

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 581**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2003 PCT/US2003/11327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2003 WO03087392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2003 E 03721642 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 1551953**

54 Título: **Modulación de la diferenciación de citoblastos y células progenitoras, ensayos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.04.2002 US 372348 P
31.12.2002 US 437348 P
31.12.2002 US 437350 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2017

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (33.0%)
86 Morris Avenue
Summit, NJ 07901, US;
ANTHROGENESIS CORPORATION (33.0%) y
SIGNAL PHARMACEUTICALS, LLC (33.0%)

72 Inventor/es:

HARIRI, ROBERT, J.;
STIRLING, DAVID, I.;
CHAN, KYLE, W., H. y
MOUTOUH-DE PARSEVAL, LAURE, A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 604 581 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

Modulación de la diferenciación de citoblastos y células progenitoras, ensayos y usos de los mismos

Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de EE.UU. n° 60/372.348, presentada el 12 de abril de 2002; 60/437.348, presentada el 31 de diciembre de 2002 y 60/437.350, presentada el 31 de diciembre de 2002.

1. INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere a métodos de modulación de la diferenciación de citoblastos y/o células progenitoras de mamífero. Los métodos de la invención pueden emplearse para regular y controlar la diferenciación y maduración de citoblastos y células progenitoras de mamífero, particularmente de ser humano, a lo largo de linajes celulares y tisulares específicos. Los métodos de la invención se refieren al uso de ciertas moléculas orgánicas pequeñas para modular la diferenciación de poblaciones de citoblastos a lo largo de linajes celulares y tisulares específicos, y en particular a la diferenciación de citoblastos de tipo embrionario originados en una placenta postparto, o a la modulación de células progenitoras hematopoyéticas tempranas a lo largo de una ruta de diferenciación específica, particularmente una ruta de diferenciación granulocítica. La invención se refiere también al uso de estas moléculas orgánicas para modular la diferenciación de linajes particulares de células progenitoras, tales como células progenitoras CD34+, CD45+ y CD133+. La invención se refiere también a aspectos temporales del desarrollo de células progenitoras y a modelos *in vitro* basados en estos aspectos temporales. La invención se refiere además al uso de estas células moduladas en métodos profilácticos y terapéuticos, incluyendo en composiciones farmacéuticas de dichas células y/o compuestos orgánicos pequeños. Finalmente, la invención se refiere al uso de dichas células diferenciadas en trasplantes y otros tratamientos médicos.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Hay un considerable interés por la identificación, aislamiento y generación de citoblastos y células progenitoras humanos. Los citoblastos son células precursoras totipotenciales o pluripotenciales capaces de generar una variedad de linajes celulares maduros, y las células precursoras son células capaces de generar células de linajes celulares específicos. Estas capacidades sirven como base para la diferenciación y especialización celulares necesarias para el desarrollo de órganos y tejidos.

El reciente éxito al trasplantar citoblastos y células progenitoras ha proporcionado nuevas herramientas clínicas para reconstituir y/o suplementar la médula ósea después de mieloablación debida a enfermedad, exposición a productos químicos tóxicos y/o radiación. Existen evidencias adicionales que demuestran que los citoblastos pueden emplearse para repoblar muchos, si no todos, los tejidos y restaurar la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de citoblastos en ingeniería de tejidos, suministro de terapia génica y terapia celular está también avanzando rápidamente.

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de citoblastos progenitores de mamífero. Por ejemplo, son conocidos los citoblastos embrionarios, células germinales embrionarias, citoblastos adultos o citoblastos o células progenitoras comprometidos. Ciertos citoblastos no solo se han aislado y caracterizado, sino que se han cultivado también en condiciones que permiten la diferenciación en un grado limitado. Sin embargo, permanece el problema básico; es decir, ha sido difícil controlar o regular la diferenciación de citoblastos y células progenitoras, tales como células progenitoras hematopoyéticas. Actualmente, los métodos existentes de modulación de la diferenciación de estas células son toscos y no regulables, de tal modo que las células se diferencian en tipos celulares indeseados en momentos indeseados. Además, el rendimiento de las células de producto es típicamente bajo.

