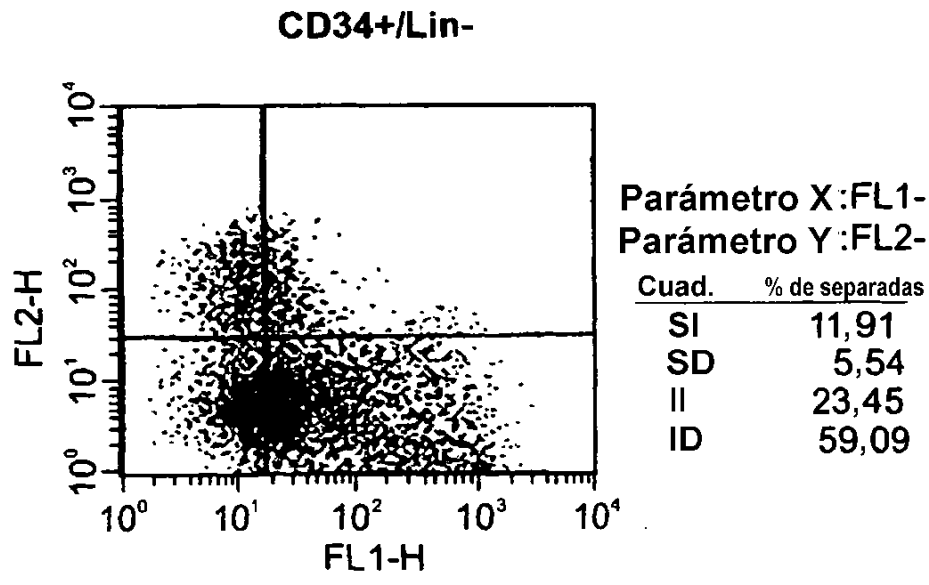
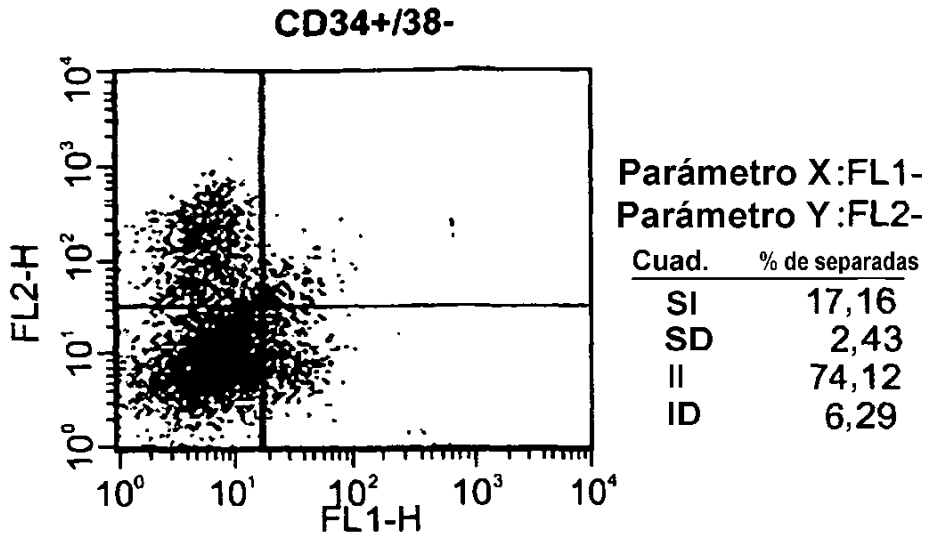


