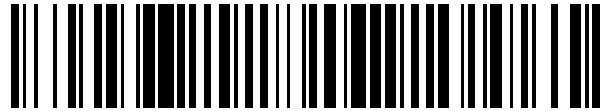


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 128**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2006 E 06821601 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1974012**

54 Título: **Procedimientos de mejora de anidamiento e injerto de células madre**

30 Prioridad:

29.11.2005 US 289004

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.06.2013

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 409 128 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

Procedimientos de mejora de anidamiento e injerto de células madre

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para mejorar la eficacia de anidamiento, retención e injerto de células trasplantadas.

El trasplante de médula ósea (TMO) es un procedimiento clínico en el que células hematopoyéticas pluripotentes obtenidas de la médula ósea se trasplantan en un paciente. El TMO es el tratamiento de elección en diversos trastornos hematológicos, incluyendo tumores malignos, Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID, por las siglas de su denominación en inglés *Severe Combined Immune Deficiencies*), anomalías hematopoyéticas congénita o genéticamente determinadas, anemia, anemia aplásica, leucemia y osteoporosis.

10 Las células madre hematopoyéticas primitivas o pluripotentes normalmente residen en la médula ósea, aunque la sangre del cordón umbilical es otra fuente funcional de células madre/progenitoras hematopoyéticas trasplantables (Gluckman, E., y col 1989 N. Engl. J. Med. 321: 1174). Todas estas células hematopoyéticas primitivas pueden identificarse por su antígeno CD34 de superficie. Las células madre hematopoyéticas se diferencian a lo largo de una de dos rutas principales – bien en células madre linfoides o en células madre mieloides. Ambas se diferencian posteriormente en células progenitoras para cada tipo de célula sanguínea madura. Estas células progenitoras han perdido la capacidad de auto regenerarse y están comprometidas con una línea celular determinada. Por tanto, las células madre linfoides se diferencian en linfocitos T o B progenitores y las células madre mieloides se diferencian en células progenitoras de eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos y plaquetas.

20 En condiciones de estado de equilibrio estacionario, la mayoría de las células progenitoras y células madre hematopoyéticas residen en la médula ósea y solo algunas de estas células pueden detectarse en la sangre periférica. Sin embargo, las células madre pueden movilizarse en la sangre periférica por tratamiento con agentes mielosupresores y/o determinados factores de crecimiento hematopoyéticos. Estudios realizados han demostrado que las células madre de sangre periférica (CMSP) infundidas en un hospedador presentan un potencial mejorado para el injerto en comparación con las células progenitoras y células madre derivadas de la médula ósea. Por tanto, las CMSP movilizadas por quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyéticos o una combinación de estas modalidades se usan actualmente en entornos de trasplante tanto autólogo como no autólogo [Anderlini, P. y Korblyng, M. (1997) Stem. Cells 15, 9-17]. En el caso de un trasplante no autólogo, los donantes de las células madre son individuos sanos y el procedimiento para movilizar las células madre en la corriente sanguínea debe conseguirse con una mínima molestia. En este caso, se prefiere la movilización de las células madre con factores de crecimiento hematopoyéticos a la movilización con fármacos antiblásticos (es decir ciclofosfamida).

35 Además de células madre y progenitoras, para el trasplante pueden usarse células más diferenciadas, para el tratamiento de enfermedades o afecciones de órganos específicos o de tejidos caracterizados por disfunción celular o muerte celular. En muchas de estas enfermedades, los procedimientos quirúrgicos o las terapias médicas actuales son inadecuados o no existen. La terapia celular puede sustituir o aumentar el tejido existente para proporcionar terapia restaurativa para estas afecciones. Como tipos de células ejemplares adecuados para trasplantes se incluyen: células derivadas de tejido neuronal, hepatocitos, miocitos, células retinales, células endocrinas, melanocitos, queratinocitos, y condrocitos. Se ha observado, tanto en modelos con animales como en estudios con seres humanos, que el injerto de células trasplantadas puede reestablecer satisfactoriamente la función tisular. Por tanto, pueden trasplantarse neuronas, por ejemplo, para la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas. Células musculares, tales como mioblastos, pueden trasplantarse, por ejemplo, para el tratamiento de miopatía cardíaca isquémica. Las células de los islotes pueden trasplantarse para tratar la diabetes y/u otras afecciones o enfermedades relacionadas con la insulina y el glucagón. También pueden trasplantarse células sanguíneas diferenciadas, tales como linfocitos y células dendríticas, por ejemplo, para inmunoterapia adoptiva con linfocitos citolíticos naturales (células NK, por las siglas de su denominación en inglés *Natural Killer*)

45 Sin embargo, estudios realizados han demostrado que la mayoría de las células trasplantadas, tales como hepatocitos y células neurales, se eliminan del organismo después del trasplante, y no se localizan en órganos o tejidos diana (De Roos y col Transplantation 1997; 63: 513-18; Gagandeep y col, Gene Therapy 1999; 6: 729-36). Esfuerzos realizados para mejorar el anidamiento, la retención y el injerto de células trasplantadas, tales como el tratamiento de hepatocitos con Con A antes del implante (Ito y col, Muscle Nerve 1998; 21: 291-7) solo han sido ligeramente eficaces. Por tanto, se han realizado esfuerzos en procedimientos para agrupar y conservar células recién preparadas (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.713.245 y 6.821.779 de Koopmans y col) para proporcionar mayores cantidades de células para el trasplante.

55 Después del trasplante, las células deben migrar hacia sus tejidos diana. Los quimioatrayentes, tales como determinadas citocinas (CXCL1-CXCL16 y CCL1-CCL-27) ayudan a conducir las células hacia su objetivo. El factor 1 α derivado de células estromales (SDF-1 α), denominado también CXCL12, es un poderoso quimioatrayente de células CD34⁺, incluyendo células madre hematopoyéticas y células madre neuronales (Aiuti J. Exp. Med. 1997; 185: 111-120) y se expresa ampliamente en muchos tejidos durante el desarrollo (McGrath Dev. Biol. 1999; 213:

442-456) y en adultos (Imai Br. J. Haematol. 1999; 106: 905-911). También atrae células no madre tales como linfocitos T. El receptor 4 de la quimiocina CXCR4, es el receptor afín del SDF-1 α y se expresa en células madre. Recientes estudios han implicado al SDF-1 α /CXCR4 como una ruta que activa programas moleculares con células madre y la migración durante lesiones (Jaime Imitola y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 28 de diciembre del 2004; 101 (52): 18117-18122).

La CD26/dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) una peptidasa extracelular unida a membrana que escinde dipéptidos, tales como SDF-1 α , desde el extremo N de las cadenas polipeptídicas después de una prolina o una alanina, es un antígeno específico no específico de línea cuya expresión en células hematopoyéticas y en otras células se regula por diferenciación y activación. La escisión proteolítica de las quimiocinas tiene implicaciones con respecto a la capacidad de las células para ser atraídas y/o activadas por quimoquinas (Baggiolini, M.. 1998, Nature 392: 565).

Diversos estudios funcionales aluden la función que desempeña la CD26/DPPIV en la migración y movilización de linfocitos T y células hematopoyéticas [Shioda y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6331]. Se demostró que la inhibición de la actividad endógena de CD26/DPPIV sobre células CD34⁺ mejoraba la respuesta quimiotáctica de estas células contra el SDF-1 α (Christopherson KW 2nd, y col., Science. 13 de agosto del 2004; 305(5686): 1000-1003; Christopherson KW 2nd, J Immunol. 15 de diciembre del 2002; 169(12): 7000-7008), mientras que el truncamiento en el extremo N del SDF-1 α con DPPIV no inducía la migración de células del cordón umbilical CD34⁺.

La nicotinamida (NA), la forma amida de la niacina (vitamina B3), es un sustrato de intercambio de bases y un fuerte inhibidor de enzimas dependientes de NAD(+) dotadas con actividades mono- y poli-ADP-ribosiltransferasa. La ribosilación del ADP está implicada en la modificación de una diversa serie de respuestas biológicas (Corda D, Di Girolamo M. 2003; 22(9): 1953-1958; Rankin PW, y col., J Biol Chem. 1989; 264: 4312-4317; Banasik M. y col., J Biol Chem. 1992; 267: 1569- 1575; Ueda K, Hayaishi O, Annu Rev Biochem. 1985; 54: 73-100; Smith S. Trends Biochem Sci. 2001; 26: 174-179; Virág L, Szabó C. Pharm. Reviews. 2002; 54: 375-429).

Las ADP ribosiltransferasas endógenas responsables de las reacciones de mono- o poli-ADP- ribosilación modifican moléculas implicadas en la señalización celular, tales como histonas núcleo (de la Cruz X, Lois S, y col., Bioessays. 2005; 27(2): 164-75), la subunidad alfa de las proteínas (G) de unión a GTP heterodiméricas, la pequeña Rho GTPasa, la actina monomérica y el factor de elongación 2 (FE-2). Estas modificaciones postraduccionales conducen a la activación o inactivación de funciones celulares moduladas por estas proteínas (Lupi R, y col., J Biol Chem. 2000; 275: 9418-9424; Lupi R, y col. Biochem J. 2002; 367: 1-7; Yau L, y col., Eur. J. Biochem. 2003; 270:101-110).

La Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0247574 explica el uso de inhibidores de CD26 para mejorar la eficacia de injertos de trasplantes de células madre mejorando tanto el anidamiento de las células madre en la médula ósea como aumentando la cantidad de células madre donantes movilizadas. Esta patente no explica la regulación negativa de la expresión en superficie de CD26 pero sí la regulación negativa de la actividad catalítica de CD26. Específicamente, la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0247574 no explica el uso de la nicotinamida para la regulación negativa de la expresión en superficie de CD26.

La Solicitud PCT IL03/00064 desvela el uso de la nicotinamida, y de otros inhibidores de CD38, para la inhibición de la diferenciación en células madre y progenitores que se expanden *ex vivo*. Sin embargo, el documento PCT IL03/00064 no explica la administración de la nicotinamida para mejorar el anidamiento, la retención y el injerto de células, o la administración de la nicotinamida a células madre y progenitoras durante intervalos cortos de tres días o menores, la administración de la nicotinamida a poblaciones de células no madre y no progenitoras (es decir comprometidas) o la administración de la nicotinamida sin facilitar condiciones de proliferación celular.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es superar los inconvenientes descritos en los tratamientos actualmente disponibles y proporcionar composiciones y procedimientos para mejorar el potencial de migración, retención y anidamiento celular de las células trasplantadas.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para mejorar el potencial de injerto celular, comprendiendo el procedimiento someter *ex vivo* o *in vitro* una población de células a una cantidad de nicotinamida durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el potencial de anidamiento e injerto celular, en el que adicionalmente el procedimiento se caracteriza al menos por uno de los siguientes aspectos:

(i) dicha población de células es una población de células madre y/o progenitoras hematopoyéticas y dicho periodo de tiempo se selecciona como insuficiente para la expansión de células madre, o en condiciones insuficientes para la expansión de células madre y/o madre;

(ii) dicha cantidad de nicotinamida y dicho periodo de tiempo se seleccionan como suficientes para regular negativamente la expresión de CD26 por las células de dicha población de células pero no para la expansión de células madre y/o progenitoras;

(iii) dicha población de células no incluye células hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas, células mononucleares, células progenitoras hepáticas en fase temprana, células progenitoras comprometidas, células madre y progenitoras no hematopoyéticas o células madre y progenitoras embrionarias;

- (iv) dicho sometimiento se realiza en ausencia de nutrientes;
- (v) dicho sometimiento se realiza en ausencia de una citocina;
- (vi) dicho sometimiento se realiza en ausencia del ligando FLT-3;
- (vii) dicho sometimiento se realiza en ausencia del factor de células madre (FCM);
- 5 (viii) dicho sometimiento se realiza en ausencia del factor estimulante de colonias de granulocitos (FECG);
- (ix) dicho sometimiento se realiza en ausencia de una citocina de acción temprana; y
- (x) dicho sometimiento se realiza en ausencia de una citocina de acción retardada.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento de trasplante de células en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- 10 (a) someter *ex vivo* una población de células que comprende las células a una cantidad de nicotinamida durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el anidamiento y el injerto en dichas células; caracterizándose adicionalmente el procedimiento al menos por uno de los siguientes aspectos:

- 15 (i) dicha población de células es una población de células madre y/o progenitoras hematopoyéticas, y dicho periodo de tiempo se selecciona como insuficiente para la expansión de células madre, o en condiciones insuficientes para la expansión de células madre y/o progenitoras;
- (ii) dicha cantidad de nicotinamida y dicho periodo de tiempo se seleccionan como suficientes para regular negativamente la expresión de CD26 por las células de dicha población de células pero no para la expansión de células madre y/o progenitoras;
- 20 (iii) dicha población de células no incluye células hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas, células mononucleares, células progenitoras hepáticas en fase temprana, células progenitoras comprometidas, células madre y progenitoras no hematopoyéticas o células madre y progenitoras embrionarias;
- (iv) dicho sometimiento se realiza en ausencia de nutrientes;
- (v) dicho sometimiento se realiza en ausencia de una citocina;
- (vi) dicho sometimiento se realiza en ausencia del ligando FLT-3;
- 25 (vii) dicho sometimiento se realiza en ausencia del factor de células madre (FCM);
- (viii) dicho sometimiento se realiza en ausencia deL factor estimulante de colonias de granulocitos (FECG);
- (ix) dicho sometimiento se realiza en ausencia de una citocina de acción temprana; y
- (x) dicho sometimiento se realiza en ausencia de una citocina de acción retardada; y posteriormente

(b) trasplantar las células en un sujeto que lo necesite.