Además, es problemático obtener números suficientes de citoblastos humanos con fines de terapia o investigación. El aislamiento de la población de citoblastos o células progenitoras que aparecen normalmente en tejidos adultos ha sido técnicamente difícil y costoso, debido en parte a la cantidad limitada de citoblastos o células progenitoras encontrados en la sangre o tejido, y a la incomodidad significativa implicada en la obtención de aspirados de médula ósea. En general, recolectar citoblastos o células progenitoras de fuentes alternativas en cantidades adecuadas con fines de terapia e investigación es generalmente laborioso implicando, p.ej., recolección de células o tejidos de un sujeto donante o paciente, cultivo y/o propagación de las células *in vitro*, disección, etc. Con respecto a los citoblastos en particular, la adquisición de estas células a partir de embriones o tejido fetal, incluyendo abortos, ha planteado problemas religiosos y éticos. La creencia ampliamente mantenida de que el embrión y feto humanos constituyen vida independiente ha dado lugar a restricciones gubernamentales sobre el uso de dichas fuentes para todos los fines, incluyendo la investigación médica. Son por lo tanto deseables fuentes alternativas que no requieran el uso de células adquiridas a partir de tejido embrionario o fetal para un progreso adicional en el uso de citoblastos clínicamente. Sin embargo, hay pocas fuentes alternativas viables de citoblastos o células progenitoras, particularmente citoblastos o células progenitoras humanos, y por tanto el suministro es limitado.

Hu *et al.* (documento WO00/73421 titulado "Methods of isolation, cryopreservation, and therapeutic use of human amniotic epithelial cells", publicado el 7 de diciembre de 2000), divulga células epiteliales amnióticas humanas derivadas de placenta en el parto que se aíslan, cultivan, crioconservan para uso futuro o se inducen a diferenciar.

Según Hu *et al.*, se recolecta la placenta inmediatamente después del parto y se separa la membrana amniótica del corión, p.ej. mediante disección. Se aíslan las células epiteliales amnióticas de la membrana amniótica según técnicas de aislamiento celular estándares. Las células divulgadas pueden cultivarse en diversos medios, expandirse en cultivo, crioconservarse o inducirse a diferenciar. Hu *et al.* divulga que las células epiteliales amnióticas son multipotenciales (y posiblemente pluripotenciales) y pueden diferenciarse en tejidos epiteliales tales como epitelio de la superficie córnea o epitelio vaginal. El inconveniente de dichos métodos es, sin embargo, que son laboriosos y el rendimiento de citoblastos es muy bajo.

Los métodos actualmente disponibles para la expansión *ex vivo* de poblaciones celulares son también laboriosos. Por ejemplo, Emerson *et al.* (Emerson *et al.*, patente de EE.UU. n° 6.326.198 titulada "Methods and compositions for the *ex vivo* replication of stem cells for the optimization of hematopoietic progenitor cell cultures, and for increasing the metabolism. GM-CSF secretion and/or IL-6 secretion of human stromal cells", expedida el 4 de diciembre de 2001) divulga métodos y condiciones de medio de cultivo para el cultivo *ex vivo* de la división de citoblastos humanos y/o la optimización de citoblastos progenitores hematopoyéticos humanos. Según los métodos divulgados, se cultivan los citoblastos o células progenitoras humanos derivados de médula ósea en un medio de cultivo líquido que se reemplaza, preferiblemente se perfunde continua o periódicamente, a una tasa de 1 ml de medio por ml de cultivo durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas. Se retiran los productos metabólicos y se reponen los nutrientes agotados manteniendo el cultivo en condiciones fisiológicamente aceptables.

Kraus *et al.* (Kraus *et al.*, patente de EE.UU. n° 6.338.942, titulada "Selective expansion of target cell populations", expedida el 15 de enero de 2002) divulga que una población diana predeterminada de células puede expandirse selectivamente introduciendo una muestra de partida de células de sangre de cordón o sangre periférica en un medio de crecimiento, causando que las células de la población celular diana se dividan, y poniendo en contacto las células en el medio de crecimiento con un elemento de selección que comprende moléculas de unión con afinidad específica (tales como un anticuerpo monoclonal de CD34) por una población predeterminada de células (tales como células CD34), para seleccionar células de la población diana predeterminada de las demás células del medio de crecimiento.