Fig. 1c

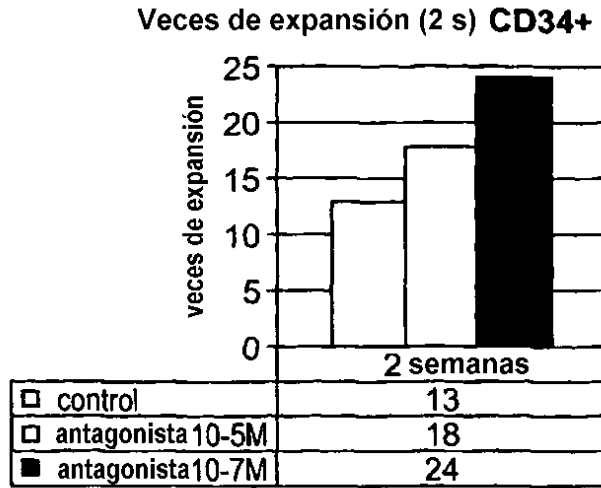


Fig. 2a

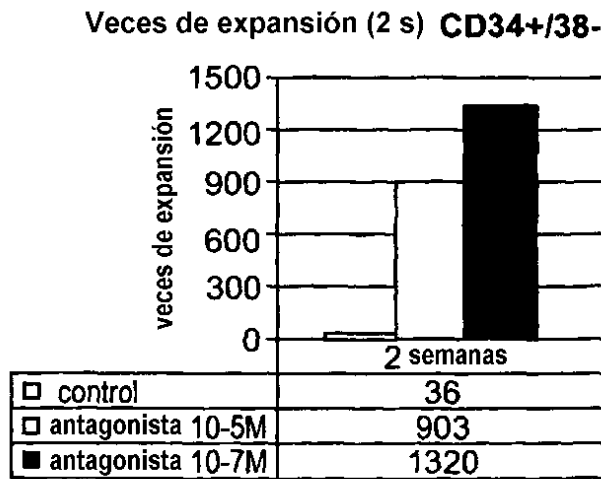


Fig. 2b

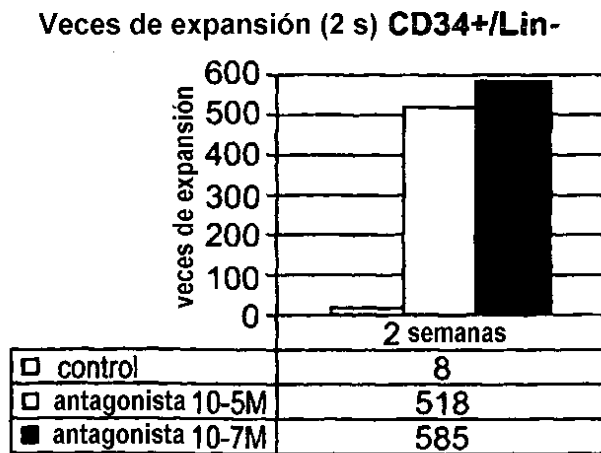


Fig. 2c

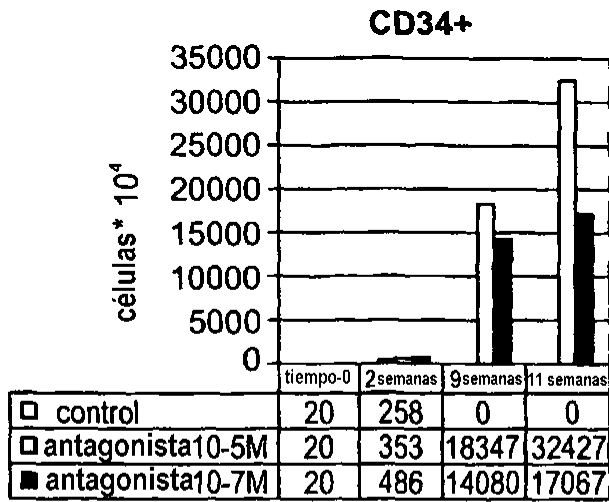


Fig. 3a

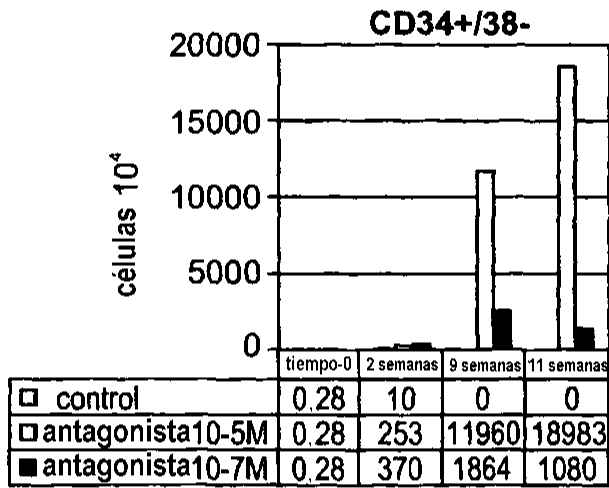


Fig. 3b

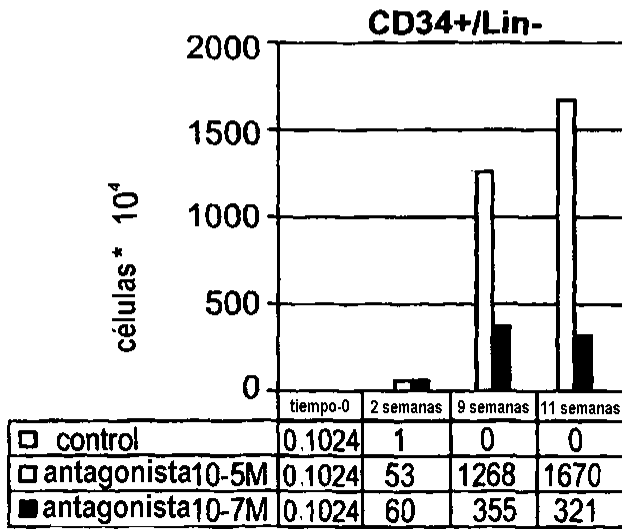


Fig. 3c

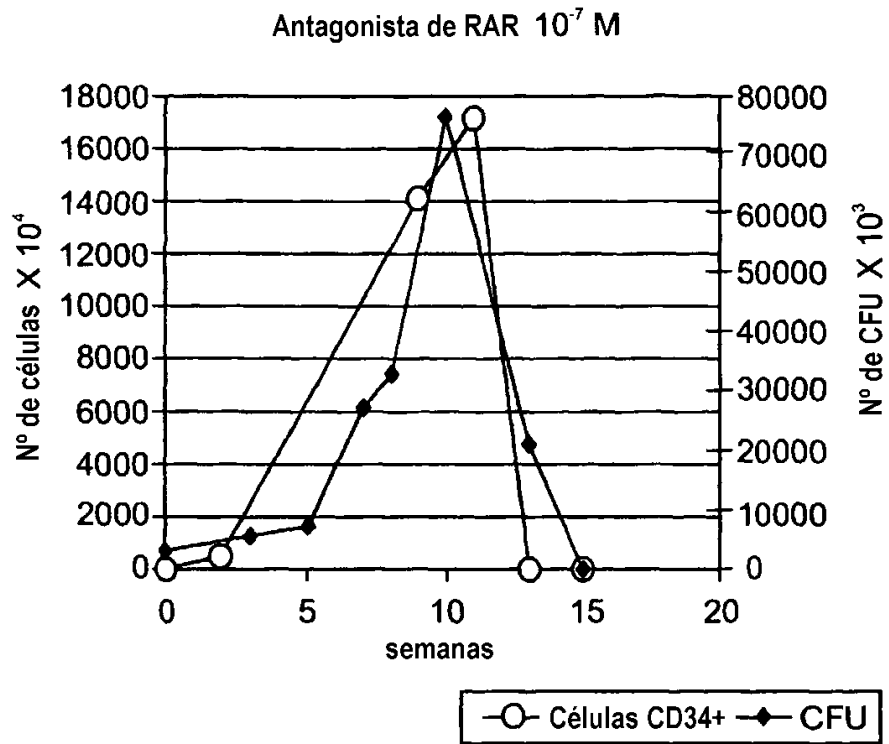
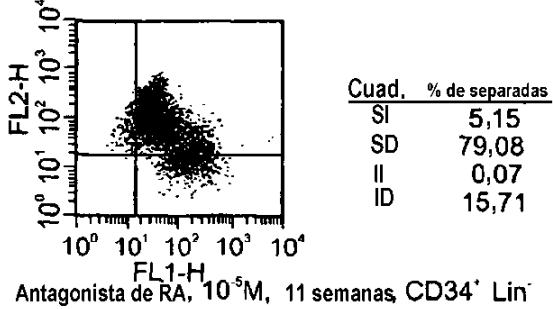
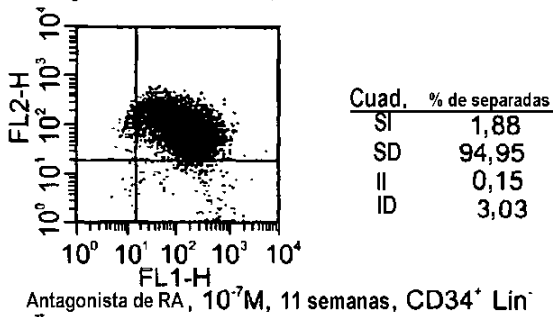
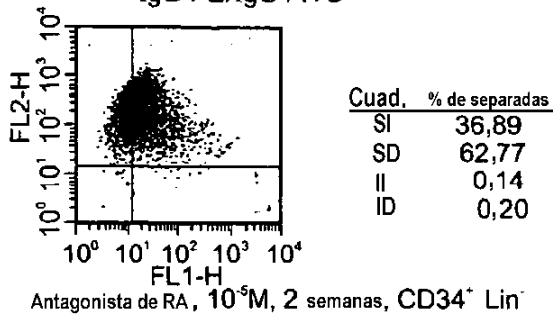
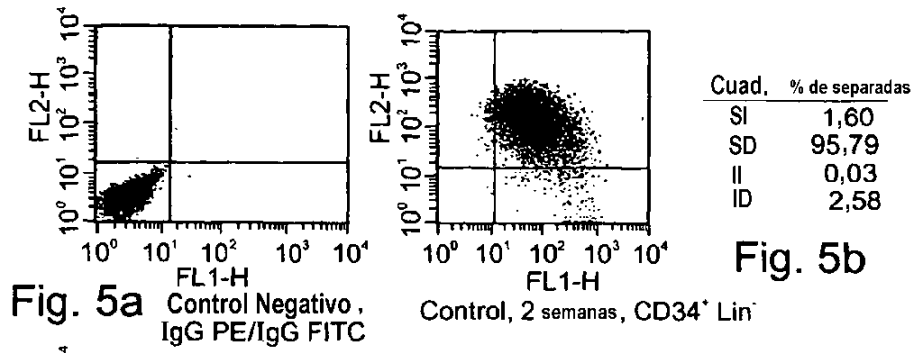