- 30 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto es un sujeto humano.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la nicotinamida se selecciona del grupo que consiste en nicotinamida, un análogo de la nicotinamida, un metabolito de la nicotinamida, un metabolito análogo de la nicotinamida y derivados de los mismos.

- 35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la población de células deriva de un órgano seleccionado del grupo que consiste en músculo, piel, hueso, un órgano linfoide, páncreas, hígado, vesícula biliar, riñón, un órgano del tracto digestivo, un órgano del tracto respiratorio, un órgano reproductor, un órgano del tracto urinario, un órgano asociado con sangre, timo, bazo, un órgano del sistema nervioso.

- 40 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la población de células no incluye células hematopoyéticas, células mononucleares, células progenitoras hepáticas en fase temprana, células progenitoras comprometidas, células madre y progenitoras no hematopoyéticas, o células madre y progenitoras embrionarias.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la población de células comprende células madre.

- 45 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células madre derivan de una fuente seleccionada del grupo que consiste en células hematopoyéticas, células sanguíneas del cordón umbilical, células de sangre periférica movilizadas, células de la médula ósea y células madre y/o progenitoras embrionarias.

- 50 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones descritas preferidas, las células madre derivan de médula ósea o de sangre periférica.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células madre derivan de sangre de cordón umbilical neonatal.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células madre derivan de una fracción de células mononucleares.

- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células madre son ricas en células madre hematopoyéticas.
- 5 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, los procedimientos para mejorar el potencial de injerto y trasplante de células madre comprende adicionalmente la etapa de seleccionar la población de células ricas en células madre hematopoyéticas antes, simultáneamente con o después de la etapa del sometimiento *ex vivo*.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la selección se efectúa mediante CD34
- 10 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, los procedimientos para mejorar el potencial de injerto y trasplante de células madre, comprende adicionalmente la etapa de seleccionar la población de células ricas en células madre hematopoyéticas en fase temprana antes de, simultáneamente con o después de la etapa del sometimiento *ex vivo*.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la selección se efectúa mediante CD133.
- 15 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la selección se efectúa mediante CD34/CD38.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el periodo de tiempo es de entre 1 y 18 semanas.
- 20 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el periodo de tiempo es entre 1 y 7 días.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el periodo de tiempo es entre 2 y 4 días.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el periodo de tiempo es entre 12-30 horas.
- 25 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el periodo de tiempo no supera las 72 horas.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, dicha población de células es una población de células madre y progenitoras hematopoyéticas, y dicho periodo de tiempo se selecciona como insuficiente para la expansión de células madre.
- 30 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, dicha población de células es una población de células madre y progenitoras hematopoyéticas y dicho sometimiento se realiza en condiciones que son insuficientes para la expansión de las células madre.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, dichas condiciones que son insuficientes para la expansión de las células madre se seleccionan del grupo que consiste en ausencia de nutrientes, ausencia de citocinas de acción retardada y ausencia de citocinas de acción temprana.
- 35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, dicho periodo de tiempo es suficiente para regular negativamente la expresión de CD26 en las células, pero insuficiente para la proliferación celular.
- 40 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, una concentración de nicotinamida es de 0,01-60 mg/ml.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la cantidad eficaz de la nicotinamida es de 1,0-40 mg/kg de peso corporal.
- De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la cantidad eficaz de la nicotinamida es de 10-20 mg/kg de peso corporal.
- 45 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona una población de células que comprende las células caracterizadas por un mejor anidamiento y/o injerto de acuerdo con los procedimientos anteriores.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, la población de células y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 De acuerdo incluso con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de la nicotinamida para

la fabricación de un medicamento identificado para mejorar el injerto y/o anidamiento de células madre.

La presente divulgación aborda satisfactoriamente los inconvenientes de las configuraciones hasta ahora conocidas proporcionando procedimientos para mejorar la movilización y la migración de células madre, tanto antes como después del trasplante de células madre.

- 5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la realización práctica o ensayo de la presente invención pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones, tendrá prevalencia. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Se excluyen de la invención las células madre embrionarias humanas y su uso.

Breve descripción de los dibujos

- 15 En el presente documento se describe la invención, solo como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, se recalca que las particularidades mostradas son solo a modo de ejemplo y con fines ilustrativos del análisis de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan para proporcionar lo que se piensa que es la descripción más útil y más fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la presente invención. En este sentido, no se intentan mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de los necesarios para un entendimiento fundamental de la misma, la descripción junto con los dibujos ponen de manifiesto para los expertos en la técnica cómo las diversas formas de la invención pueden realizarse en la práctica.

En los dibujos:

- 25 Las FIGS. 1a-1i son representaciones gráficas de análisis de citometría de flujo del efecto de la nicotinamida sobre el anidamiento de células madre hematopoyéticas en la médula ósea de ratones NOD/SCID. Células mononucleares no cultivadas o toda su progenie después de 3 semanas de expansión con citocinas y nicotinamida (citocinas+NA), o solo con citocinas (citocinas) se marcaron con CFSE (carboxifluoresceín diacetato succinimidil éster) y se infundieron en ratones NOD/SCID irradiados subletalmente (10×10^6 células/ratón para el grupo de células no cultivadas que contenía 5×10^4 células CD34+ y toda la progenie de 5×10^4 células CD34+ después de 3 semanas de expansión con o sin nicotinamida; 20×10^6 células/ratón contenían 180×10^4 células CD34+). La Figura 1 es un histograma de los resultados de citometría de flujo de células de médula ósea del receptor que muestra el anidamiento de células CFSE+/CD34+ después del trasplante. La Figura 1b es un histograma de los resultados de citometría de flujo de células de la médula ósea del receptor que muestra el anidamiento de células CFSE+ totales después del trasplante. El anidamiento de células humanas se presenta como número de acontecimientos positivos (citometría) por 100.000 células de MO analizadas. Cada barra representa el promedio \pm DT de 3 experimentos independientes (6-7 ratones/grupo experimental). Se muestran análisis de citometría de flujo representativo de células de médula ósea de ratones a los que no se les inyectó (Figura 1c) y sí se les inyectó células no cultivadas (Figuras 1d y 1g), células cultivadas con citocinas (Figuras 1e y 1h) y células cultivadas con citocinas y nicotinamida (Figuras 1f y 1i). El total de células humanas que anidan en la MO se seleccionan (véase el área R2) basándose en la dispersión del lado inferior (eje y) y en la distribución de fluorescencia log de la expresión del CFSC (eje x) (Figuras 1c-1f). El brillo de la fluorescencia del CFSE fue suficiente para separar las células humanas marcadas de las células murinas no marcadas al menos 1 log. Después, las células seleccionadas en el área R2 se analizaron con respecto a CFSE (eje x) y a CD34-APC (CD34 conjugado con alofocianina) (eje y) (Figuras 1g-1i). Los cuadrantes superior e inferior de la derecha representan el total de células humanas mientras que el cuadrante superior de la derecha representa las células CD34+ humanas que anidan en la MO;
- 35 la FIG. 2 es un histograma que muestra el efecto de la nicotinamida sobre la migración *in vitro* de células hematopoyéticas. La migración transpocillo inducida por CXCL12 (100 ng/ml) de las células CD34+ purificadas antes (no cultivadas) o después de 3 semanas de cultivo con citocinas y nicotinamida (citocinas+NA) o solo con citocinas (citocinas) (n=3, *p<0,02, **p=0,05) se midió como se describe más adelante en el presente documento. Obsérvese la migración mejorada de células cultivadas en presencia de nicotinamida;
- 40 la FIG. 3 es un gráfico que muestra el efecto de la nicotinamida sobre la unión de las células, mediada por VLA4 (antígeno 4 de activación muy tardía, *Very Late Antigen-4*), a moléculas de adhesión inmovilizadas bajo cizallamiento. Las células CD34+ cultivadas como se ha descrito anteriormente en las Figs. 1 y 2 del presente documento, se sometieron a ensayo con respecto a la captura y detención bajo cizallamiento por VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) inmovilizada adsorbida como manchas de 10 μ l en poliestireno. Se analizaron los acontecimientos de sedimentación y detención celular bajo perfusión (cizallamiento) mediante videofotografía. Las poblaciones de células sometidas a ensayo eran células antes del cultivo (no cultivadas, círculos blancos), células cultivadas con citocinas, como se describe en la Fig. 2 (cultivadas, círculos negros) y células cultivadas con citocinas y nicotinamida (cultivadas+NA, triángulos negros).
- 60 Obsérvese el efecto significativo y constante de la nicotinamida sobre la unión mediada por la molécula de

adhesión;

Las FIGURAS 4a-4f muestran representaciones gráficas del efecto de la nicotinamida sobre el anidamiento e injerto de células hematopoyéticas humanas trasplantadas en ratones NOD/SCID. Las Figuras 4a y 4b muestran el porcentaje de células (CD45+) humanas en la población celular antes del trasplante: células CD34+ no cultivadas (no cultivadas, óvalos grises), toda la progenie de cultivos después de 3 semanas de exposición solo a citocinas (solo citocinas, óvalos negros), o citocinas y nicotinamida (citocinas+NA, flechas). El porcentaje de injerto 4 semanas después del trasplante se determinó por citometría de flujo de células CD45 humanas en la médula ósea de ratones NOD/SCID (eje y). El número de células repobladoras SCID (SRC) se calculó representando las frecuencias de injerto a cada dosis. Las curvas resultantes indican la frecuencia estimada de las SRC en células CD34+ no cultivadas (Figura 4c), cultivadas con citocinas (Figura 4d) o citocinas y nicotinamida (Figura 4e). El número mostrado en cada recuadro indica la frecuencia calculada de las SRC usando el estimador de máxima probabilidad. La Figura 4f muestra el inmunofenotipo de células humanas injertadas en ratones representativos trasplantados con la progenie de 12×10^3 células CD34+ cultivadas durante 3 semanas con nicotinamida, determinado por FACS. Las células de médula ósea de ratón se tiñeron doblemente con anti-CD45 (humano) conjugado con FITC y anticuerpos contra marcadores de diferenciación humanos como se indica. En cada cuadrante se muestran los porcentajes de células doble positivas. Obsérvese que, en los ratones tratados con nicotinamida (Figura 4e), hay una mejora de injerto mayor de 7 veces en comparación con los ratones tratados solo con citocinas (Fig. 4d);

Las FIGS. 5a-5c son representaciones gráficas del efecto de la nicotinamida (NA) sobre el potencial de injerto de células cultivadas en condiciones que promueven la diferenciación. Los cultivos se iniciaron con células CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical purificadas en medio complementado con FCM, TPO, IL-6 y FLT3, cada uno a 50 ng/ml, e IL-3, 20 ng/ml, con (citocinas+NA, flechas) o sin (citocinas, óvalos) nicotinamida 10 mM. Después de 3 semanas, las células se recogieron y se trasplantaron en ratones SCID como se indica. A los ratones se les trasplantaron $1,25 - 5 \times 10^4$ células CD34+ o su progenie después de expansión. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después y las células de la médula ósea se analizaron por FACS para determinar la presencia de células CD34+ (progenitoras humanas) y CD45+ (humanas). Los ratones se calificaron como injertados cuando el número de células (CD45+) humanas constituyó $\geq 0,5$ % de la población de la médula ósea. La Figura 5a muestra el número de ratones injertados positivamente por número total de ratones trasplantados, para cada una de las dosis de células trasplantadas ($5,0 \times 10^4$; $2,5 \times 10^4$; y $1,25 \times 10^4$ células). Las Figuras 5b y 5c muestran el porcentaje total de células (CD45+) humanas (Fig. 4b) y células progenitoras (CD45+CD34+) humanas (Fig. 4c) en la médula ósea de ratones trasplantados con células derivadas de cultivos iniciados con $1,25 \times 10^4$ células CD34+. Obsérvese el injerto mejorado tanto del total de células humanas como de células progenitoras humanas resultante del tratamiento con nicotinamida.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a procedimientos de mejora del anidamiento e injerto de células trasplantables.

Los principios y operativa de la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a las descripciones adjuntas.

Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está limitada en su solicitud a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos y no deben considerarse como limitantes.

Los trasplantes satisfactorios de sangre y médula ósea, tanto autólogos como alogénicos, requieren la infusión de un número suficiente de células madre hematopoyéticas capaces de anidar en la cavidad de la médula ósea y regenerar puntualmente una serie completa de líneas celulares hematopoyéticas. El reclutamiento de células madre desde la médula ósea al interior de la sangre se denomina movilización, o, más comúnmente, movilización de células madre. Está bien establecido que la potenciación de la movilización de células madre y/o el anidamiento dará como resultado un trasplante de células madre satisfactorio.

El SDF-1 α (factor 1 α derivado de células estromales) quimioatrae a células madre hematopoyéticas (CMH) y a células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y se piensa que desempeña un papel crucial en la movilización de las CMH/CPH desde la médula ósea así como en el anidamiento de células madre.

La CD26 es una glucoproteína de superficie celular de 110 kDa muy distribuida con actividad dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) conocida en su dominio extracelular capaz de escindir dipéptidos N-terminales de polipéptidos con restos de prolina o alanina en la penúltima posición. La CD26 inhibe la actividad del SDF escindiendo el último en su posición 2 de la prolina, e inhibiendo por lo tanto sus funciones de movilización/anidamiento de células madre.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0247574 explica el uso de inhibidores de la CD26 para la mejora de eficacia de injertos de trasplantes de células madre mejorando tanto el anidamiento de células madre en la médula ósea como aumentando el número de célula madre donantes movilizadas. Este documento no explica la regulación negativa de la expresión de la CD26 de superficie sino la regulación negativa de la actividad catalítica de la CD26.

Específicamente, la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0247574 no explica el uso de la nicotinamida para regular negativamente la expresión de la CD26 de superficie.