Rodgers *et al.* (patente de EE.UU. n° 6.335.195 titulada "Method for promoting hematopoietic and mesenchymal cell proliferation and differentiation", expedida el 1 de enero de 2002) divulga métodos para el cultivo *ex vivo* de citoblastos hematopoyéticos y mesenquimáticos y la inducción de la proliferación y diferenciación celular específica de linaje mediante el crecimiento en presencia de angiotensinógeno, angiotensina I (AI), análogos de AI, fragmentos de AI y análogos de los mismos, angiotensina II (AII), análogos de AII, fragmentos de AII o análogos de los mismos o todos los agonistas de receptor de tipo 2 AT₂, solos o en combinación con otros factores de crecimiento y citocinas. Los citoblastos derivan de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. El inconveniente de dichos métodos es, sin embargo, que dichos métodos *ex vivo* para inducir la proliferación y diferenciación de citoblastos llevan tiempo, como se discute anteriormente, y dan como resultado también un bajo rendimiento de citoblastos.

Los citoblastos y células progenitoras tienen el potencial de usarse en el tratamiento de una variedad de trastornos, incluyendo malignidades, errores congénitos de metabolismo, hemoglobinopatías e inmunodeficiencias. Ha sido un campo de uso e investigación principal que implica citoblastos de sangre de cordón o placenta el uso de dichas células para generar pequeñas cantidades de células para trasplantes de médula ósea y otros relacionados. Sin embargo, hasta la fecha, nadie ha descrito un método de producción de números sustanciales de citoblastos o células progenitoras, tales como células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ humanas. Unos altos números de las últimas células, en particular, facilitarían métodos de tratamiento que usan células progenitoras. Los métodos de la invención divulgados en la presente memoria abordan esta necesidad.

Los retinoides, tales como vitamina A y ácido retinoico (RA), son conocidos por afectar a la diferenciación de citoblastos. Por ejemplo, se ha mostrado que el ácido retinoico inhibe la proliferación de citoblastos hematopoyéticos comprometidos anormalmente (leucemia mielógena crónica) (Nadkarni *et al.* 1984, Tumori 70: 503-505) e induce la diferenciación y pérdida de potencial de autorrenovación en células de leucemia promielocítica (Melchner *et al.*, 1985, Blood 66(6): 1469-1472). Se ha mostrado también que el ácido retinoico induce la diferenciación de neuronas a partir de citoblastos embrionarios y reprime la diferenciación mesodérmica espontánea (Slager *et al.*, Dev. Genet. 1993; 14(3): 212-24, Ray *et al.*, 1997, J. Biol. Chem. 272(30): 18702-18708). Se ha mostrado también que el ácido retinoico induce la diferenciación de precursores de células germinales transformadas (Damjanov *et al.*, 1993, Labor. Investig. 68(2): 220-232), precursores de células placentarias (Yan *et al.*, 2001, Devel. Biol. 235: 422-432) y precursores de células endoteliales (Hatzopoulos *et al.*, 1998, Development 125: 1457-1468). Sin embargo, el efecto de los retinoides sobre la diferenciación tiene que entenderse todavía completamente de tal modo que pueda usarse como medio regulable de control de la diferenciación de citoblastos.

Se han estudiado los efectos de análogos de ácido fólico, tales como aminopterina y ametopterina (metotrexato), sobre la diferenciación de los citoblastos hematopoyéticos. Los análogos de ácido fólico se usan como agentes quimioterapéuticos en anemias linfoblásticas agudas y otros trastornos de la proliferación sanguínea y cánceres, y se ha mostrado que efectúan la diferenciación de citoblastos destruyendo ciertas poblaciones de citoblastos (DeLoia *et al.*, 1998, Human Reproduction 13(4): 1063-1069) y, por tanto, no serían una herramienta eficaz para regular la diferenciación de grandes cantidades de citoblastos para administración a un paciente.

Se ha mostrado también que varias citocinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7 e IL-11, así como proteínas tales como eritropoyetina, ligando Kit, M-CSF y GM-CSF, dirigen la diferenciación de citoblastos en tipos celulares específicos en el linaje hematopoyético (Dushnik-Levinson *et al.*, 1995, *Biol. Neonate* 67: 77-83), sin embargo, estos procesos no se comprenden bien y siguen siendo demasiado toscos e imprecisos para permitir un medio regulable de control de la diferenciación de citoblastos.

Hasta la fecha, nadie ha descrito el uso de compuestos tales como los compuestos inmunomoduladores discutidos a continuación en la diferenciación de citoblastos o células precursoras.

El documento WO 03/086373 A divulga un método de identificación de moduladores de la angiogénesis que utiliza células humanas. Se describen 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona como compuestos antiangiogénicos preferidos.