Fig. 4



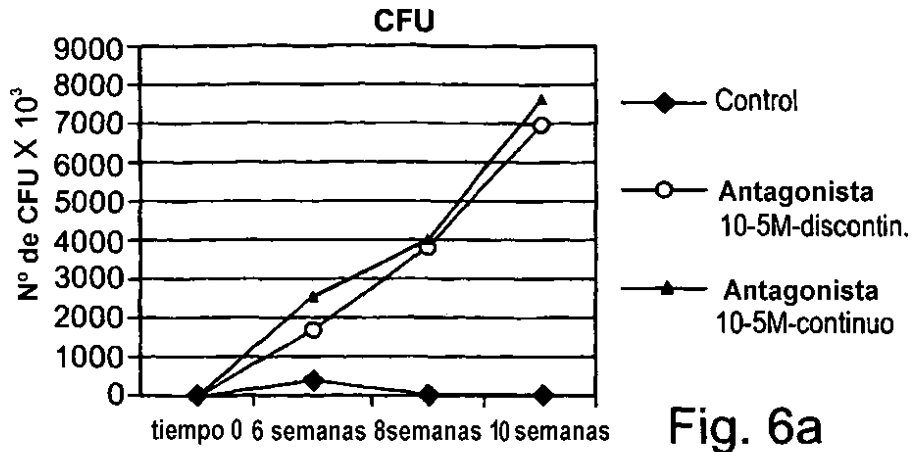


Fig. 6a

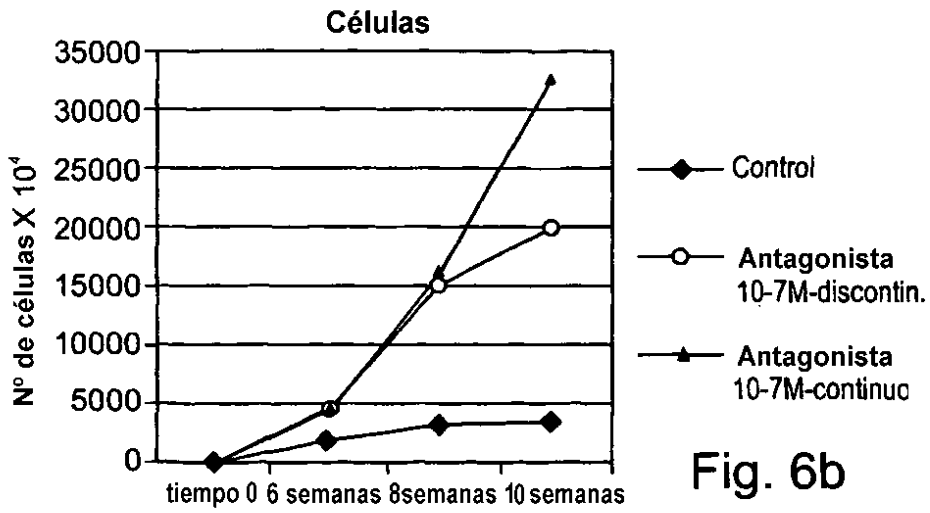


Fig. 6b

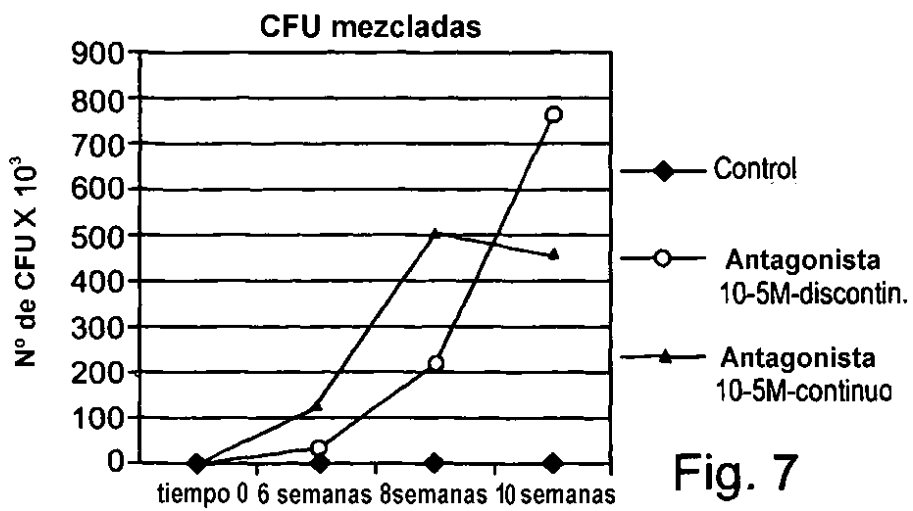


Fig. 7

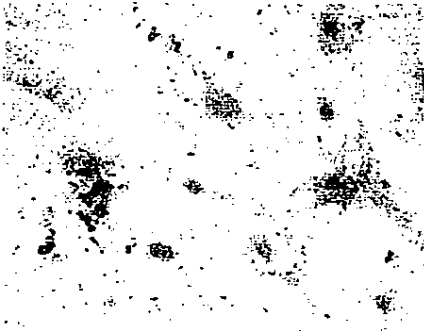


Fig. 8a

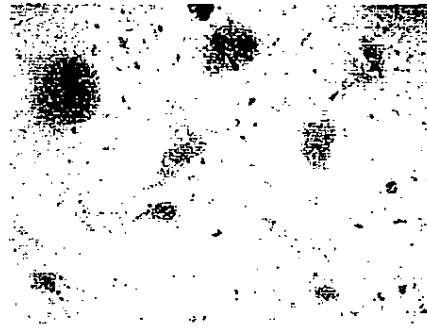


Fig. 8b

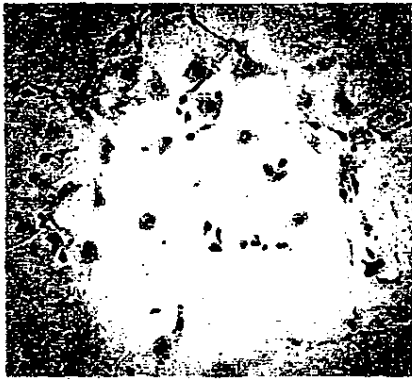


Fig. 9a

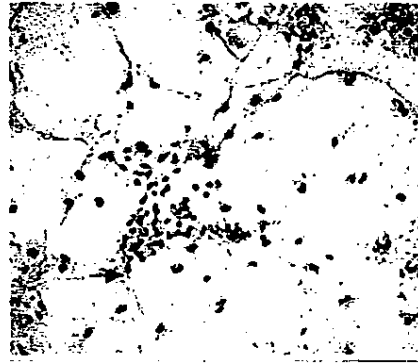


Fig. 9b



Fig. 9c



Fig. 10a

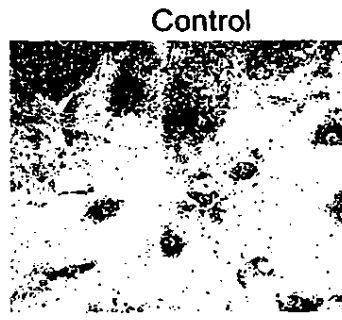


Fig. 10b

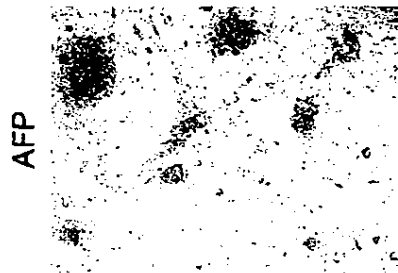


Fig. 10c



Fig. 10d

Fig. 11a



Fig. 11c

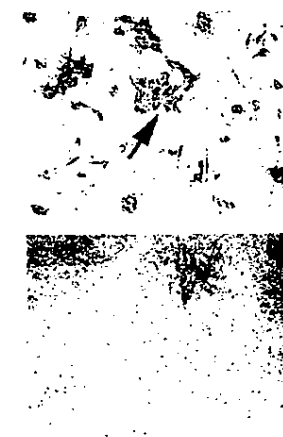


Fig. 11e

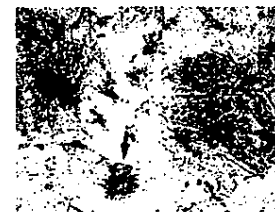
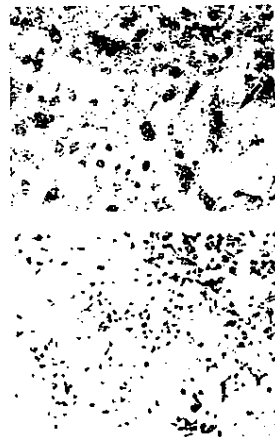


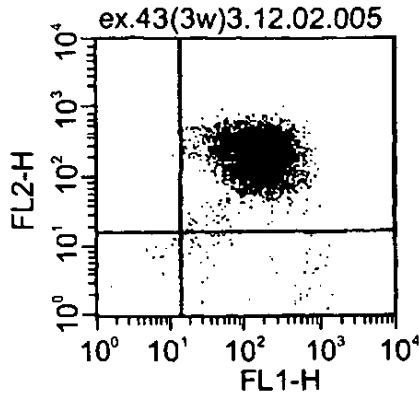
Fig. 11b

Fig. 11d

Fig. 11f

3 semanas-(análisis FACS de 34/Lin)

Solamente citoquinas de control



Archivo:ex.43(3w)3.12.02.005

ID de Muestra:

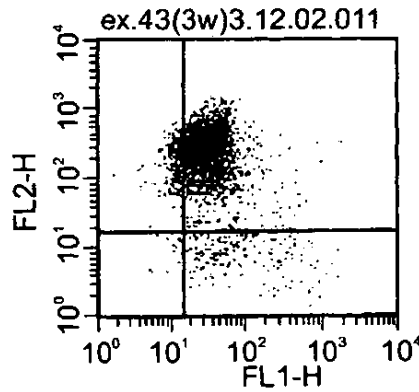
Parámetro X :FL1-H(Log)