5 Al reducir la presente invención a la práctica, el autor de la presente invención descubrió que la nicotinamida podía usarse satisfactoriamente para regular negativamente la expresión de CD26 de superficie celular, potenciar la expresión y función de las moléculas de adhesión e integrina, aumentar la migración inducida de células trasplantables y mejorar significativamente el anidamiento y el injerto de células trasplantables *in vivo*.

10 Como se demuestra a continuación en el presente documento y en la sección de Ejemplos más adelante, el autor de la presente invención demostró que la incubación a corto plazo de células con nicotinamida es suficiente para regular negativamente la expresión de CD26. Se observó una reducción significativa de células CD34+ y AC133+ que expresaban CD26 después solo 20 horas de incubación con nicotinamida.

15 De manera significativa, la nicotinamida mostró ser eficaz mejorando la funcionalidad de moléculas críticas con respecto al proceso de unión y detención celular. De hecho, la evaluación del potencial de migración celular *in vitro* después de exposición con nicotinamida mostró que la nicotinamida potenciaba la migración inducida por CXCL12 y la unión y retención mediadas por VLA-4 en VCAM-1 en células trasplantables cultivadas con nicotinamida (véase el Ejemplo 3 más adelante). Dado que el proceso de migración celular está mediado por pares de "reconocimiento" tales como VLA-4 y VCAM-1 en una amplia diversidad de células, este sorprendente hallazgo indica que la nicotinamida, y derivados y análogos de la nicotinamida, pueden ser eficaces potenciando la unión y la retención, crítica con respecto a la capacidad de las células trasplantadas para anidar, injertar y repoblar satisfactoriamente tejidos huéspedes, de células de diversos orígenes y fases de diferenciación.

20 Experimentos reales de trasplantes *in vivo* con células tratadas con nicotinamida proporcionan pruebas concluyentes del efecto de la nicotinamida sobre el potencial de injerto y anidamiento celular. El Ejemplo 2 a continuación muestra que la exposición de células mononucleares a nicotinamida antes del trasplante en ratones NOD/SCID aumentó el anidamiento en la médula ósea seis veces sobre células idénticas cultivadas sin nicotinamida. Adicionalmente incluso, el Ejemplo 4 más adelante muestra que, a dosis claramente subóptimas de células, mientras que células cultivadas con control no repueblan la médula ósea en ratones NOD/ SCID, el trasplante de células tratadas con nicotinamida da lugar a un alto grado de injerto y a una repoblación satisfactoria.

Considerando en su conjunto estos resultados, se sugiere una nueva función de la nicotinamida en el anidamiento e injerto celular y como tal en el trasplante de células.

30 Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento de mejora del potencial de anidamiento e injerto de las células, comprendiendo el procedimiento someter *ex vivo* o *in vivo* una población de células a una cantidad de nicotinamida durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el potencial de anidamiento e injerto celular.

35 Como se usa en el presente documento, la frase "mejorar el potencial de injerto celular" se refiere a una mejora en cuanto a la eficacia, calidad o rapidez del trasplante de células que puede producirse como consecuencia de un anidamiento mejorado en el tejido diana, una adhesión mejorada, un rechazo reducido y similar. Como procedimientos para evaluar el potencial de injerto celular se incluyen, por ejemplo, la migración celular y otras técnicas realizadas *in vitro*, y la evaluación histológica, inmunológica y/o radiológica de tejidos y órganos de trasplantes reales realizados *in vivo*, como se describe con detalle más adelante en el presente documento. Puede determinarse un potencial de auto-renovación de las células madre *in vitro* mediante formación de colonias a largo plazo (LTC-CFUc) o mediante injerto *in vivo* en un modelo de ratón SCID-Hu. El modelo de ratón SCID-Hu emplea ratones C.B-17 scid/scid (SCID) trasplantados con timo fetal humano y tejido hepático o tejido de MO 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 ofrece la proliferación de células madre, en este caso células madre hematopoyéticas humanas para proliferar, y actúa en el microentorno hematopoyético de origen humano. Normalmente, los ratones se someten a radiación y después se les administra células madre en los injertos y la reconstitución se mide mediante cualquiera de los diversos procedimientos, incluyendo FACS e inmunohistoquímica de órganos repoblados (Humeau L., y col Blood (1997) 90: 3496; también véase Materiales y Procedimientos Experimentales más adelante).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "*ex vivo*" se refiere a un proceso en el que las células se extraen de un organismo vivo y se propagan fuera del mismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo).

Como se usa en el presente documento, la expresión "*in vitro*" se refiere a un proceso en el que las células que se originan a partir de una línea o líneas celulares (tales como las líneas celulares NTera2 neuronales, líneas celulares embrionarias, etc.) conservadas en el laboratorio, se manipulan fuera de un organismo. Con frecuencia, dichas líneas celulares son células inmortalizadas.

55 Como se usa en el presente documento la frase "población de células" se refiere a una población de células homogénea o heterogénea aislada que comprenden poblaciones de células adecuadas para realizar trasplantes. En una realización preferida, al menos una parte de la población de células expresa CD26 o VLA-4 en la superficie celular.

Como se usa en el presente documento, la frase “células madre” se refiere tanto a la población de células renovable más temprana, responsable de generar masa celular en un tejido u organismo, como a las células progenitoras muy tempranas, que están algo más diferenciadas, que aún no están comprometidas y que pueden fácilmente invertirse para convertirse en parte de la población de células renovable más temprana.

- 5 Como se usa en el presente documento, las frases “células no madre”, “células no progenitoras” y “células comprometidas” se refiere a células en diversas fases de diferenciación, que generalmente ya no conservan la capacidad de invertirse para convertirse en parte de una población de células renovable. En la técnica de cultivo celular se conocen bien procedimientos de cultivo *ex vivo* de células madre, progenitoras y no madre, no progenitoras, comprometidas. 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.

La población de células de la presente invención puede proceder de un donante autólogo o no autólogo (alogénico o xenogénico).

- 15 En una realización preferida, las células para el trasplante son células madre y/o progenitoras, y la fuente de la población de células madre es una preparación de células mononucleares no fraccionada, que no se ha enriquecido con CD34+ u otras células madre hematopoyéticas. En otra realización, las células madre se identifican mediante marcadores de células madre tales como CD34+, CD34+/CD38-, CD133+, CD34+/Lin- y otros marcadores de células madre conocidos en la técnica. En otra realización adicional, la fuente de la población de células madre son células madre que, mediante selección de acuerdo con marcadores de células madre, se han enriquecido con células madre hematopoyéticas.

- 20 Por ejemplo, las células madre de la presente invención pueden derivar de una fuente selecciona del grupo que consiste en células hematopoyéticas, células de sangre del cordón umbilical y células de sangre periférica inmovilizadas.

- 25 Como se usa en el presente documento “nicotinamida” se refiere a la nicotinamida así como a productos que derivan de la misma, a sus análogos y a metabolitos de la nicotinamida o a análogos de la nicotinamida, tales como, por ejemplo, NAD, NADH y NADPH.

Como se usa en el presente documento, la frase “análogos de la nicotinamida” se refiere a cualquier molécula que se sabe que actúa de una manera similar a la de la nicotinamida. Como ejemplos representativos de análogos de la nicotinamida se incluyen, sin limitación, benzamida, nicotintioamida (el análogo tiol de la nicotinamida), ácido nicotínico y ácido α -amino-3-indolpropiónico.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un sujeto mamífero, preferentemente un ser humano.

- 35 La frase “una nicotinamida o un derivado análogo de nicotinamida” se refiere a cualquier derivado estructural de la propia nicotinamida o de un análogo de la nicotinamida. Como ejemplos de dichos derivados se incluyen, sin limitación, benzamidas sustituidas, nicotinamidas y nicotintioamidas sustituidas y nicotinamidas y nicotintioamidas N sustituidas

- 40 De manera adicional o como alternativa, la movilización de las células madre puede efectuarse antes de recoger las células para el trasplante de célula madre usando agentes de movilización muy conocidos en la técnica. Generalmente, el proceso de movilización se inicia mediante activación, inducida por estrés, de neutrófilos y osteoclastos por quimioterapia y estimulación repetida con citocinas tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G), dando como resultado la eliminación y liberación del factor de células madre (FCM) unido a membrana, la proliferación de células progenitoras, así como la activación y/o degradación de moléculas de adhesión. Los agentes de movilización que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, agentes que producen daños al ADN, agentes quimioterapéuticos sencillos (por ejemplo, ciclofosfamida), regimenes de quimioterapia combinados [por ejemplo, ifosfamida, carboplatino y etopósido (ICE) y metilprednisolona, ara-c y cisplatino (ESHAP)], citocinas tales como FEC-G, FEC-GM, FCM, ligando FLT-3 y quimiocinas tales como IL-8, MIP-1 α , Gro β y SDF-1. El modo de administración, así como el período de tiempo necesario para conseguir la movilización y los tipos de células movilizadas depende de las moléculas utilizadas. Por ejemplo, el FEC-G se administra normalmente a diario como una dosis de 5-10 μ g/kg durante 5-10 días, solo o después de terapia. El ajuste del régimen de movilización lo realiza el médico y se revisa en Cottker-Fox y col. (2003) Hematology 419-437.

- 55 En la técnica se conocen bien procedimientos de preparación de células para trasplante. Para la preparación de células no madre, las células pueden obtenerse a partir de tejido donante disociando células individuales de la matriz extracelular recogida del tejido. El tejido de una región particular se retira usando un procedimiento estéril y las células se disocian usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo el tratamiento con enzimas tales como tripsina, colagenasa, DNAsa y similares, o usando procedimientos físicos de disociación tales como un instrumento romo.

Las células preparadas para el trasplante pueden conservarse en una solución fisiológica, o cultivarse en suspensión o en un sustrato fijo. Como medios de cultivo adecuados que pueden mantener a las células se incluyen HEM, DMEM, RPMI, F-12 y similares. Si se requiere, el medio puede contener complementos necesarios para el metabolismo celular, tales como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas útiles tales como transferrina y similares. El medio también puede contener antibióticos, tales como penicilina, estreptomina, gentamicina y similares, para impedir la contaminación con levaduras, bacterias y hongos. Si las células van a cultivarse, las condiciones deben ser parecidas a las condiciones fisiológicas (preferentemente, un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, y la temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C). El medio de cultivo puede complementarse opcionalmente al menos con un factor de crecimiento inductor de proliferación, tal como FCE, anfiregulina, factor de crecimiento para fibroblastos ácido (FCFa o FCF-1), factor de crecimiento para fibroblastos básico (FCFb o FCF-2), factor de crecimiento de transformación alfa (TCT-alfa), citocinas tales como FEC-G, FEC-GM, FCM, ligando FLT-3 y/o quimiocinas tales como IL-8, MIP-1 α , Gro β y SDF-1 y combinaciones de los mismos. Además de factores de crecimiento inductores de proliferación, pueden añadirse otros factores de crecimiento al medio de cultivo, incluyendo FCN, factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), hormona liberadora de tirotrópina (HLT) y similares.

La selección y el enriquecimiento de tipos de células específicas puede realizarse, tal como una preparación de hepatocitos de tejido hepático, separación de neuronas de células gliales o aislamiento de células de los islotes de tejido pancreático, por medios morfológicos, físicos, inmunohistoquímicos (FACS) u otros. Pueden criopreservarse preparaciones de células recientes o cultivadas hasta que se necesiten mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las células pueden suspenderse en una solución isotónica, preferentemente en un medio de cultivo, que contenga un criopreservante particular. Dichos criopreservantes incluyen dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol y similares.

En la técnica se conocen otros procedimientos para la preparación y conservación de células para trasplante y se desvelan con detalle, por ejemplo, en the Handbook of Transplantation (Kipshidze y Serruys, eds. Londres, RU, 2004).

En la técnica se conocen bien procedimientos de preparación de células madre, normalmente seleccionando células que expresen uno o más marcadores de células madre tales como CD34, CD133, etc, o que no tengan marcadores de células diferenciadas. La selección se realiza normalmente por FACS, o por separación inmunomagnética, pero también puede realizarse mediante procedimientos con ácidos nucleicos tales como PCR (véase Materiales y Procedimientos Experimentales más adelante en el presente documento). En la técnica se conocen bien células madre embrionarias y procedimientos para recuperarlas y se describen, por ejemplo, in Trounson AO (Reprod Fert 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 derivan de tejidos de adultos y son también muy conocidas en la técnica. Se describen procedimientos de aislamiento o enriquecimiento de células madre adultas, por ejemplo, en Miraglia, S. y col. (1997) Blood 90: 5013, Uchida, N. y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14720, Simmons, P.J. y col. (1991) Blood 78: 55, Prockop DJ (Cytotherapy (2001) 3: 393), Bohmer RM (Fetal Diagn Ther (2002) 17: 83) y Rowley SD y col. (Bone Marrow Transplant (1998) 21: 1253), Stem Cell Biology Daniel R. Marshak (Editor) Richard L. Gardner (Editor), Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Anthony D. Ho (Editor) Richard Champlin (Editor), Publisher: Marcel Dekker (2000).

Se apreciará que la nicotinamida puede mejorar el potencial de injerto y anidamiento en una amplia diversidad de tipos de células. Por ejemplo, la nicotinamida puede regular negativamente la expresión de CD26 de superficie y mejorar la funcionalidad de VLA-4, CXCR-2 y de otras moléculas de adhesión de cualquier tipo celular que exprese la misma y dado que estas moléculas se expresan ampliamente en poblaciones de células de diverso origen, la población de células puede comprender poblaciones de células no seleccionadas, tales como preparaciones de células en bruto procedentes de tejidos, células madre y/o madre progenitoras mononucleares, así como poblaciones más homogéneas de tipos de células seleccionados.