El documento WO 01/87307 A describe una composición que comprende talidomida que puede usarse en el tratamiento o la prevención de cáncer.

Dredge *et al.* (Keith Dredge, J. Blake Marriott, Stephen M. Todryk, George W. Muller, Roger Chen, David I. Stirling y Angus G. Dalgleish; "Protective Antitumor Immunity Induced by a Costimulatory Thalidomide Analog in Conjunction with Whole Tumor Cell Vaccination Is Mediated by Increased Th1-Type Immunity", *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 4914-4919) demostraron que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona puede cebar respuestas de tipo Th-1 protectoras duraderas específicas de tumor *in vivo*.

En particular, nadie ha demostrado el uso de los compuestos inmunomoduladores discutidos a continuación para modular la diferenciación de células progenitoras, tales como células progenitoras CD34⁺, lejos de un linaje de células dendríticas, una capacidad útil en el fomento de la inmunotolerancia a trasplantes. Igualmente, nadie ha descrito el uso de los compuestos descritos en la presente memoria para expandir las poblaciones de células progenitoras para producir una composición farmacéutica que contenga dichas células. Dichos cultivos de células progenitoras expandidas serían útiles en el tratamiento de la enfermedad del injerto frente al hospedador y el desarrollo de inmunotolerancia. Debido a que el control de la diferenciación de citoblastos y células precursoras puede producir poblaciones celulares que son terapéuticamente útiles, hay una necesidad de la capacidad de controlar y regular la diferenciación de células de linaje celular dendrítico mielóide, o células progenitoras tempranas tales como células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ humanas para la producción controlada de células dendríticas y/o granulocitos.

3. COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona métodos de modulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras de mamífero, particularmente de ser humano. En particular, los métodos de la invención pueden emplearse para regular y controlar la diferenciación y maduración de citoblastos humanos a lo largo de linajes celulares y tisulares específicos. La invención engloba el uso de compuestos orgánicos pequeños inmunomoduladores, más preferiblemente isoindolinas aminosustituidas, particularmente los compuestos 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para efectuar dicha regulación y control. La invención contemplaba además la administración de estos compuestos a células progenitoras en momentos específicos para modular su diferenciación de modos específicos.

La presente invención proporciona un método para suprimir la generación de BFU-E y CFU-E mientras que acrecienta la generación de CFU-GM y potencia la producción de CFU-total, comprendiendo dicho método: poner en contacto citoblastos o células progenitoras de mamífero *in vitro* con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, en condiciones en que se diferencien dichos citoblastos o células progenitoras; y en el que los citoblastos o células progenitoras son CD34⁺ o CD133⁺.

La invención proporciona también un compuesto seleccionado de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para uso en un método de tratamiento de un individuo necesitado de granulocitos, en el que dicho método comprende poner en contacto *in vitro* citoblastos o células progenitoras de mamífero CD34⁺ o CD133⁺ con dicho compuesto en condiciones en que se diferencien dichas células para suprimir la generación de BFU-E y CFU-E, mientras que acrecienta la generación de CFU-GM y potencia la producción de CFU-total, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a dicho individuo.

Los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de un citoblasto o célula progenitora en un linaje celular específico incluyendo, pero sin limitación, un linaje mesenquimático, hematopoyético, adipogénico, hepatogénico, neurogénico, gliogénico, condrogénico, vasogénico, miogénico, condrogénico u osteogénico. En una realización particular, los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de citoblastos en una célula de un linaje hematopoyético.

La invención engloba también la modulación de una célula comprometida con un tipo celular específico, p.ej., una célula mesenquimática, célula hematopoyética, adipocito, hepatocito, neuroblasto, glioblasto, condrocito, progenitor de célula endotelial (EC), miocito, condrocito u osteoblasto. En realizaciones específicas, la invención engloba la modulación de una célula progenitora hematopoyética comprometida a un eritrocito, trombocito o leucocito (glóbulo

blanco) tal como un neutrófilo, monocito, macrófago, eosinófilo, basófilo, mastocito, linfocito B, linfocito T o célula plasmática.

5 En otra realización, los métodos de la invención se refieren a la modulación de la diferenciación de citoblastos en células de linaje hematopoyético, en particular los linajes hematopoyéticos CD34+, CD133+ y CD45+, y a métodos de producción de composiciones farmacéuticas profiláctica o terapéuticamente beneficiosas que contienen dichas células. En otra realización específica, los métodos de la invención se refieren a la modulación de la diferenciación de células progenitoras tempranas en células de linaje celular dendrítico o linaje granulocítico, linaje endotelial o linaje cardiomiocítico.