Parámetro Y :FL2-H(Log)

Cuad. % de separadas

SI	0,04
SD	98,99
II	0,22
ID	0,75

Agonista de RAR 10-7M



Archivo:ex.43(3w)3.12.02.011

ID de Muestra:

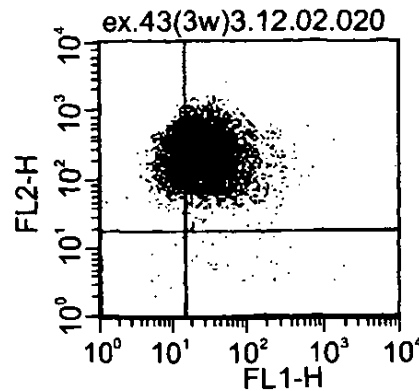
Parámetro X :FL1-H(Log)

Parámetro Y :FL2-H(Log)

Cuad. % de separadas

SI	8,19
SD	85,41
II	0,44
ID	5,96

Agonista de RAR + RXR 10-7M



Archivo:ex.43(3w)3.12.02.020

ID de Muestra:

Parámetro X :FL1-H(Log)

Parámetro Y :FL2-H(Log)

Cuad. % de separadas

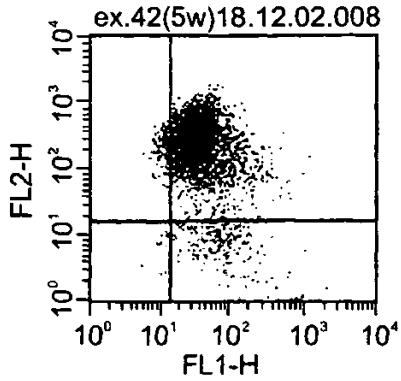
SI	19,75
SD	79,79
II	0,09
ID	0,37

Fig. 12a

5 semanas-(análisis FACS de 34/Lin)

***Control(solamente citoquinas)** - El número de células no era suficiente para el análisis FACS

Antagonista de RAR 10-7M



Archivo:ex.42(5w)18.12.02.008

ID de Muestra:

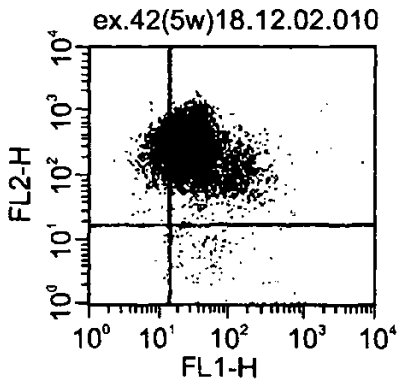
Parámetro X :FL1-H(Log)

Parámetro Y :FL2-H(Log)

Cuad. % de separadas

SI	3,19
SD	91,04
II	0,39
ID	5,37

Antagonista de RAR + RXR 10-7M



Archivo:ex.42(5w)18.12.02.010

ID de Muestra:

Parámetro X :FL1-H(Log)

Parámetro Y :FL2-H(Log)

Cuad. % de separadas

SI	17,38
SD	81,18
II	0,08
ID	1,36

Fig. 12b

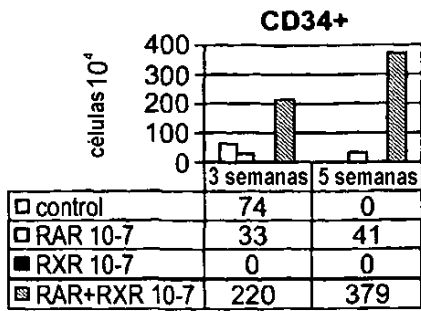


Fig. 13a

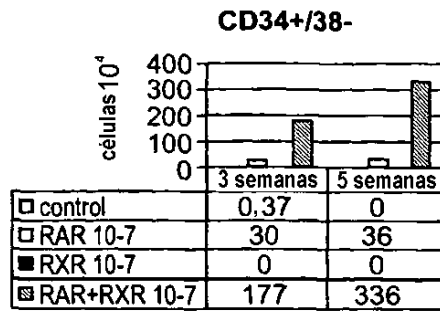


Fig. 13b

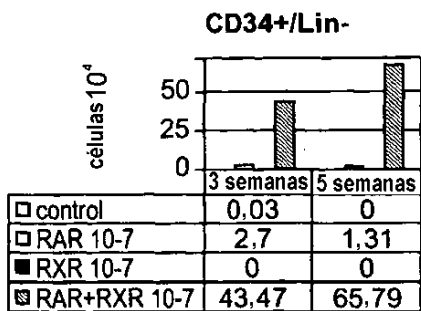


Fig. 13c

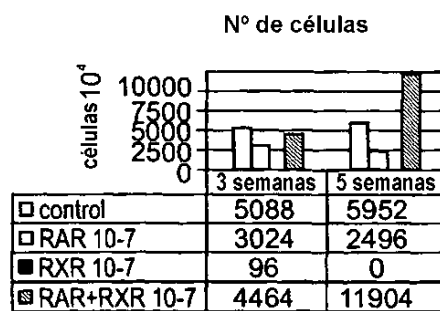


Fig. 13d

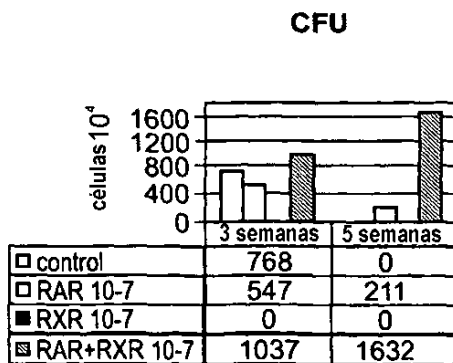


Fig. 13e

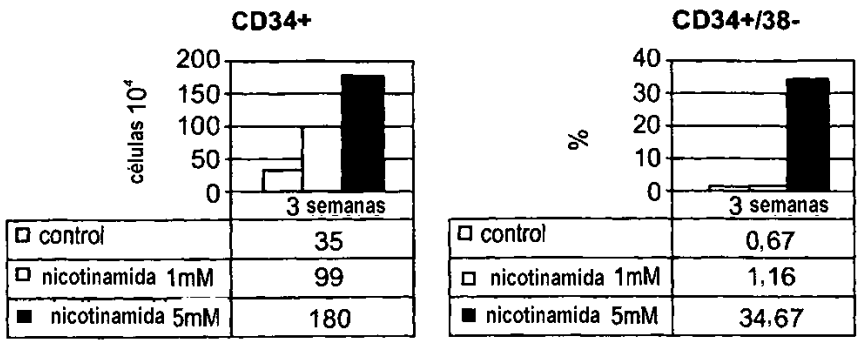


Fig. 14

Fig. 15

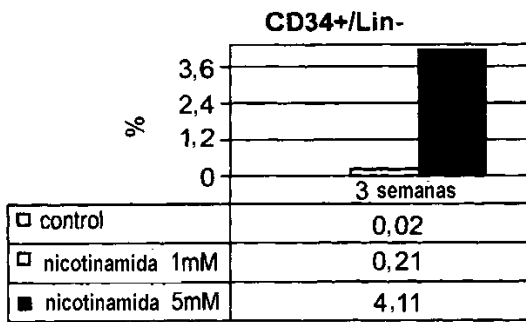


Fig. 16

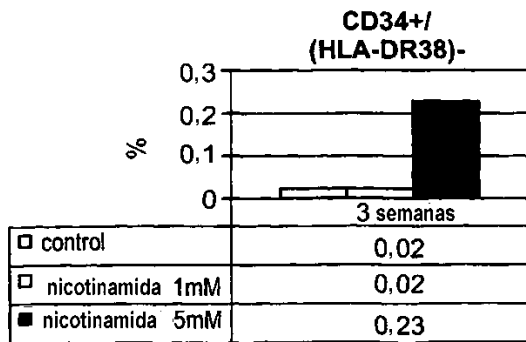
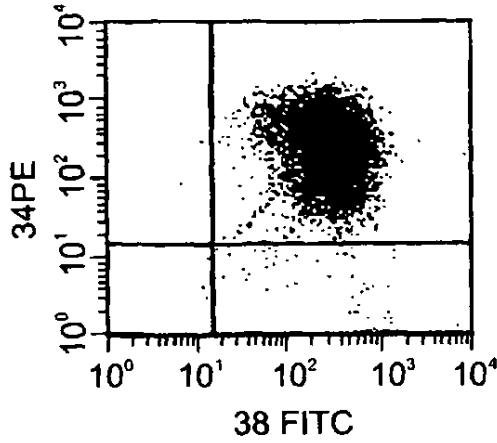