Como se usa en el presente documento, la frase "células mononucleares hematopoyéticas" se refiere al repertorio completo de leucocitos presentes en una muestra sanguínea, normalmente células mononucleares hematopoyéticas que comprende una fracción mayor de células hematopoyéticas comprometidas y una fracción menor de células madre y progenitoras hematopoyéticas. En un ser humano sano, los leucocitos comprenden una mezcla de células comprometidas y diferenciadas de líneas hematopoyéticas (normalmente más del 99 % de las células mononucleares son células de líneas comprometidas) incluyendo, por ejemplo: células progenitoras de líneas comprometidas CD34⁺CD33⁺ (células mieloides comprometidas), CD34⁺CD3⁺ (células linfoides comprometidas) CD34⁺CD41⁺ (células megacariocitos comprometidas) y células diferenciadas - CD34⁺CD33⁺ (mieloides, tales como granulocitos y monocitos), CD34⁺CD3⁺, CD34⁺CD19⁺ (linfocitos T y B, respectivamente), CD34⁺CD41⁺ (megacariocitos), y células madre y progenitoras de fase temprana hematopoyéticas tales como la línea negativa (Lin⁻) CD34⁺, la línea negativa CD34⁺CD38⁻ (normalmente menos del 1 %).

Las células mononucleares hematopoyéticas se obtienen normalmente a partir una muestra sanguínea aplicando la muestra sanguínea sobre una capa de Ficoll-Hypaque y recoger, después de centrifugación por densidad, la capa interfaz presente entre la Ficoll-Hypaque y el suero sanguíneo, cuya capa interfaz consta esencialmente por completo de leucocitos presentes en la muestra sanguínea.

Actualmente, las células madre hematopoyéticas pueden obtenerse por enriquecimiento adicional de las células mononucleares hematopoyéticas obtenidas por centrifugación diferencial por densidad como se ha descrito anteriormente. Este proceso de enriquecimiento adicional se realiza normalmente por inmunoseparación tal como inmunoseparación magnética o FACS y da como resultado una fracción celular rica en células madre hematopoyéticas (para una descripción detallada del enriquecimiento de células madre hematopoyéticas véase Materiales y Procedimientos Experimentales en la sección de Ejemplos del presente documento más adelante).

Sea cual sea el origen de las células empleadas y su composición, una vez obtenidas las células, estas se someten a (se ponen en contacto con) una cantidad de nicotinamida durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar el injerto y el anidamiento de las células después del trasplante. Dicho periodo de tiempo puede ser corto, o más largo, según se necesite. En una realización preferida, la puesta en contacto se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para regular negativamente la expresión de CD26 de superficie. En otra realización preferida, las células son células madre hematopoyéticas, y la puesta en contacto se realiza durante un periodo de tiempo insuficiente para la proliferación (denominada también expansión) de las células madre aunque suficiente para regular negativamente la expresión de CD26 de superficie. En otra realización adicional, la puesta en contacto se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para aumentar la funcionalidad de VLA-4, CXCR2 y otras moléculas de adhesión y/o integrina.

En la técnica se conocen bien procedimientos para determinar la expresión de proteínas de superficie celular. Como ejemplos se incluyen métodos inmunológicos, tales como análisis FACS (véase la sección de Ejemplos) así como procedimientos bioquímicos (marcado la superficie celular, por ejemplo, con compuestos radioactivos, fluorescentes, avidina-biotina).

En la técnica se conocen bien procedimientos (tales como MTT, incorporación de timidina, FACS) para ensayar la proliferación celular. Se apreciará que la tasa de duplicación celular también derivar de la bibliografía.

Dependiendo del tipo de células, y del uso que se desee hacer con ellas, pueden someterse *ex vivo* a la nicotinamida durante un contacto prolongado, es decir, periodos de semanas o mayores y las células pueden incluso conservarse en contacto con la nicotinamida antes de su uso para el trasplante. Adicionalmente, de acuerdo con determinadas realizaciones, se desea la exposición a corto plazo. La puesta en contacto prolongada puede ser de entre 1 y 18 semanas, preferentemente entre 3 y 9 semanas, más preferentemente entre 2 y 5 semanas, más preferentemente entre 2 y 3 semanas. La puesta en contacto a corto plazo puede ser de 1 a 2 semanas, preferentemente de una semana o menos, más preferentemente entre 1-5 días.

Al reducir la presente invención a la práctica, se descubrió que un tiempo de exposición de 20 horas de las células madre hematopoyéticas a la nicotinamida era suficiente para efectuar una reducción en la expresión de CD26, crucial para el anidamiento e injerto celular, aunque insuficiente para permitir que se produjera la expansión o proliferación de las células madre. Por tanto, las células se someten *ex vivo* a la nicotinamida durante un periodo de tiempo que no supera algunos días, preferentemente 30 horas, más preferentemente 1-30 horas incluso más preferentemente 5-30 horas, incluso más preferentemente 10-30 horas. En otra realización preferida, las células son células madre y/o progenitoras y la duración de la exposición a la nicotinamida se selecciona de manera que sea insuficiente para que se produzca la expansión de las células madre, o en condiciones insuficientes para la expansión de las células madre, tal como en ausencia de citocinas, nutrientes, temperatura subóptima, etc.

Preferentemente, la nicotinamida se proporciona a una concentración final de 0,01-60 mg/ml, preferentemente 1-40 mg/ml, más preferentemente 5-30 mg/ml y más preferentemente 10-20 mg/ml. La selección del medio de cultivo y de los complementos presentes en el medio, depende de las células y de su uso deseado.

En una realización preferida las células sometidas a la nicotinamida pueden usarse para el trasplante en un sujeto que lo necesite después de la exposición a la nicotinamida durante un periodo de tiempo predeterminado, sin expansión *ex vivo* adicional. Se apreciará que la exposición a la nicotinamida puede realizarse en células que han recibido tratamiento adicional *ex vivo*, tal como expansión, selección, modificación genética, etc., bien conocido en la técnica, incluyendo exposición previa *ex vivo* a la nicotinamida y preferentemente poco antes de su uso para el injerto.

Después, tras la exposición a la nicotinamida, las células pueden trasplantarse en (administrarse a) un sujeto que lo necesite. A continuación se resumen algunas aplicaciones clínicas que pueden realizarse de acuerdo con las explicaciones de la presente invención.

Trasplante de células hematopoyéticas: el trasplante de células hematopoyéticas se ha convertido en el tratamiento de elección para una diversidad de enfermedades hereditarias o cancerosas. Recientemente, al realizar procedimientos de trasplantes tempranos que utilizan poblaciones completas de médula ósea (MO), se han utilizado poblaciones más definidas, ricas en células madre (células CD34⁺) [Van Epps Blood Cells 20: 411, (1994)]. Además de derivar de la médula, dichas células pueden derivar de otras fuentes tales como de sangre periférica (SP) y de sangre de cordón (SC) umbilical neonatal [Emerson Blood 87: 3082 (1996)]. En comparación con la MO, el trasplante con células SP acorta el periodo de pancitopenia y reduce el riesgo de infección y sangrado [Brugger N Engl J Med 333: 283, 1995; Williams Blood 87: 1687, (1996); Zimmerman J Hematotherapy 5: 247, (1996)].

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

5 Para obtener suficientes células madre derivadas de SP para el trasplante, estas células se “recogen” por leucoforesis repetida después de su movilización desde la médula ósea hacia el interior de la circulación por tratamiento con quimioterapia y citocinas [Brugger N Engl J Med 333: 283, 1995; Williams Blood 87: 1687, (1996)]. Dicho tratamiento es obviamente inadecuado para donantes normales.

El uso de células madre expandidas *ex vivo* para el trasplante tienen las siguientes ventajas [Koller Blood 82: 378, (1993); Lebkowski Blood Cells 20: 404, (1994)]:

10 Reduce el volumen de sangre necesario para la reconstitución de un sistema hematopoyético adulto y puede obviar la necesidad de movilización y leucoforesis [Brugger N Engl J Med 333: 283, 1995].

Permite conservar un pequeño número de células madre SP o SC para un posible uso en el futuro.

En el caso de trasplante autólogo de receptores con neoplasias malignas, las células tumorales contaminantes en infusión autóloga a menudo contribuyen a la reaparición de la enfermedad [Brugger N Engl J Med 333: 283, 1995]. La selección y expansión de células madre CD34⁺ reducirá la carga de células tumorales en el trasplante final.

15 Los cultivos proporcionan un empobrecimiento significativo de linfocitos T, lo cual puede ser útil en el entorno del trasplante alogénico para reducir la enfermedad de injerto contra huésped.

20 Estudios clínicos realizados indican que el trasplante de células expandidas *ex vivo* derivadas de un pequeño número de células CD34⁺ de SP puede restablecer la hematopoyesis en receptores tratados con altas dosis de quimioterapia, aunque los resultados aún no permiten confirmar conclusiones sobre las capacidades hematopoyéticas *in vivo* a largo plazo de estas células cultivadas [Brugger N Engl J Med 333: 283, 1995; Williams Blood 87: 1687, (1996)].

25 Para el éxito de un trasplante, el acortamiento de la duración de la fase citopénica, así como el injerto prolongado, es crucial. La inclusión de células intermedias y progenitoras tardías en el trasplante podría acelerar la producción de células maduras derivadas de donantes acortando de esta manera la fase citopénica. Es importante, por lo tanto, que las células expandidas *in vivo* incluyan, además de células madre y/o progenitoras sometidas a nicotinamida, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, células más diferenciadas para optimizar la recuperación a corto plazo y en la restauración prolongada de la hematopoyesis. La inclusión de células intermedias y comprometidas tardías expandidas, especialmente las comprometidas con las líneas neutrófilas y megacariocíticas, en simultáneo con las células madre y/o progenitoras expandidas, debe servir para esta finalidad [Sandstrom Blood 86: 958, (1995)].

30 Dichos cultivos pueden ser útiles en el restablecimiento de la hematopoyesis en receptores con médula ósea completamente anulada, así como para proporcionar mediciones complementarias para acortar la recuperación de la médula ósea del receptor después de radio o quimioterapia convencional.

35 Regeneración tisular: Las poblaciones de células madre de la presente invención pueden usarse para promover la regeneración tisular. El trasplante de células madre promete grandes beneficios para la medicina regenerativa, cirugía reconstructiva, diseño tisular, regeneración de nuevos tejidos y de órganos enfermos o dañados para una curación natural (para una revisión véase Czyz y col, Biol Chem, 2003; 384: 1391-40, Sylvester y col Arch Surg 2004; 139: 93-99). Adicionalmente, se han usado neuronas y células gliales complementarias para el trasplante en el tratamiento de la enfermedad de Huntington (Patente de Estados Unidos N° 6.524.865 de Freed y col) y se están utilizando células de los islotes pancreáticos para el trasplante en la diabetes de tipo I y de tipo II (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.326.201 de Fung y col; y 7.045.349 de Benedict y col). Se están realizando investigaciones con células de músculo y derivadas de músculo para su uso clínico y han revelado resultados prometedores cuando se trasplantan en tejido cardíaco, tejido óseo y en estructuras articulares con lesiones (véase la Patente de Estados Unidos N° 6.866.842 de Chancellor, y col). Por tanto, las células para injerto o trasplante pueden derivar de un órgano seleccionado del grupo que consiste en músculo, piel, hueso, un órgano linfático, páncreas, hígado, vesícula biliar, riñón, un órgano del tracto digestivo, un órgano del tracto respiratorio, un órgano reproductor, un órgano del tracto urinario, un órganos asociados con la sangre, timo, bazo y un órgano del sistema nervioso. Como ejemplos de células que pueden prepararse para implante mediante los procedimientos de la presente invención se incluyen cultivos primarios así como líneas celulares establecidas. Como ejemplos de estos se incluyen, pero sin limitación, células de los islotes pancreáticos, fibroblastos de prepucio humano, insulomas en células beta, células NT2, células embrionarias, células madre embrionarias, hepatocitos, células mesencéfalo ventrales secretoras de dopamina, células neuroblastoideas, células de la médula adrenal, combinaciones de linfocitos T de estas y similares. Como puede observarse a partir de esta lista parcial, mediante este procedimiento pueden prepararse satisfactoriamente células de todos los tipos, incluyendo células dérmicas, neurales, sanguíneas, de órganos, de músculo, glandulares, óseas, del sistema digestivo, reproductor e inmunitario, así como células de todas las especies de origen.

Recientes informes han demostrado la capacidad de las células madre trasplantadas o transfundidas para mejorar la regeneración en tejido no homólogo, distinto del cual derivan las células madre. Por ejemplo, se ha observado miogénesis y angiogénesis mejorada en infarto de miocardio después de una infusión de células madre de la médula ósea (Tse y col, Lancet 2003, 361: 47-79, Jackson y col J Clin Invest 2001; 107: 1395-402, Orlic y col Nature 2001; 410: 701-5; Lee y col, Cell Cycle 2005; 4: 861-64, Nagaya y col Am J Heart Circ Phys 2004; 287: H2670-76). Otros estudios han revelado que células madre de músculo esquelético, endotelial y médula ósea son beneficiosas en lesión renal isquémica (Togel y col, AJP Renal Phys 2005; 289:F31-F42 y Arriero, y col, AMJ Ren Phys 2004; 287:F621-27).

Terapia génica: Para una terapia génica prolongada satisfactoria, un requisito indispensable es una alta frecuencia de células modificadas genéticamente con transgenes establemente integrados en su genoma. En el tejido de la MO, por ejemplo, aunque la mayor parte de las células son células progenitoras y precursoras en reproducción, las células madre constituyen solo una pequeña fracción de la población de células y la mayoría de ellas están en estado inactivo, no reproductor. Los vectores basados en virus (por ejemplo retrovirales) requieren división celular activa para la integración del transgén en el genoma del hospedador. Por lo tanto, la transferencia de genes en células madre recientes es muy ineficaz. La posibilidad de conservar y procesar una población de células seleccionada *ex vivo* y mejorar su potencial de anidamiento e injerto proporcionaría una mayor probabilidad del uso satisfactorio del trasplante de células modificadas genéticamente [Palmiter Proc Natl Acad Sci USA 91(4): 1219-1223, (1994)].

Inmunoterapia adoptiva: Se han estudiado y utilizado subpoblaciones linfoides definidas expandidas *ex vivo* para inmunoterapia adoptiva de diversos tumores malignos, inmunodeficiencias, enfermedades virales y genéticas [Freedman Nature Medicine 2: 46, (1996); Heslop Nature Medicine 2: 551, (1996); Protti Cancer Res 56: 1210, (1996)].

El tratamiento mejora la respuesta inmunitaria necesaria o sustituye funciones deficientes. Este planteamiento de Rosenberg y col. [Rosenberg J Natl Cancer Inst. 85: 622, 1993] fue pionero desde el punto de vista clínico, al utilizar una gran cantidad de linfocitos T citolíticos no específicos autólogos y también alogénicos expandidos *in vivo* y posteriormente linfocitos infiltrantes de tumor específicos expandidos *ex vivo*.

A partir de una población inicial de células CD34⁺ de SP complementada con citocinas, también podrían cultivarse células presentadoras de antígeno, funcionalmente activas. Estas células pueden presentar antígenos de proteínas solubles contra linfocitos T autólogos *in vitro* y, por tanto, ofrecer nuevas perspectivas para la inmunoterapia de enfermedades residuales mínimas después de altas dosis de quimioterapia. También se ha estudiado la expansión *ex vivo* de células dendríticas presentadoras de antígeno y resulta ser una aplicación prometedora adicional de la tecnología propuesta actualmente [Bernhard Cancer Res 10: 99, (1995); Fisch Eur J Immunol 26: 595, (1996); Siena Expt Hematol 23: 1463, (1996)].

Ejemplos adicionales de aplicaciones *ex vivo*:

Como aplicaciones adicionales de tratamiento de células no madre, diferenciadas, así como células madre y progenitoras con nicotinamida se incluyen regeneración de la piel, regeneración hepática, regeneración muscular, estimulación del crecimiento óseo para aplicaciones en osteoporosis y trasplante de condrocitos/condroblastos y/o células sinoviales para el tratamiento de trastornos articulares y artríticos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la puesta en contacto *ex vivo* de poblaciones de células con nicotinamida, de acuerdo con las características descritas anteriormente en el presente documento, puede utilizarse para la preparación de una población de células madre o no madre *ex vivo* o *in vivo* para el implante de células en un órgano de un sujeto que lo necesite.

Las células de la presente invención pueden trasplantarse mediante inyección directa en un órgano, inyección en la corriente sanguínea, inyección intraperitoneal etc. Pueden determinarse procedimientos de trasplante adecuados controlando el anidamiento e injerto de las células implantadas en el órgano deseado, la expresión de genes o marcadores deseados específicos de órganos y la función del órgano derivado del sujeto. En el páncreas, por ejemplo, el mantenimiento de la euglucemia, la secreción de insulina y/o del péptido C puede ser una medida del restablecimiento de la función en un animal huésped diabético después de terapia de reemplazo celular como se desvela más adelante en el presente documento. En el hígado, por ejemplo, puede controlarse la síntesis de albúmina.

Las poblaciones celulares de la presente invención pueden proporcionarse tal cual, junto con el medio de cultivo que las contiene, aislarse del medio de cultivo, y combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable así como con agentes adicionales que pueden promover el injerto celular y/o la función de órganos (por ejemplo, agentes inmunosupresores, antibióticos, factores de crecimiento). Por tanto, las poblaciones celulares de la invención pueden administrarse en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina estéril y soluciones de tampón acuoso. El uso de dichos vehículos y diluyentes es bien conocido en la técnica.

Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria

conteniendo el principio activo (por ejemplo, células). El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. En el envase o dispositivo dispensador pueden incluirse instrucciones de administración. En el envase o dispositivo dispensador también puede incluirse una advertencia en una forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, del uso o venta de agentes farmacéuticos, cuya advertencia refleja la autorización de la agencia de la forma de las composiciones para la administración veterinaria o a seres humanos. Dicha advertencia puede incluir, por ejemplo, una etiqueta con la autorización de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para la prescripción de fármacos o un prospecto del producto autorizado. Como se ha detallado además anteriormente, las composiciones que comprenden una preparación de la divulgación, formuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable, también pueden prepararse, colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Las células preparadas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención pueden administrarse al sujeto tal cual, o en una composición farmacéutica en la que esta se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

Como se usa en el presente documento, "una composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En lo sucesivo en el presente documento, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse indistintamente, se refieren a un vehículo o a un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades de los compuestos administrados. En estas frases se incluye un adyuvante.

En el presente documento, el término, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Como ejemplos, sin limitación, de excipientes se incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, y polietilenglicoles.

Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intravasculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Como alternativa, la composición farmacéutica puede administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéuticamente directamente en la región tisular de un paciente.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprendan excipientes y agentes auxiliares, que faciliten el procesamiento de los principios activos en las preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración seleccionada.

Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados que se filtran a través de la barrera. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos se incluyen en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de principios activos (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, isquemia) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra bien dentro de la habilidad del experto en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación utilizada en los procedimientos de la invención, la dosificación o la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos realizados *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o dosificación deseada. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivo celular o en animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y en cultivos celulares y en estudios en animales pueden usarse en la formulación de una serie de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación

puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Teniendo en cuenta la afección del paciente, el médico tratante puede seleccionar la formulación exacta, la vía de administración y la dosificación. (Véase, por ejemplo, Fingl, E. y col. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Cáp. 1, pág. 1).

- 5 Dependiendo de la gravedad y de la sensibilidad de la afección a tratar, la dosificación puede ser una administración sencilla o una pluralidad de administraciones, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas, o hasta que se efectúe la curación o se consiga la disminución de la patología.

La cantidad a administrar de una composición dependerá, por supuesto, del sujeto que vaya a tratarse, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del criterio del médico tratante, etc.

- 10 Otros objetivos, ventajas y nuevas características de la presente invención serán evidentes para un experto en la materia después de examinar los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, tal y como se han indicado anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante, encuentra refuerzo experimental en los siguientes ejemplos.

15 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 utilizada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes de ADN. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se expone en las Patente de Estados Unidos Nos 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); en la bibliografía de patentes y científica se describen ampliamente inmunoensayos disponibles véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 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 y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se piensa que los procedimientos incluidos en el presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan por comodidad para el lector.

Materiales y procedimientos experimentales

- Muestras de sangre de cordón umbilical** - Se obtuvieron células de sangre de cordón umbilical después de un parto normal a término (con consentimiento con total conocimiento de causa). Las muestras se recogieron y se congelaron de acuerdo con Rubinstein y col. [Rubinstein y col. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92 (22): 10119-10122.] a las 24 h posparto. Antes de su uso, las células se descongelaron en tampón de Dextrano (Sigma, St. Louis, MO, USA) que contenía albúmina de suero humano al 2,5 % (HAS, Bayer Corp. Elkhart, en Estados Unidos), se estratificaron en un gradiente de Ficoll- Hypaque (1,077 g/ml; Sigma) y se centrifugaron a 800 x g durante 30 min. Las células mononucleares en la capa de la interfaz se recogieron y se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Biological Industries) que contenía HSA al 0,5 %. Para purificar las células CD34+, la fracción de células mononucleares se sometió a dos ciclos de separación inmunomagnética con perlas utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD34 de MiniMACS" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de la población CD34+ así obtenida fue de 95-98 %, evaluada por citometría de flujo.

- Análisis FACS de células CD34+** - Los porcentajes de células progenitoras positivas a CD26 se determinaron por tinción de las células CD34+ con anti-CD26 conjugado con FITC adquirido en Becton Dickinson.

Expansión ex vivo- Se cultivaron células CD34+ purificadas en bolsas de cultivo (American Fluoroseal Co., Gaithersburg, MD) a 1×10^4 células/ml en medio MEM α , suero fetal de ternero (SFT) al 10 % y citocinas: trombopoyetina (TPO), interleucina-6 (IL-6), ligando FLT-3 y factor de células madre (FCM), cada uno a una

concentración final de 50 ng/ml (Perpo Tech, Inc., Rocky Hill, NJ) con o sin nicotinamida (NA) 5 mM (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humedecida de CO₂ al 5 % en aire. Estudios preliminares realizados con diversas concentraciones de NA (1-10 mM), indicaron que en combinación con las 4 citocinas, 5 mM fue la concentración óptima de NA (datos no mostrados). Hasta la semana 3, los cultivos se cubrieron semanalmente con el mismo volumen de medio reciente y después la población se redujo a la mitad semanalmente. Se realizó el recuento celular, el ensayo de unidades formadoras de colonias (UFC) y el análisis de inmunofenotipo como se describe más adelante en el presente documento.

Inmunofenotipado de células CD34+ - Células CD34+ re-aisladas utilizando mini-MACS se lavaron con solución PBS que contenía BSA al 1 % y se sometieron a doble tinción (a 4 °C durante 30 minutos) con anti-CD34 conjugado con PE y anticuerpos conjugados con FITC contra CXCR4, VLA-4 (Chemicon Intl, Inc. Temecula, CA, Estados Unidos), LFA-1 (producto IQ), CD38 o con una mezcla de anticuerpos conjugados con FITC contra antígenos de diferenciación (CD38, CD33, CD14, CD15, CD3, CD61, CD19) para la determinación de células CD34+Lin. (Los anticuerpos contra CD34, CD38 y CD61 se adquirieron en DAKO Glostrup, Corp, Carpintería, CA, Estados Unidos, mientras que los restantes se obtuvieron en Becton Dickinson and Co, San José, CA, Estados Unidos). Después las células se lavaron en el tampón anterior y se analizaron usando un citómetro de flujo FACScalibur® (Becton Dickinson and Co., San José, CA). La emisión de 10⁴ células se midió usando aplicación logarítmica y se analizó utilizando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson and Co, San José, CA, Estados Unidos). Los análisis FACS resultantes se presentaron como porcentajes de células CD34+. El número absoluto de células CD34+CD38- y CD34+Lin- se calculó a partir del número total de células CD34+ en cultivo.

Marcaje con CFSE - Se lavaron células no cultivadas o cultivadas y se resuspendieron a menos de 10⁷ células/ml en medio asérico. Se añadió CFSE (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, Estados Unidos) a una concentración final de 5 µg/ml, y las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. La captación del colorante se detuvo por adición de SFT al 10 %. Después del marcaje, las células se lavaron tres veces en PBS complementado con SFT al 10 % y se analizaron por citometría de flujo para la intensidad de fluorescencia, y después se inyectaron por vía intravenosa a ratones NOD/SCID irradiados subletalmente (10-20 millones de células por ratón).

Ensayo de Migración In Vitro- En la cámara inferior de una placa de cultivo "transpocillo" de 24 pocillos Costar se puso RPMI más SFT al 10 % (0,6 ml) que contenía CXCL12 100 ng/ml (R y D Systems) (Corning, Inc, Corning, NY). En la cámara superior se introdujeron células (2 x 10⁵) en 100 µl de medio, sobre una membrana porosa (tamaño de poro de 5 µm). Después de 4 horas, las células se recogieron de ambas cámaras y se contaron por citometría de flujo (FACSort, Becton Dickinson and Co, San José, CA, Estados Unidos). En la cámara inferior se realizó migración de control por migración espontánea sin CXCL12.

Análisis de anidamiento in vivo- ratones NOD/SCID (de 8-10 semanas de vida) (Harlan Ltd., Israel) se irradiaron subletalmente (a 375cGy a 67cGy/min) y 24 horas después se les inoculó, a través de la vena de la cola, cualquiera de células SC cultivadas o no cultivadas marcadas con CFSE. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la inyección y se obtuvieron muestras de médula ósea mediante lavado abundante de sus fémures y tibias con IMDM a 4 °C. El anidamiento de células humanas se detectó por citometría de flujo observando las células teñidas con CFSE sobre un fondo de células murinas no marcadas. La fluorescencia brillante del CFSE fue suficiente para separar las células humanas marcadas de las células murinas no marcadas en al menos 1 logaritmo. Para cuantificar el anidamiento de las células progenitoras humanas, células de la médula ósea se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD34 humanos conjugados con APC y se enumeraron las células CFSE⁺CD34⁺ (progenitoras humanas). Para cada muestra se registraron y analizaron 100.000 acontecimientos.

Trasplante de células CD34⁺ humanas en ratones NOD/SCID- Se criaron ratones NOD/SCID y se mantuvieron en jaulas estériles intra-ventiladas (Techniplast, Bugugiatte, Italia). Ratones de ocho semanas de vida se irradiaron subletalmente como se ha descrito anteriormente. Después, a los ratones se les inoculó, a través de la vena de la cola, células CD34⁺ derivadas de SC recién purificadas o toda su progenie después de 3 semanas de cultivo. Para evitar la variabilidad del donante, células CD34⁺ derivadas de SC de diversas unidades se agruparon y se utilizaron para cultivos de expansión así como para inyección grupal. Los ratones se sacrificaron a la semana 4, y se obtuvieron muestras de médula mediante lavado abundante de sus fémures y tibias con IMDM a 4 °C. Para identificar el injerto de células humanas se realizó análisis por citometría de flujo de las células de la médula de ratones NOD/SCID como se ha descrito anteriormente en el presente documento, utilizando anticuerpos monoclonales contra antígenos de diferenciación de leucocitos humanos.