Fig. 17

Análisis FACS

34/38

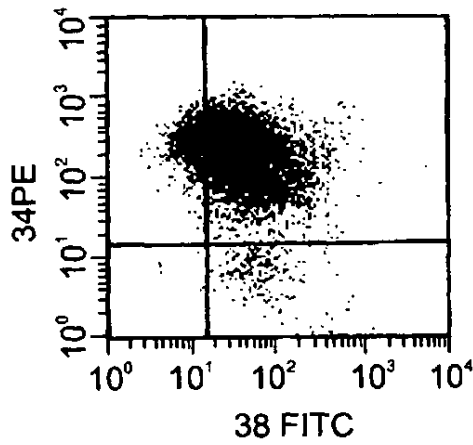
Control-citocinas solamente



Cuad. % de Separadas

SI	0,14
SD	99,44
II	0,12
ID	0,30

Nicotinamida 5 mM



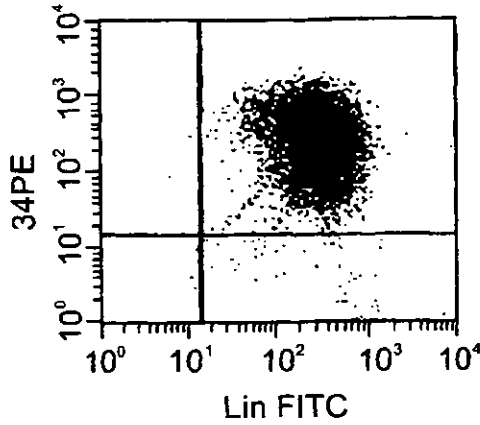
Cuad. % de Separadas

SI	34,67
SD	62,28
II	1,24
ID	1,80

Fig. 18a

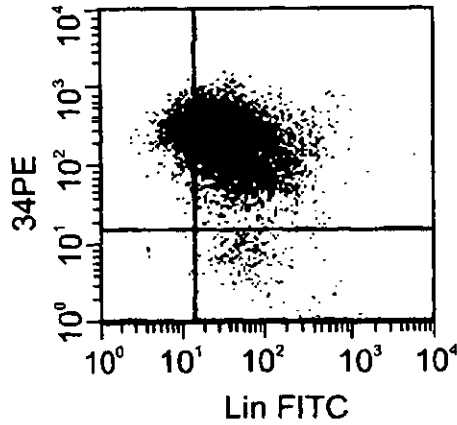
Análisis FACS:CD34/Lin

Control-citocinas solamente



Cuad.	% de Separadas
SI	0,02
SD	99,08
II	0,05
ID	0,85

Nicotinamida 5 mM



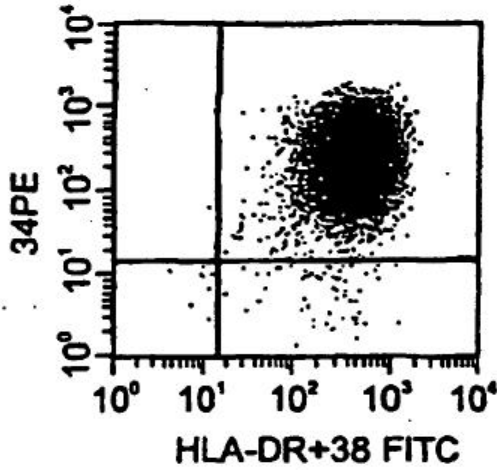
Cuad.	% de Separadas
SI	16,58
SD	80,08
II	0,05
ID	3,29

Fig. 18b

Análisis FACS: 34/HLA-DR+38

5

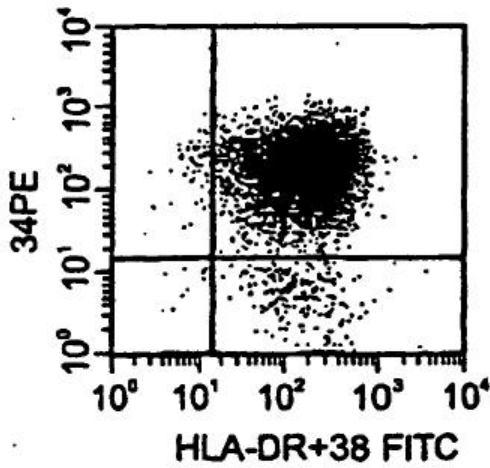
Control-citocinas solamente



Cuad. % de Separadas

UL	0.02
UR	99.02
LL	0.12
LR	0.84

Nicotinamida 5mM



Cuad. % de Separadas

UL	1.02
UR	95.43
LL	0.16
LR	3.39

Fig. 18c

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

10

- US 4036945 A [0217]
- US 4331647 A [0217]
- US 4946778 A, Ladner [0218]
- US 4816567 A [0221]
- US 5545807 A [0222]
- US 5545806 A [0222]
- US 5569825 A [0222]
- US 5625126 A [0222]
- US 5633425 A [0222]
- US 5661016 A [0222]
- US 687808 A [0235]
- US 4469863 A [0235]
- US 4476301 A [0235]
- US 5023243 A [0235]
- US 5177196 A [0235]
- US 5188897 A [0235]
- US 5264423 A [0235]
- US 5276019 A [0235]
- US 5278302 A [0235]
- US 5286717 A [0235]
- US 5321131 A [0235]
- US 5399676 A [0235]
- US 5405939 A [0235]
- US 5453496 A [0235]
- US 5455233 A [0235]
- US 5466 A [0235]
- US 677 A [0235]
- US 5476925 A [0235]
- US 5519126 A [0235]
- US 5536821 A [0235]
- US 5541306 A [0235]
- US 5550111 A [0235]
- US 5563253 A [0235]
- US 5571799 A [0235]
- US 5587361 A [0235]
- US 5625050 A [0235]
- US 5034506 A [0237]
- US 5166315 A [0237]
- US 5185444 A [0237]
- US 5214134 A [0237]
- US 5216141 A [0237]
- US 5235033 A [0237]
- US 5264562 A [0237]
- US 5264564 A [0237]
- US 5405938 A [0237]
- US 5434257 A [0237]
- US 5466677 A [0237]
- US 5470967 A [0237]
- US 5489677 A [0237]
- US 5541307 A [0237]
- US 5561225 A [0237]
- US 5596086 A [0237]
- US 5602240 A [0237]
- US 5610289 A [0237]
- US 5608046 A [0237]
- US 5618704 A [0237]
- US 5623070 A [0237]
- US 5663312 A [0237]
- US 5633360 A [0237]
- US 5677437 A [0237]
- US 5677439 A [0237]
- US 5539082 A [0238]
- US 5714331 A [0238]
- US 5719262 A [0238]
- US 6303374 B [0238] [0240]
- US 3687808 A [0239]
- US 5013830 A [0243]
- US 5149797 A [0243]
- US 5220007 A [0243]
- US 5256775 A [0243]
- US 5366878 A [0243]
- US 5403711 A [0243]
- US 5491133 A [0243]
- US 5565350 A [0243]
- US 5623065 A [0243]
- US 5652355 A [0243]
- US 5652356 A [0243]
- US 5700922 A [0243]
- US 6326174 B, Joyce [0247]
- US 5166320 A [0306]
- US 4868116 A [0309]
- US 4980286 A [0309]
- WO 8907136 A [0309]
- WO 8902468 A [0309]
- WO 8905345 A [0309]
- WO 9207573 A [0309]
- US 6190910 B [0354]
- US 4666828 A [0357]
- US 4683202 A [0357]
- US 4841531 A [0357]
- US 5192659 A [0357]
- US 5272057 A [0357]
- US 3791932 A [0357]
- US 3839153 A [0357]
- US 3850752 A [0357]
- US 3850578 A [0357]
- US 3853987 A [0357]
- US 3867517 A [0357]