Cuantificación de células repobladoras SCID (SRC)- Las frecuencias de las SRC se cuantificaron mediante un análisis de dilución limitante y aplicando estadística de Poisson con respecto al modelo de un solo acierto como se ha descrito anteriormente. Los ratones se puntuaron como positivamente injertados si el 0,5 % de sus células medulares expresaban CD45 humana. Se calcularon las frecuencias de las SRC y comparaciones estadísticas entre poblaciones individuales por estimación de probabilidad máxima usando el programa informático L-Calcul (StemCell Technologies, Vancouver, BC).

Experimentos de Flujo de Cizalla- Se mezcló sVCAM-1, VCAM-1 humana de siete dominios purificada soluble, en medio de recubrimiento (PBS tamponado con bicarbonato sódico 20 mM pH, 8,5) con una cantidad fija de vehículo (HSA 2 µg/ml) y se adsorbió como manchas de 10 µl sobre placas de poliestireno (Becton Dickinson and Co, San

José, CA, Estados Unidos) durante 2 horas a 37 °C, sola o con las cantidades indicadas de quimiocinas intactas o termoactivadas. Las placas se lavaron y se bloquearon con HSA (20 mg/ml). Se evaluaron las densidades de sitio de VCAM-1 usando mAb anti-VCAM-1 marcado con ¹²⁵I, 4B9. Se ensamblaron monocapas celulares de células no cultivadas y células después del cultivo con o sin nicotinamida y sustratos revestidos con VCAM-1/quimioquina en la superficie inferior de la cámara de flujo (cavidad 260 μm) y se lavaron ampliamente con medio de unión. La cámara de flujo se montó sobre la pletina de un microscopio de contraste de fase inversa (Diaphot 300; Nikon Europe BV, Badhoevedorp, Países Bajos). Todos los experimentos de flujo se realizaron a 37 °C. Las células se perfundieron a 10⁶ células/ml a través de la cámara y a la velocidad de flujo deseada generada con una bomba de jeringa automatizada. La duración de todas las perfusiones celulares se grabó en un video con una videocámara de larga integración LIS-700 CCD (Applitech Rigicam, Israel) y un aparato de video SVHS de amplitud máxima (AG-6730; Panasonic, Japón). Todas las interacciones celulares con los sustratos adhesivos se determinaron trazando manualmente los movimientos de las células individuales a lo largo de trayectorias de campo de 0,9 mm durante 1 minuto. Las interacciones celulares con superficies que incluían VCAM-1 fueron >95 % dependientes de integrina α4. En cada experimento todos los acontecimientos se normalizaron con respecto a una población constante de células que fluían en proximidad inmediata con el sustrato. La frecuencia de cada categoría de contactos se expresó en porcentaje de unidades (acontecimiento por célula⁻¹ x 10²); unidad de medición 1 % a 0,5, 1 y 1,5 din/cm² correspondiente a la tasa de contacto de 1,5 x 10⁻³, 3 x 10⁻³ y 4,5 x 10⁻³ acontecimientos x cel⁻¹ mm⁻¹ s⁻¹, respectivamente, expresado como la media ± intervalo o DT.

Estadística- Se aplicó el Ensayo de Rango de Wilcoxon no paramétrico para ensayar las diferencias entre los grupos del estudio. Todos los ensayos aplicados eran de dos colas y un valor p de ≤ 5 % se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron usando programa el informático SAS (SAS Institute, Cary, NC).

Resultados experimentales

Ejemplo 1

La nicotinamida regula negativamente la expresión de CD26/dipeptidilpeptidasa IV en células CD34+

El efecto de incubación a corto plazo con nicotinamida sobre la expresión en membrana de CD26 de CMH se realizó por análisis FACS.

Células CD34+ recién purificadas se analizaron por FACS para determinar la expresión de CD26 (T-0), después se incubaron con Nicotinamida +/- 5 mM durante 20 horas (T-20 horas) y se analizaron de nuevo por FACS. Como se demuestra en un experimento duplicado resumido en la siguiente Tabla 1, después de 20 horas de incubación (T-20) en presencia de Nicotinamida, la expresión de CD26 se redujo significativamente por la presencia de Nicotinamida (reducción de 2-3 veces) en comparación con células mantenidas durante 20 horas en ausencia de Nicotinamida así como con células CD34+ recién purificadas (T-0).

Tabla 1

	células CD26+ (%)		
	T-0	T-20	
		Control	+ Nicotinamida
Exp. 1	8,5	5	2,7
Exp. 2	10	12	6

Ejemplo 2

La nicotinamida aumenta el anidamiento en la médula ósea de células cultivadas

La eficacia reducida del injerto de células cultivadas se ha atribuido, al menos en parte, a un defecto en su capacidad de anidamiento con respecto a células no cultivadas (Szilvassy, S. J., y col, Blood, 2000; 95: 2829-37). Para evaluar el efecto de la nicotinamida sobre el anidamiento de células cultivadas, a ratones NOD/ SCID se les trasplantó células mononucleares (MNC) no cultivadas 10 x 10⁶, que contenían 5 x 10⁴ células CD34+ (células CD34+ al 0,5 %), o toda su progenie después de 3 semanas de cultivo con citocinas, con o sin nicotinamida, conteniendo cada trasplante 180 x 10⁴ células CD34+. Antes del trasplante, las células se marcaron con CFSE. Veinticuatro horas después del trasplante se cuantificó el total de células marcadas con CFSE y células CD34+ marcadas con CFSE que anidaron en la médula ósea de ratón de los ratones receptores por FACS.

Incluso aunque se trasplantó el mismo número de células y células CD34+ de ambos grupos de cultivo, el anidamiento de células CD34+ tratadas con nicotinamida fue 6 veces mayor, mientras que el anidamiento de células

CD34+ sin exposición a nicotinamida fue solo 2 veces mayor con respecto al anidamiento de células CD34+ no cultivadas ($n=21$, $p<0,05$) (Fig. 1a). El anidamiento de células (MNC) cultivadas fue 2 veces mayor con células tratadas con nicotinamida en comparación con células no tratadas con nicotinamida y similar al anidamiento de MNC no cultivadas ($n=21$, $p<0,05$) (Fig. 1b). Las Figuras 1c-1i muestran gráficas de manchas de análisis FACS de ratones representativos trasplantados con células cultivadas o no cultivadas.

Ejemplo 3

La nicotinamida aumenta la funcionalidad de receptores de quimiocina y moléculas de adhesión

Se ha sugerido que modificaciones en quimioquinas y moléculas de adhesión, bien expresión o funcionalidad, producen un defecto de anidamiento en células CD34+ cultivadas, ya que la unión de las células a ligandos de "acoplamiento" específicos es crítica para el paso eficaz de células desde la circulación a tejidos diana (Foguenne, J., y col. Haematologica, 2005; 90: 445-51). Esto es especialmente significativo a la vista de la amplia distribución de integrinas y moléculas de adhesión tales como VLA-4 y LFA-1 a través de una diversidad de tipos de células (células musculares, linfocitos, eosinófilos, etc.). Para determinar la función de dichas moléculas de adhesión y relacionadas en la mejora, mediada por nicotinamida, del anidamiento e injerto de células, se ensayó el efecto de la nicotinamida sobre la migración *in vitro* y la funcionalidad de la molécula de adhesión Antígeno-4 de Activación Muy Tardía (VLA-4).

Usando un ensayo de migración trans-pocillo, se ensayó la migración inducida por CXCL12 de células hematopoyéticas no cultivadas y cultivadas, evaluando los efectos de la nicotinamida sobre la función de la integrina y moléculas de adhesión. CXCL12 estimula poderosamente la migración de células cd34+ tanto tratadas como no tratadas (Figura 2d). Sin embargo, la migración inducida por CXCL12 fue significativamente mayor en células cultivadas con nicotinamida (citocinas + NA) en comparación con las células cultivadas sin nicotinamida ($p>0,02$) o células no cultivadas ($p=0,05$) (Fig. 2). Estos resultados sugieren que el tratamiento de células CD34+ con NA puede posiblemente aumentar la respuesta de CXCR4 con su ligando CXCL12, dando como resultado una mejora del potencial de injerto y anidación de las células tratadas con nicotinamida.

Cuando se investigó la calidad funcional de células de unión a moléculas de adhesión usando análisis de flujo con cizalla, se reveló el fuerte efecto de la nicotinamida sobre la unión mediada por VLA4 y la retención sobre VCAM. La Figura 3 muestra el porcentaje significativamente mejorado de células inicialmente sedimentadas resistentes a la eliminación por cizallamiento evidente en las células tratadas con nicotinamida.

Por tanto, los resultados en las Figuras 2 y 3 revelan que el tratamiento de células con nicotinamida antes del trasplante aumenta la función de moléculas de adhesión y relacionadas con citocinas en estas células, mejora la migración celular y por lo tanto mejora el potencial de trasplante de células, como se indica mediante captura inicial aumentada y unión a VCAM-1 inmovilizada y retención bajo flujo aumentado, en comparación con células no cultivadas o cultivadas solo con citocinas.

Ejemplo 4

La NA aumenta la capacidad de repoblación SCID de células cultivadas con citocina

El tratamiento con nicotinamida se sometió a ensayo para determinar la capacidad de mejorar el anidamiento e injerto de células trasplantadas mediante la repoblación de ratones NOD/SCID. Para evaluar la capacidad de repoblación, a ratones NOD/SCID se les trasplantó células CD34+ no cultivadas ($n = 12$) sobre un intervalo de dosis pretendido para conseguir un trasplante subóptimo y posteriormente sin injerto en una fracción de ratones o su progenie después de una expansión de 3 semanas con citocinas ($n = 12$) o citocinas + NA ($n = 13$). El injerto de células humanas se evaluó 4 semanas después del trasplante. Los ratones se puntuaron como positivamente injertados si el 0,5 % de las células de la médula ósea del receptor expresaban el antígeno CD45 humano (CD45+). Como se muestra en la Figura 4a, el trasplante de 3×10^3 células CD34+ dio como resultado el no injerto en las células no cultivadas. De manera similar, la progenie de 3×10^3 células CD34+ SC cultivadas con citocinas tampoco injertó. Sin embargo, la presencia de nicotinamida en el cultivo, dio como resultado un injerto del 50 % de 3×10^3 células CD34+ SC en los ratones. A un intervalo de dosis de 6×10^3 células (Fig. 4b), células CD34+ SC recientes injertaron solo en el 16,7 % de los ratones, mientras que la progenie de 6×10^3 células CD34+ cultivadas con citocinas injertaron en el 33,3 % de los ratones. Por otro lado, al mismo intervalo de dosis, la progenie de células cultivadas con nicotinamida y citocinas injertaron en el 100 % de los ratones (Fig. 4b).

La frecuencia de células repobladoras SCID (SRC) se calculó usando un estimador de máxima probabilidad como se ha descrito anteriormente en el presente documento (Figs. 4c-4e). La frecuencia de SRC en células CD34+ no cultivadas fue de 1 en 36.756 células (intervalo de confianza [IC] del 95 %, 1/113,366 - 1/11,917) (Fig. 4c.). La frecuencia SRC en células cultivadas solo con citocinas fue de 1 en 19.982 (IC, 1/47,972 - 1/8,323) (Fig. 4d) y la frecuencia SRC en células cultivadas en presencia de nicotinamida y citocinas fue significativamente mayor, de 1 en 2.620 (IC, 1/5,127 - 1/1,339) (Fig. 4e). Por lo tanto, las condiciones de cultivo que incluyen nicotinamida sostuvieron una cantidad mayor de 14 veces de SRC que las células no cultivadas y 7,6 veces más SRC que las células cultivadas solo con citocinas. La Figura 4f demuestra la diferenciación multilinea *in vivo* de células cultivadas tratadas con NA injertadas en ratones NOD/SCID.

Efecto de la nicotinamida sobre el anidamiento e injerto en células tratadas con IL-3: Se ha indicado que la IL-3 aceleraba la diferenciación y atenuaba la capacidad de repoblación SCID de células trasplantadas. Para ensayar si la nicotinamida modula el potencial de injerto de células expuestas a la citocina, se evaluó el efecto de la nicotinamida sobre células CD34+ derivadas de SC cultivadas con IL-3. Los experimentos del trasplante indican que el tratamiento con nicotinamida de hecho aumentaba el potencial de repoblación SCID de cultivos complementados con IL-3. La Figura 5a muestra la proporción de injerto después de inyección de $1,25 \times 10^4$ células. Las Figuras 5b-c presentan el injerto de células humanas (Fig. 5b) y células progenitoras (Fig. 5c) totales después del trasplante de la dosis más baja de células evaluada en este experimento ($1,25 \times 10^4$ células). Los resultados muestran la presencia de células (CD45+) humanas en la médula ósea de 5 de los 5 ratones trasplantados con células tratadas con nicotinamida, pero solo en 2 de los 5 ratones trasplantados con células tratadas solo con citocina (Fig. 5a). El injerto de células progenitoras (CD45+CD34+) humanas, 4 semanas después del trasplante, se observó solamente en ratones trasplantados con células cultivadas con nicotinamida.

Los resultados proporcionados anteriormente en el presente documento muestran claramente que la exposición de células a nicotinamida mejora la expresión y la función de moléculas de adhesión e integrina crítica para el injerto y el anidamiento de células, puede aumentar el potencial de migración celular y claramente proporciona un injerto y una anidación superior de las células trasplantadas. Por tanto, la nicotinamida puede usarse para proporcionar poblaciones de células para el trasplante, con un mejor potencial de anidamiento e injerto.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones individuales, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse individualmente o en cualquier subcombinación adecuada.

Listado de referencias

- Aiuti J. Exp. Med. 1997; 185: 111-120
 Anderlini, P. y Korbling, M. (1997) Stem. Cells 15, 9-17
 Baggiolini, M.. 1998, Nature 392: 565
 Banasik M. y col., J Biol Chem. 1992; 267: 1569-1575
 Bernhard Cancer Res 10: 99, (1995)
 Christopherson KW 2nd, y col., Science. 13 agosto 2004 13; 305(5686): 1000- 1003
 Christopherson KW 2nd, J Immunol. 15 diciembre 2002; 169(12): 7000-7008
 Corda D, Di Girolamo M. 2003; 22(9): 1953-1958
 de la Crux, Lois S, y col., Bioessays. 2005; 27(2): 164-75
 De Roos y col Transplantation 1997; 63: 513-18
 Fisch Eur J Immunol 26: 595, (1996)
 Fogueune, J., y col. Haematologica, 2005; 90: 445-51
 Freedman Nature Medicine 2: 46, (1996)
 Gagandeep y col, Gene Therapy 1999; 6: 729-36
 Heslop Nature Medicine 2: 551, (1996)
 Humeau L., y col Blood (1997) 90: 3496
 Ito y col, Muscle Nerve 1998; 21: 291-7
 Imai Br. J. Haematol. 1999; 106: 905-911
 Jaime Imitola y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 101 (52): 18117-18122
 Kipshidze y Serruys, eds. Londres, RU, 2004
 Lupi R, y col., J Biol Chem. 2000; 275: 9418-9424
 Lupi R, y col. Biochem J. 2002: 367: 1-7
 McGrath Dev. Biol. 1999; 213: 442-456
 Protti Cancer Res 56: 1210, (1996)
 Rankin PW, y col., J Biol Chem. 1989; 264: 4312-4317
 Roach ML. Methods Mol Biol (2002) 185: 1
 Siena Expt Hematol 23: 1463, (1996)
 Shioda y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6331
 Smith AG. Annu Rev Cell Dev Biol (2001) 17: 435
 Smith S. Trends Biochem Sci. 2001; 26: 174-179
 Trounson AO. Reprod Fertil Dev (2001) 13: 523
 Ueda K, Hayaishi O, Annu Rev Biochem. 1985; 54: 73-100
 Virág L, Szabó C. Pharm. Reviews. 2002; 54: 375-429
 Yau L, y col., Eur. J. Biochem. 2003; 270: 101-110

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para mejorar el potencial de anidamiento e injerto celular, comprendiendo el procedimiento someter *ex vivo* o *in vitro* una población de células a de 0,01 a 60 mg/ml de nicotinamida durante un periodo de tiempo insuficiente para la expansión de células madre, siendo dicho periodo de tiempo de 10-30 horas en el que dicha población de células es una población de células madre y/o progenitoras hematopoyéticas CD34+.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha población de células deriva de una fuente seleccionada del grupo que consiste en células de sangre de cordón umbilical, células de sangre periférica movilizadas, células de médula ósea.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha población de células deriva de una fracción de células mononucleares.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que adicionalmente comprende la etapa de seleccionar una población de células enriquecida con células madre hematopoyéticas antes de, simultáneamente con o después de, dicha etapa de sometimiento *ex vivo*.
- 15 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho periodo de tiempo es suficiente para regular negativamente la expresión de CD26 en las células.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha cantidad de nicotinamida y dicho periodo de tiempo se seleccionan para que sean suficientes para reducir la expresión de CD26 por las células de dicha población de células en comparación con la expresión de CD26 en células madre y/o progenitoras hematopoyéticas mantenidas durante el mismo periodo de tiempo en ausencia de nicotinamida, en el que dicha expresión de CD26 se mide *in vitro* mediante análisis FACS.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 6, en el que dicho periodo de tiempo es de 20 horas.
- 25 8. Una población de células que comprende células madre y/o progenitoras hematopoyéticas **caracterizada por** un potencial de injerto y anidamiento mejorado preparado de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, la población de células de la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. La población de células de la reivindicación 8, que se aísla y se prepara para un trasplante en un sujeto que lo necesita.