- US 3879262 A [0357]
- US 3901654 A [0357]
- US 3935074 A [0357]
- US 3984533 A [0357]
- US 3996345 A [0357]
- US 4034074 A [0357]
- US 4098876 A [0357]
- US 4879219 A [0357]
- US 5011771 A [0357]
- US 5281521 A [0357]
- US 9614876 W [0415]
- WO 9712853 A [0415]
- US 5830760 A [0451]

Literatura

no patente citada en la descripción

- Madlambayan GJ et al. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, vol. 10, 481 [0003]
- Punzel M et al. *Leukemia*, 1999, vol. 13, 92 [0003]
- Lange W et al. *Leukemia*, 1996, vol. 10, 943 [0003]
- Leslie NR et al. *Blood*, 1998, vol. 92, 4798 [0003]
- Petzer AL et al. *J Exp Med*, June 1996, vol. 183, 2551 [0003]
- Kawa Y et al. *Pigment Cell Res*, 2000, vol. 8, 73 [0003]
- Howard et al. *Science*, 1993, vol. 252, 1056-1059 [0006]
- Lee et al. *Biol. Chem.*, 1999, vol. 380, 785-793 [0006] [0137]
- Sauve, A. A.; Deng, H. T.; Angelletti, R. H.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, vol. 122, 7855-7859 [0006]
- Funaro A; Malavasi F. *J Biol Regul Homeost Agents*, January 1999, vol. 13 (1), 54-61 [0007]
- Prasad GS. *nature Structural Biol*, 1996, vol. 3, 957-964 [0008]
- Clapper, D L et al. *J. Biological Chem.*, 1987, vol. 262, 9561-9568 [0009]
- Adebajo OA et al. *Nat Cell Biol*, November 1999, vol. 1 (7), 409-14 [0012]
- Galione A et al. *Science*, 1991, vol. 253, 143-146 [0013]
- Day et al. *Parasitol*, 2000, vol. 120, 417-422 [0013]
- Silva et al. *Biochem. Pharmacol*, 1998, vol. 56, 997-1003 [0013]
- Guse, A H. *Cell. Signal.*, 1999, vol. 11, 309-316 [0013]
- Sieff C; Bicknell D; Caine G; Robinson J; Lam G; Greaves MF. Changes in cell surface antigen expression during hematopoietic differentiation. *Blood*, 1982, vol. 60, 703 [0014]
- Bhatia M; Wang JCY; Kapp U; Bonnet D; Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 5320 [0014]
- Munshi CB; Graeff R; Lee HC. *J Biol Chem*, 20 December 2002, vol. 277 (51), 49453-8 [0015] [0138] [0225]
- Wick M et al. *ALTEX.*, vol. 14 (2), 51-56 [0133]
- Hino H et al. *Biochem Biophys Res Commun.*, 05 March 1999, vol. 256 (1), 184-91 [0133]
- Tateno C; Yoshizato K. *Am J Pathol.*, 1996, vol. ...
- Podesta. *FASEB J.*, 2000, vol. 14, 680-690 [0139]
- Podesta. *FASEB J.* [0139]
- Freshney. *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, 1994 [0197]
- Harlow; Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0215]
- Porter, R. R. *Biochem. J.*, 1959, vol. 73, 119-126 [0217]
- Inbar et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, 2659-62 [0218]
- Whitlow; Filpula. *Methods*, 1991, vol. 2, 97-105 [0218]
- Bird et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0218]
- Pack et al. *Bio/Technology*, 1993, vol. 11, 1271-77 [0218]
- Larrick; Fry. *Methods*, 1991, vol. 2, 106-10 [0219]
- Jones et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0220] [0221]
- Riechmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0220]
- Presta. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0220]
- Riechmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0221]
- Verhoeyen et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0221]
- Hoogenboom; Winter. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0222]
- Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0222]
- Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0222]
- Boerner et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0222]
- Marks et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0222]
- Lonberg et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0222]
- Morrison. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0222]
- Fishwild et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0222]
- Neuberger. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0222]
- Lonberg; Huszar. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0222]
- Hutvagner; Zamore. *Curr. Opin. Genetics and Development*, 2002, vol. 12, 225-232 [0225]

- The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering. John Wiley & Sons, 1990, 858-859 [0239]
- Englisch et al. *Angewandte Chemie*. 1991, vol. 30, 613 [0239]
- Sanghvi, Y. S. *Antisense Research and Applications*. CRC Press, 1993, 289-302 [0239]
- Sanghvi YS et al. *Antisense Research and Applications*. CRC Press, 1993, 276-278 [0239]
- Santoro, S.W. ; Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [0246]
- Khachigian, LM. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, vol. 4, 119-21 [0246]
- Humeau L. et al. *Blood*, 1997, vol. 90, 3496 [0273]
- Gene Therapy. *Advanced in Pharmacology*. Academic Press, 1997, vol. 40 [0283]
- Klamut et al. *Mol. Cell Biol.*, 1989, vol. 9, 2396 [0293]
- Buskin ; Hauschka. *Mol. Cell Biol.*, 1989, vol. 9, 2627 [0293]
- Mar ; Ordahl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6404 [0293]
- Mader, S. ; White, J.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5603-5607 [0295]
- Spencer, D.M. et al. *Science*, 1993, vol. 262, 1019-1024 [0295]
- Manome, Y. et al. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, 10607-10613 [0295]
- Datta, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 1014-10153 [0295]
- Seed, B. *Nature*, 1987, vol. 329, 840 [0298]
- Kaufman et al. *EMBO J*, 1987, vol. 6, 187-195 [0298]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, 1989, 9.1 [0301]
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 16.32-16.40 [0301]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, 1989, 9.2 [0302]
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 16.41-16.46 [0302]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, 1989, 9.3 [0303]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 16.54-16.55 [0303]
- Protocols can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, 1989, 9.4 [0304]
- Nicolau et al. *Meth. Enz.*, 1987, vol. 149, 157-176 [0304]
- Wang ; Huang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7851-7855 [0304]
- Brigham et al. *Am. J Med. Sci.*, 1989, vol. 298, 278 [0304]
- Gould-Fogerite et al. *Gene*, 1989, vol. 84, 429-438 [0304]
- Acsadi et al. *Nature*, 1991, vol. 332, 815-818 [0305]
- Wolff et al. *Science*, 1990, vol. 247, 1465-1468 [0305]
- Wu, G. ; Wu, C.H. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 14621 [0306]
- Wilson et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 963-967 [0306]
- Curiel et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8850 [0306]
- Cristiano et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2122-2126 [0306]
- Miller, A.D. *Blood*, 1990, vol. 76, 271 [0309]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, 1989, 9.10-9.14 [0309]
- Eglitis et al. *Science*, 1985, vol. 230, 1395-1398 [0309]
- Danosand Mulligan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6460-6464 [0309]
- Wilson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 3014-3018 [0309]
- Armentano et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6141-6145 [0309]
- Huber et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8039-8043 [0309]
- Feri et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8377-8381 [0309]
- Chowdhury et al. *Science*, 1991, vol. 254, 1802-1805 [0309]
- van Beusechem et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 7640-7644 [0309]
- Kay et al. *Human Gene Therapy*, 1992, vol. 3, 641-647 [0309]
- Dai et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10892-10895 [0309]
- Hwu et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 4104-4115 [0309]
- Berkner et al. *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 616 [0310]
- Rosenfeld et al. *Science*, 1991, vol. 252, 431-434 [0310]
- Rosenfeld et al. *Cell*, 1992, vol. 68, 143-155 [0310]
- Lemarchand et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6482-6486 [0310]
- Herz ; Gerard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2812-2816 [0310]
- Quantin et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 2581-2584 [0310]
- Haj-Ahmand ; Graham. *J. Virol*, 1986, vol. 57, 267 [0310]
- Muzyczka et al. *Curr. Topics In Micro. And Immunol.*, 1992, vol. 158, 97-129 [0311]
- Flotte et al. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1992, vol. 7, 349-356 [0311]
- Samulski et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 3822-3828 [0311]
- McLaughlin et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 62, 1963-1973 [0311]
- Tratschin et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3251-3260 [0311]
- Hermonat et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6466-6470 [0311]