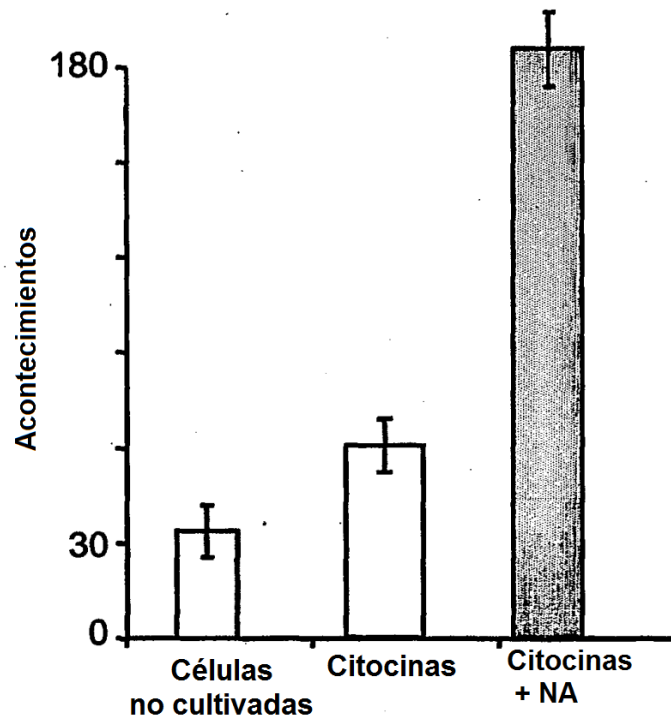


Fig. 1a

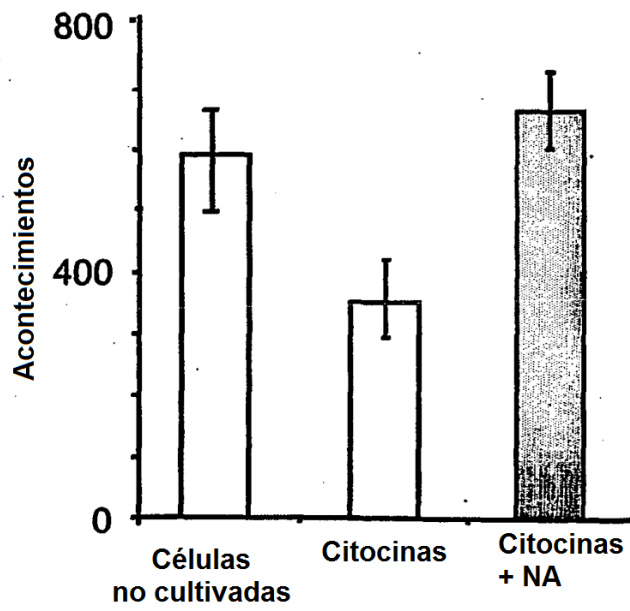


Fig. 1b

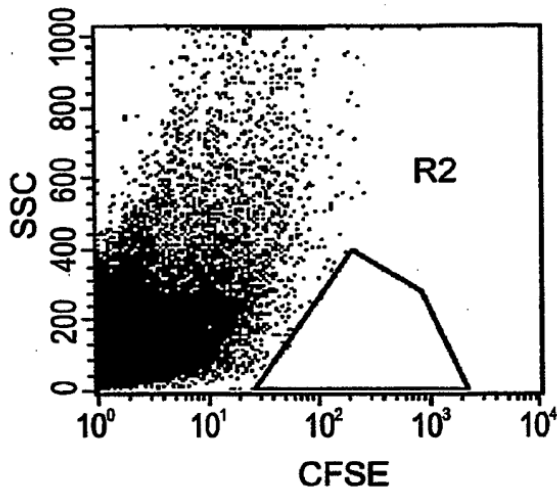


Fig. 1c

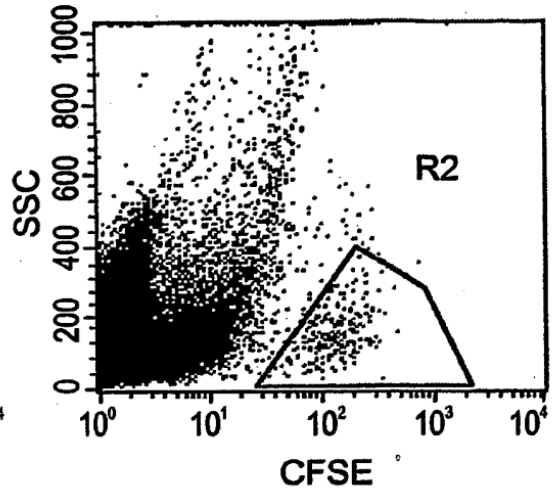


Fig. 1d

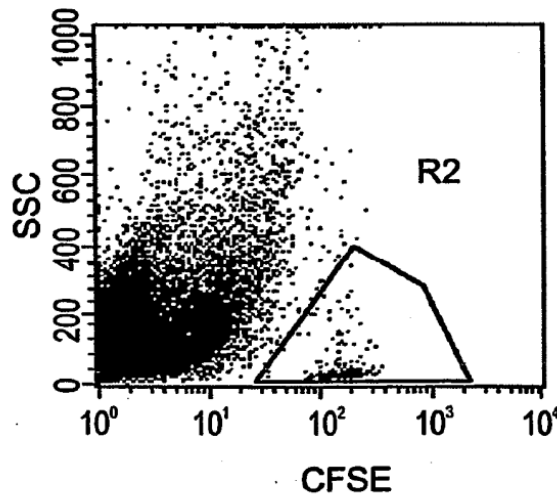


Fig. 1e

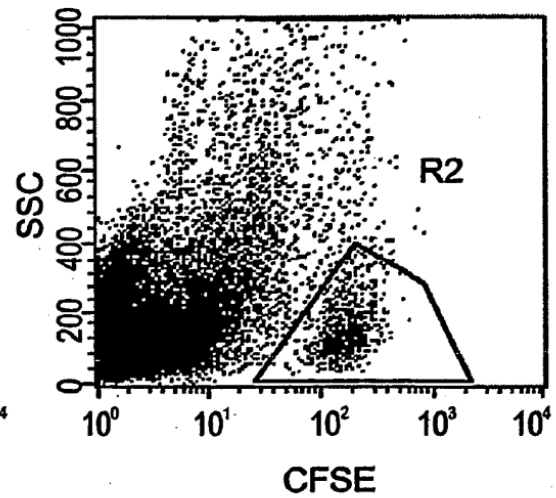


Fig. 1f

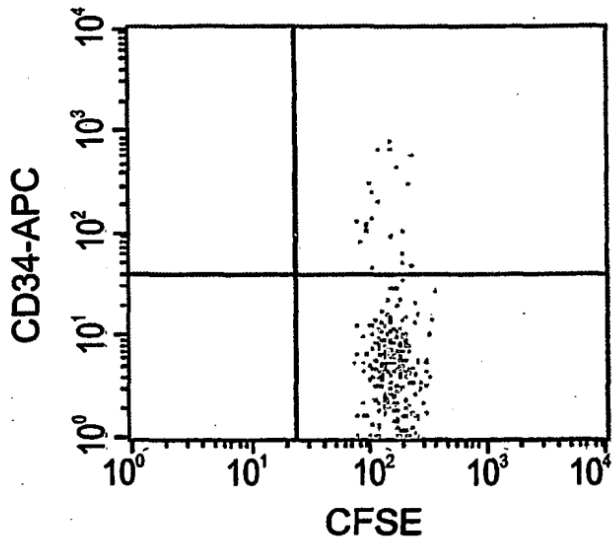


Fig. 1g

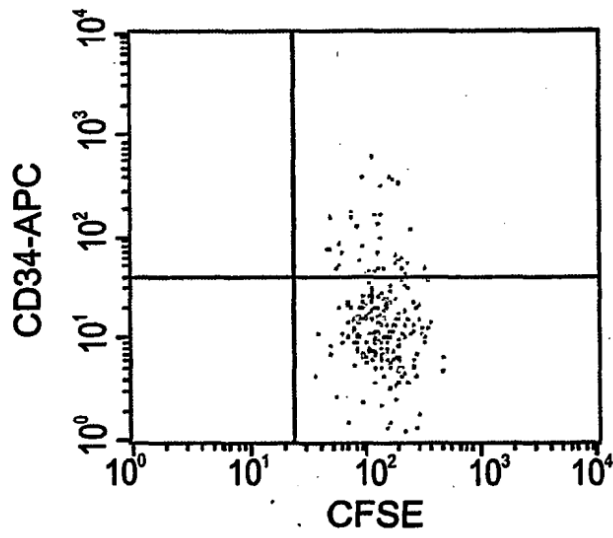


Fig. 1h

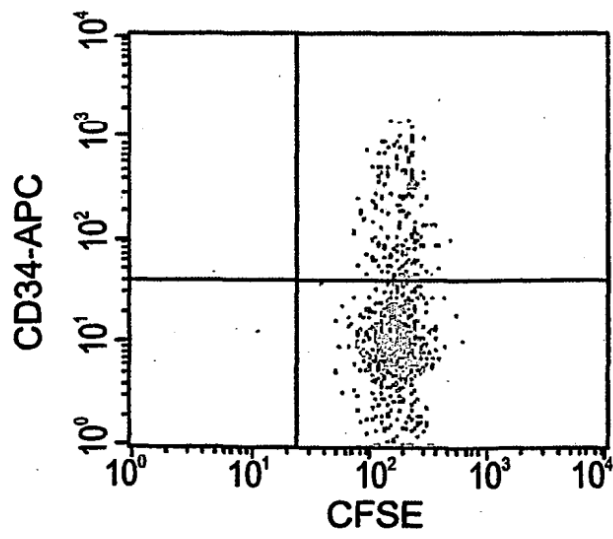


Fig. 1i

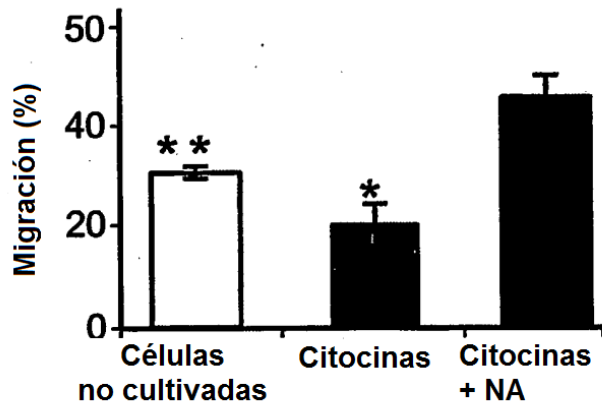
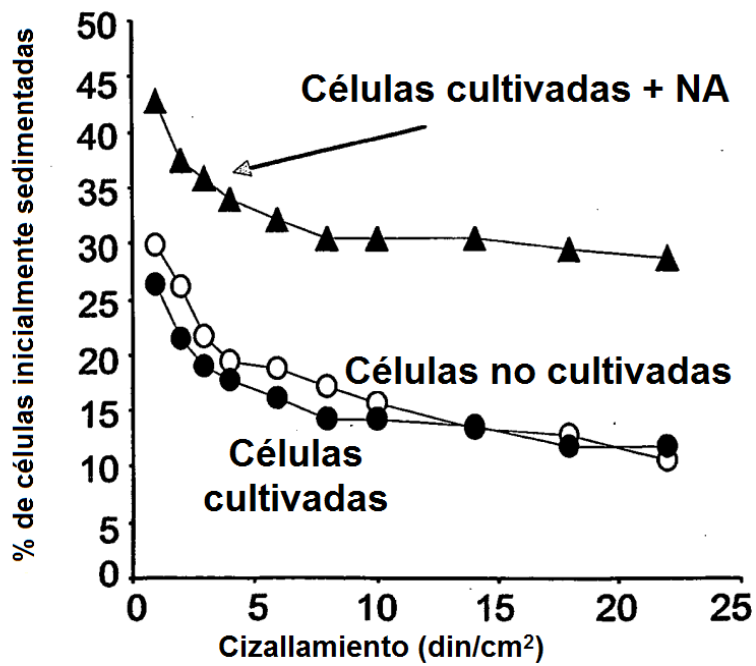


Fig. 2

Unión y retención
mediadas por VLA4



Captura y detención de células CD34+
por VCAM-1 inmovilizada (0,5 µg/ml)
bajo flujo de cizalla

Fig. 3

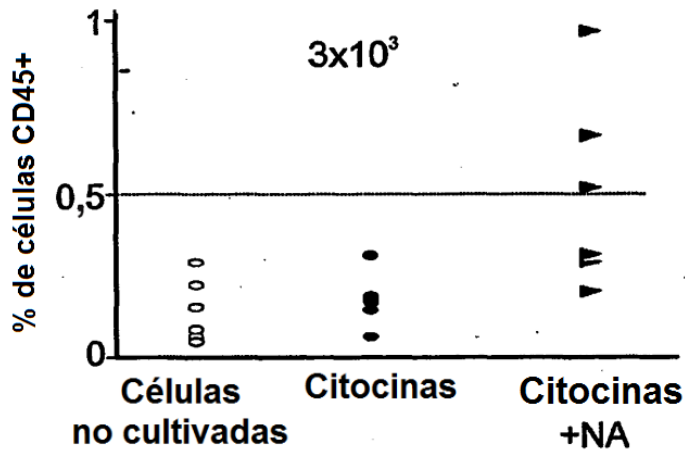


Fig. 4a

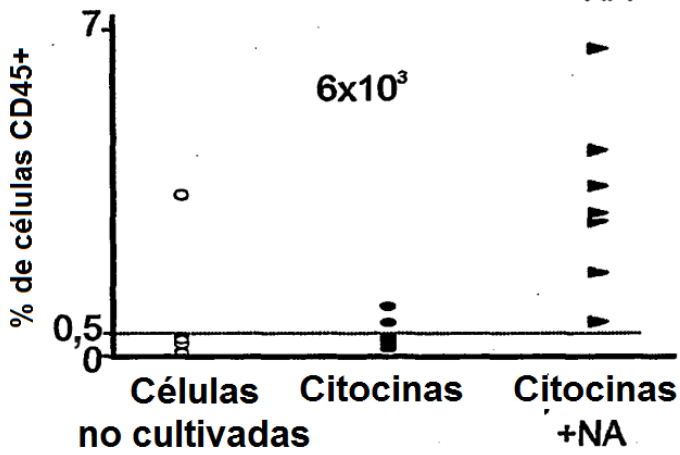


Fig. 4b

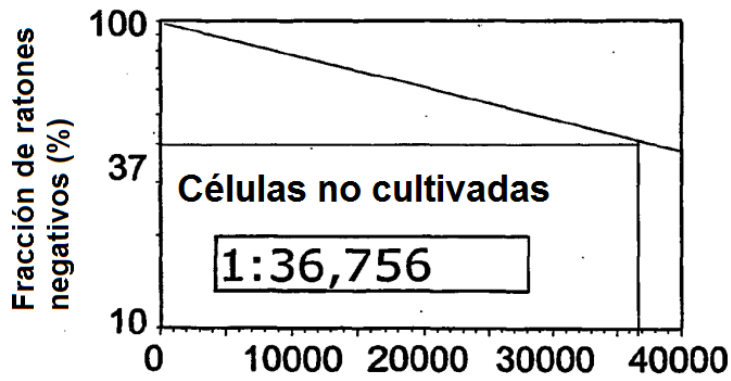


Fig. 4c

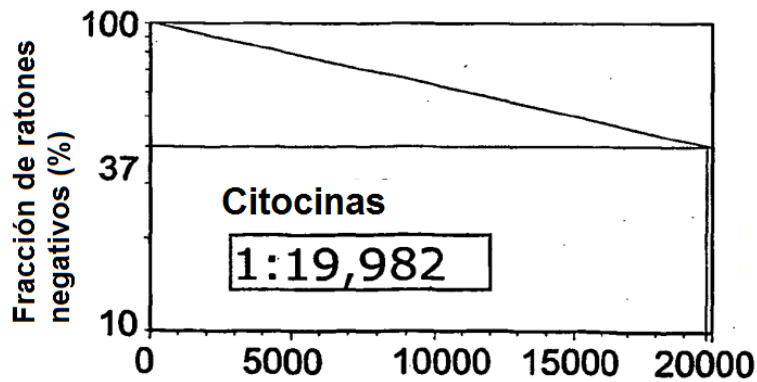


Fig. 4d

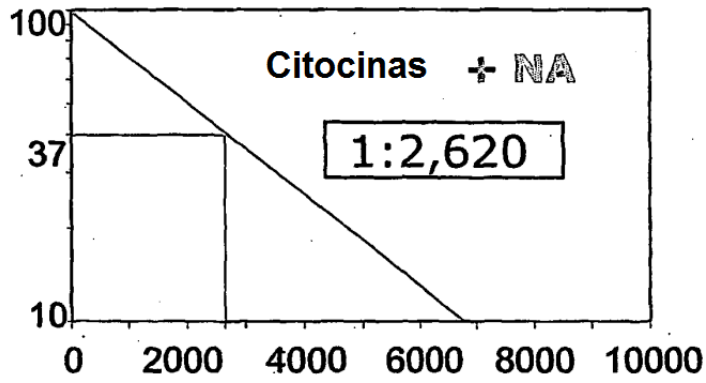


Fig. 4e

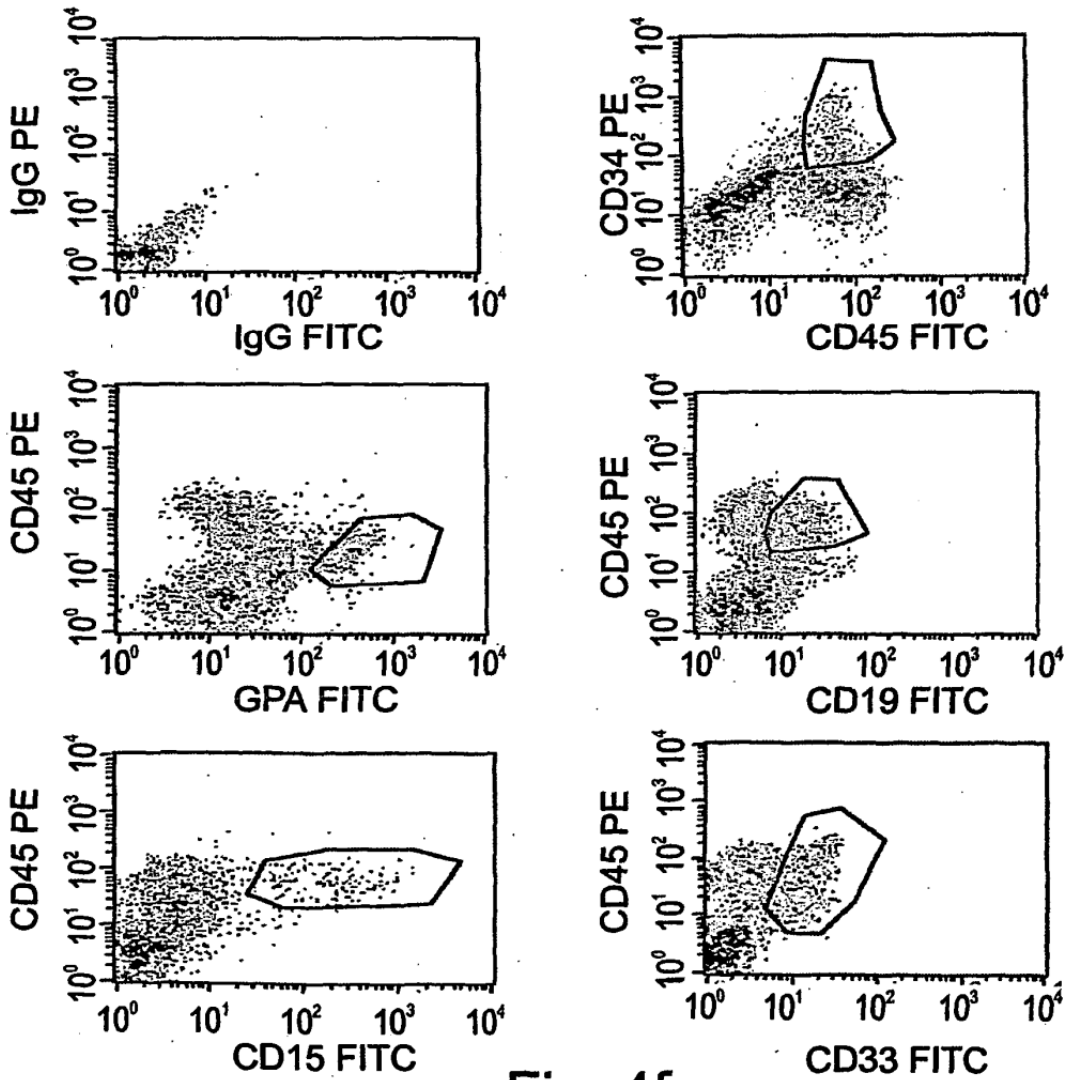


Fig. 4f

Ratones injertados		
Células transplantadas (Equivalente de entrada)	Citocinas	Citocinas +NA
5,0 x 10 ⁴	3/4	4/4
2,5 x 10 ⁴	1/4	4/4
1,25 x 10 ⁴	2/5	5/5

Fig. 5a

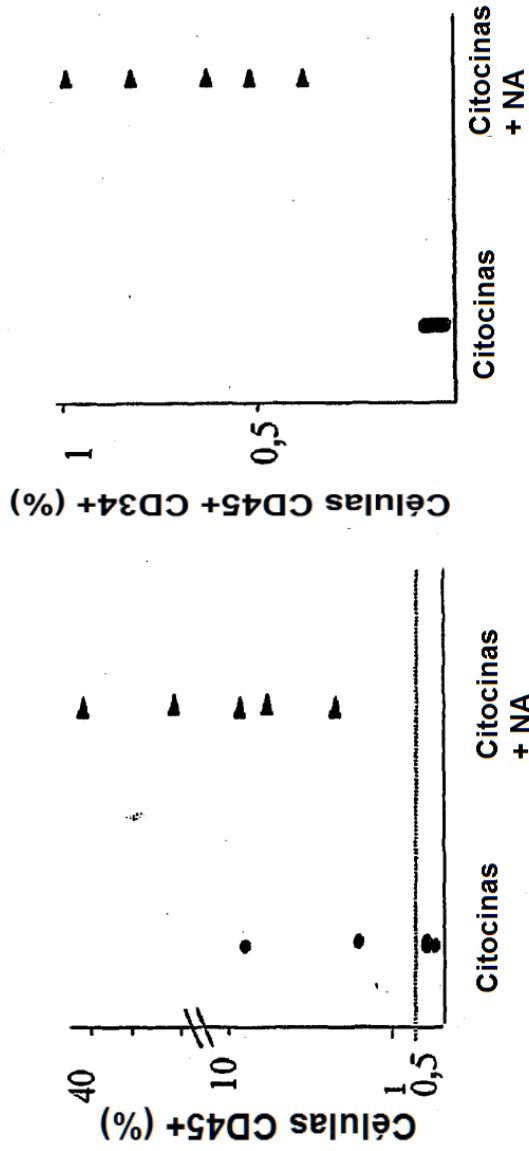


Fig. 5b

Fig. 5c