- Tratschin et al. *Mol. Cell Biol.*, 1985, vol. 4, 2072-2081 [0311]
- Wondisford et al. *Mol. Endocrinol.*, 1988, vol. 2, 32-39 [0311]
- Tratschin et al. *J. Virol.*, 1984, vol. 51, 611-619 [0311]
- Flotte et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 3781-3790 [0311]
- Slavin S. et al. *J Clin Immunol*, 2002, vol. 22, 64 [0318]
- *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, vol. 11, 265 [0318]
- Gur H. et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 4174 [0318]
- Martelli MF et al. *Semin Hematol*, 2002, vol. 39, 48 [0318]
- Trounson AO. *Reprod Fertil Dev*, 2001, vol. 13, 523 [0340]
- Roach ML. *Methods Mol Biol*, 2002, vol. 185, 1 [0340]
- Smith AG. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, vol. 17, 435 [0340]
- Miraglia, S. et al. *Blood*, 1997, vol. 90, 5013 [0340]
- Uchida, N. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, 14720 [0340]
- Simmons, P.J. et al. *Blood*, 1991, vol. 78, 55 [0340]
- Prockop DJ. *Cytotherapy*, 2001, vol. 3, 393 [0340]
- Bohmer RM. *Fetal Diagn Ther*, 2002, vol. 17, 83 [0340]
- Rowley SD et al. *Bone Marrow Transplant*, 1998, vol. 21, 1253 [0340] [0347]
- Stem Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0340]
- Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Marcel Dekker, 2000 [0340]
- Koizumi K. *Bone Marrow Transplant*, 2000, vol. 26, 787 [0347]
- Petersen BE et al. *Hepatology*, 1998, vol. 27, 433 [0347]
- Pagano SF et al. *Stem Cells*, 2000, vol. 18, 295 [0347]
- Sukoyan MA. *Braz J Med Biol Res*, 2002, vol. 35 (5), 535 [0354]
- Odorico J. S. *Stem Cells*, 2001, vol. 19, 193 [0354]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 1989 [0357]
- Current Protocols in Molecular Biology. 1994, vol. I-III [0357]
- Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1989 [0357]
- Perbal. *A Practical Guide to Molecular Cloning*. John Wiley & Sons, 1988 [0357]
- Watson et al. *Recombinant DNA*. Scientific American Books [0357]
- Genome Analysis: A Laboratory Manual Series. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, vol. 1-4 [0357]
- Cell Biology: A Laboratory Handbook. 1994, vol. I-III [0357]
- Current Protocols in Immunology. 1994, vol. I-III [0357]
- Basic and Clinical Immunology. Appleton & Lange, 1994 [0357]
- Selected Methods in Cellular Immunology. W. H. Freeman and Co, 1980 [0357]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0357]
- Nucleic Acid Hybridization. 1985 [0357]
- Transcription and Translation. 1984 [0357]
- Animal Cell Culture. 1986 [0357]
- Immobilized Cells and Enzymes. IRL Press, 1986 [0357]
- Perbal, B. *A Practical Guide to Molecular Cloning*. 1984 [0357]
- Methods in Enzymology. Academic Press, vol. 1-317 [0357]
- PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications. Academic Press, 1990 [0357]
- Marshak et al. *Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*. CSHL Press, 1996 [0357]
- Muramatsu M. *Biochem Biophys Res Commun*, 27 July 2001, vol. 285 (4), 891-6 [0395]
- Schwartz RE ; Reyes M ; Koodie L ; Jiang Y ; Blackstad M ; Lund T ; Lenvik T ; Johnson S ; Hu WS ; Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.*, 2002, vol. 109 (10), 1291-302 [0402]
- Runge D ; Runge DM ; Jager D ; Lubecki KA ; Beer Stolz D ; Karathanasis S ; Kietzmann T ; Strom SC ; Jungermann K ; Fleig WE. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, vol. 269 (1), 46-53 [0402]
- Yamada T ; Yoshikawa M ; Kanda S ; Kato Y ; Nakajima Y ; Ishizaka S ; Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells*, 2002, vol. 20 (2), 146-54 [0407]
- Wick M ; Koebe HG ; Schildberg FW. *New ways in hepatocyte cultures: Cell immobilization technique ALTEX*, 1997, vol. 14 (2), 51-56 [0411]
- Hino H ; Tateno C ; Sato H ; Yamasaki C ; Katayama S ; Kohashi T ; Aratani A ; Asahara T ; Dohi K ; Yoshizato K. A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 05 March 1999, vol. 256 (1), 184-91 [0411]
- Tateno C ; Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol.*, 1996, vol. 148 (2), 383-92 [0411]
- Canan-Koch et al. *J. Med. Chem.*, vol. 39 (17), 3229-3234 [0415]

- Masyuki Ebisawa et al. *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, vol. 47 (12), 1778-1786 [0421]
- Ishizuka, S. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1985, vol. 242, 82 [0438]
- Kastner P ; Mark M ; Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?. *Cell*, 1995, vol. 83, 859-86 [0451]
- Mangelsdorf D ; Evans R. The RXR and orphan receptors. *Cell*, 1995, vol. 83, 841-850 [0451]
- Minucci S. ; Pelicci P.G. Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection. *Semin Cell Dev Biol.*, 1999, vol. 10 (2), 215-25 [0451]
- Brand N ; Petkovich M ; Krust A ; Chambon P ; de The H ; Marchio A ; Tiollais P ; Dejean A. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, 1988, vol. 332, 850-53 [0451]
- Ishikawa T ; Umesono K ; Mangelsdorf DJ ; Aburatani H ; Stanger BZ ; Shibasaki Y ; Imawari M ; Evans RM ; Takaku F. A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol. Endocrin.*, 1990, vol. 4, 837-44 [0451]
- Mangelsdorf DJ ; Ong ES ; Dyck JA ; Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, 1990, vol. 345, 224-29 [0451]
- Mangelsdorf DJ ; Borgmeyer U ; Heyman RA ; Zhou JY ; Ong ES ; Oro AE ; Kakizuka A ; Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes and Devel.*, 1992, vol. 6, 329-44 [0451]
- Mangelsdorf DJ ; Umesono K ; Kliewer SA ; Borgmeyer U ; Ong ES ; Evans RM. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*, 1991, vol. 66 (3), 555-61 [0451]
- Heyman RA ; Mangelsdorf DJ ; Dyck JA ; Stein RB ; Eichele G ; Evans RM ; Thaller C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, 1992, vol. 68, 397-406 [0451]
- Levin AA ; Sturzenbecker LJ ; Kazmer S ; Bosakowski T ; Huselton C ; Allenby G ; Speck J ; Kratzelisen C ; Rosenberger M ; Lovey A et al. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature*, 1992, vol. 355, 359-61 [0451]
- Levin M.S. ; Davis A.E. Retinoic acid increases cellular retinol-binding protein II mRNA and retinol uptake in the human intestinal Caco-2 cell line. *J. Nutr.*, 1997, vol. 127, 13-17 [0451]
- Suruga K ; Mochizuki K ; Suzuki R ; Goda T ; Takase S. Regulation of cellular retinol-binding protein type II gene expression by arachidonic acid analogue and 9-cis retinoic acid in Caco-2 cells. *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 262, 70-78 [0451]
- Kliewer, SA. ; Umesono K ; Noonan DJ ; Heyman RA ; Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathway through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 1992, vol. 358, 771-774 [0451]
- Siegenthaler G. Extra- and intracellular transport of retinoids: a reappraisal. *Horm Res.*, 1996, vol. 45, 122-127 [0451]
- Sherman MI ; Gubler ML ; Barkai U ; Harper MI ; Coppola G ; Yuan J. Role of retinoids in differentiation and growth of embryonal carcinoma cells. *Ciba Found Symp.*, 1985, vol. 113, 42-60 [0451]
- Herdick M ; Steinmeyer A ; Carlberg C. Carboxylic ester antagonists of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) show cell-specific actions. *Chem Biol.*, 2000, vol. 7, 885-94 [0451]
- Jimenez-Lara AM ; Aranda A. Interaction of vitamin D and retinoid receptors on regulation of gene expression. *Horm Res.*, 2000, vol. 54, 301-5 [0451]
- Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1988, vol. 240, 889-895 [0451]
- Breitman T ; Selonick S ; Collins S. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1980, vol. 77, 2936-2940 [0451]
- Purton LE ; Bernstein ID ; Collins SJ. All-trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin c-kit+ Sca-1+) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors. *Blood*, 1999, vol. 94, 483-495 [0451]
- Louise E. Purton ; Irwin D. Bernstein ; Steven J. Collins. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood*, 2000, vol. 95, 470-477 [0451]
- Muramatsu M ; Hanazono Y ; Ogasawara Y ; Okada T ; Mizukami H ; Kume A ; Mizoguchi H ; Ozawa K. Reversible integration of the domain negative retinoid receptor gene for ex-vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, vol. 285, 891-6 [0451]
- Kapil M. ; Teresa M. ; Taghi M. ; Michael A. ; Steven C. ; Maher A. Involvement of retinoic acid receptor mediated signaling pathway in induction of CD38 cell surface antigen. *Blood*, 1997, vol. 89, 3607-3614 [0451]
- Ueno H ; Kizaki M ; Matsushita H ; Muto A ; Yamato K ; Nishihara T ; Hida T ; Yoshimura H ; Koeffler HP ; Ikeda Y. A novel retinoic acid receptor (RAR)-selective antagonist inhibits differentiation and apoptosis of HL-60 cells: implications of RAR alpha-mediated signals in myeloid leukemic cells. *Leuk Res.*, 1998, vol. 22, 517-25 [0451]

- **Johnson AT ; Wang L ; Standeven AM ; Escobar M ; Chandraratna RA.** Synthesis and biological activity of high-affinity retinoic acid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem.*, 1999, vol. 7 (7), 1321-38 [0451]
- **Endo Y.** Dicarba-closo-dodecaboranes as a pharmacophore. Retinoid antagonists and potential agonists. *Chem Pharm Bull.*, 1999, vol. 47 (3), 398-404 [0451]
- **Drayson MT ; Michell RH ; Durham J ; Brown G.** Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid. *Exp Cell Res.*, 2001, vol. 266 (1), 126-34 [0451]
- **Gudas, LJ ; Sporn, MB ; Roberts, AB.** Cellular biology and biochemistry of the retinoids. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*, 1994, 443 516 [0451]
- **Wolbach, SB ; Howe, PR.** Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J Exp Med*, 1925, vol. 42, 753 777 [0451]
- **De The, H ; Marchino, A ; Tiollais, P ; Dejean, A.** Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and β genes. *EMBO J*, 1989, vol. 8, 429 433 [0451]
- **De The, H ; Vivanco Ruiz, M ; Tiollais, P ; Stunnenberg, H ; Dejean, A.** Identification of retinoic responsive element in the retinoic acid receptor gene. *Nature*, 1990, vol. 343, 177 180 [0451]
- **Nervi, C ; Vollberg, TM ; George, MD ; Zelent, A ; Chambon, P ; etten, AM.** Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.*, 1991, vol. 195, 163 170 [0451]
- **Swishhelm, K ; Ryan, K ; Lee, X ; Tsou, HC ; Peacocke, M ; Sager, R.** Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ.*, 1994, vol. 5, 133 141 [0451]
- **Caliaro, MJ ; Marmouget, C ; Guichard, S.** Response of four ovarian carcinoma cell lines to all-trans retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression. *Int J Cancer*, 1994, vol. 56, 743 748 [0451]
- **Comerci, JT ; Hallam, S ; Goldberg, GL ; Runowcz, CD ; Fields, AL ; Wadler, S ; Gallagher, RE.** Expression of retinoic acid receptor- β 2 mRNA in normal cervical epithelium and cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncology*, 1997, vol. 11, 983 988 [0451]
- **Xu, XC ; Ro, JY ; Lee, JS ; Shin, DM ; Hong, WK ; Lotan, R.** Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant and malignant head and neck tissues. *Cancer Res*, 1994, vol. 54, 3580-3587 [0451]
- **Labrecque J. et al.** Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha I and gamma. *Blood*, 1998, vol. 92, 607-615 [0451]
- **Douer D ; Ramezani L ; Parker J ; Levine AM.** All-trans-retinoic acid affects the growth, differentiation and apoptosis of normal human myeloid progenitors derived from purified CD34+ bone marrow cells. *Leukemia*, 2000, vol. 14, 874-881 [0451]
- **Morosetti R ; Grignani F ; Liberatore C et al.** Infrequent alterations of the RAR gene in acute myelogenous leukemias, retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemias, myelodysplastic syndromes and cell lines. *Blood*, 1996, vol. 87, 4399-4403 [0451]
- **Purton LE ; Bernstein ID ; Collins SJ.** All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood*, 2000, vol. 95 (2), 470-477 [0451]
- **Kamei Y ; Kawada T ; Mizukami J ; Sugimoto E.** The prevention of adipose differentiation of 3T3-L1 cells caused by retinoic acid is elicited through retinoic acid receptor alpha. *Life Sci.*, 1994, vol. 55 (16), PL307-12 [0451]
- **Van Epps DE et al.** Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells*, 1994, vol. 20, 411 [0451]
- **Emerson SG.** Ex-vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. *Blood*, 1996, vol. 87, 3082 [0451]
- **Brugger W et al.** Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated in-vivo. *N Eng J Med*, 1995, vol. 333, 283 [0451]
- **Williams SF et al.** Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood*, 1996, vol. 87, 1687 [0451]
- **Zimmerman RM et al.** Large-scale selection of CD34+ peripheral blood progenitors and expansion of neutrophil precursors for clinical applications. *J Hematotherapy*, 1996, vol. 5, 247 [0451]
- **Koller MR ; Emerson SG ; Palsson BO.** Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood*, 1993, vol. 82, 378 [0451]
- **Lebkowski JS et al.** Rapid isolation and serum-free expansion of human CD34+ cells. *Blood Cells*, 1994, vol. 20, 404 [0451]
- **Sandstrom CE et al.** Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex-vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 1995, vol. 86, 958 [0451]

- **Palmiter RD.** Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91 (4), 1219-1223 [0451]
- **Freedman AR et al.** Generation of T lymphocytes from bone marrow CD34+ cells in-vitro. *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 46 [0451]
- **Heslop HE et al.** Long term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 551 [0451]
- **Protti MP et al.** Particulate naturally processed peptides prime a cytotoxic response against human melanoma in-vitro. *Cancer Res*, 1996, vol. 56, 1210 [0451]
- **Rosenberg SA et al.** Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993, vol. 85, 622 [0451]
- **Bernhard H et al.** Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res*, 1995, vol. 10, 99 [0451]
- **Fisch P et al.** Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens ex-vivo from peripheral blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol*, 1996, vol. 26, 595 [0451]
- **Siena S et al.** Massive ex-vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Expt Hematol*, 1996, vol. 23, 1463 [0451]
- **Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models.** *Molecular Medicine Today*, December 1997, 554-561 [0451]
- **Sickle cell anemia. Schechtez AN et al.** Molecular basis of blood diseases. *Stamatoyannaopoulos*. 179-218 [0451]
- **Alter BP.** Fetal erythropoiesis in stress hemopoiesis. *Experimental Hematology*, 1979, vol. 7, 200 [0451]
- **Biau CA et al.** Fetal hemoglobin in acute and chronic stage of erythroid expansion. *Blood*, 1993, vol. 81, 227 [0451]
- **Lala DS ; Mukherjee R ; Schulman IG ; Koch SS ; Dardashti LJ ; Nadzan AM ; Croston GE ; Evans RM ; Heyman RA.** Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. *Nature*, 1996, vol. 383, 450-3 [0451]
- **Kochhar DM ; Jiang H ; Penner JD ; Johnson AT ; Chandraratna RA.** The use of a retinoid receptor antagonist in a new model to study vitamin A-dependent developmental events. *Int. J. Dev. Biol.*, 1998, vol. 42 (4), 601-8 [0451]
- **Li M ; Chiba H ; Warot X ; Messaddeq N ; Gerard C ; Chambon P ; Metzger D.** RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development*, 2001, vol. 128 (5), 675-88 [0451]