10 En otra realización, la invención proporciona métodos de regulación de la diferenciación de una célula progenitora en un linaje hematopoyético, particularmente un linaje celular dendrítico o granulocítico, linaje endotelial, linaje neural o linaje cardiomiocítico. En una realización específica, dicha célula progenitora es una célula CD34+ o CD133+. Dichas regulación se logra poniendo en contacto las células progenitoras durante el cultivo con un compuesto de la invención. Dicho compuesto es 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona. La memoria descriptiva divulga también que el compuesto es un inhibidor de la actividad de TNF- α . Se divulga que dicho compuesto es un compuesto inmunomodulador como se describe en la presente memoria o talidomida o una isoindolina aminosustituida.

20 En otra realización específica, los métodos de la invención engloban la supresión de la diferenciación de células progenitoras en una célula dendrítica. En otra realización específica, la invención proporciona un método para la modulación de la diferenciación de células progenitoras durante los seis primeros días de cultivo, produciendo un cultivo expandido de dicha células progenitoras. En otra realización, los métodos de la invención engloban la promoción del desarrollo de células progenitoras tempranas a un granulocito, que puede ser útil para combatir infecciones. El aumento de los progenitores comprometidos con el linaje granulocítico (células CD15⁺) puede ser de uso potencial en la reducción de la neutropenia y sus complicaciones infecciosas subsiguientes que representan la toxicidad limitante de dosis más común de la quimioterapia del cáncer. En otra realización, los métodos de la invención pueden usarse para suprimir la diferenciación de células dendríticas, lo que es útil para mitigar los efectos de la enfermedad del injerto frente al hospedador.

30 Las células progenitoras de la invención, moduladas por un compuesto de la invención, son útiles para trasplantes (concretamente, reconstitución hematopoyética) y pueden usarse en medicina regenerativa como fuente renovable de células y tejidos de reemplazo (tales como células pancreáticas, cardíacas, hepáticas, de riñón, de hígado, de cerebro, de vejiga, intestinales o musculares) para tratar senescencia normal, lesiones o enfermedades tales como enfermedad cardíaca, apoplejía, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Las células serán también útiles en la determinación de las rutas bioquímicas intracelulares que median la acción de los compuestos de la invención. Estas células pueden ser también útiles para el cribado de nuevos fármacos y toxinas, por ejemplo para determinar fármacos anticancerosos potenciales, para entender los orígenes de defectos de nacimiento, etc.

35 Los métodos de la invención pueden usarse para suprimir específicamente la generación de glóbulos rojos o colonias eritropoyéticas (BFU-E y CFU-E), mientras que tanto acrecientan la generación de colonias formadoras de leucocitos y plaquetas (CFU-GM) como potencian la producción de unidades formadoras de colonias totales. Los métodos de la invención pueden usarse no solo para regular la diferenciación de citoblastos y células progenitoras tales como células progenitoras CD34+, sino que pueden usarse también para estimular la tasa de formación de colonias, proporcionando beneficios significativos al trasplante de citoblastos hematopoyéticos al mejorar la velocidad de injerto de médula ósea.

45 Puede usarse cualquier citoblasto de mamífero de acuerdo con los métodos de la invención incluyendo, pero sin limitación, citoblastos aislados de sangre de cordón, placenta y otras fuentes. Los citoblastos pueden aislarse de cualquier especie de mamífero, p.ej., ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, perro, gato, cerdo, oveja, vaca, caballo, mono, etc., más preferiblemente un ser humano. Los citoblastos pueden incluir células pluripotentes, concretamente, células que tienen una versatilidad de diferenciación completa, que son autorrenovables y que pueden permanecer durmientes o quiescentes en el tejido. Los citoblastos pueden incluir también células multipotentes o células progenitoras comprometidas. En una realización preferida, la invención utiliza citoblastos que son citoblastos viables quiescentes pluripotentes que existen en, o se producen después por, la placenta a término, es decir, dichas células pueden recuperarse después de un nacimiento exitoso y expulsión de placenta, desangramiento y perfusión de la placenta, dando como resultado la producción y recuperación del orden de mil millones de células nucleadas, que procuran de 50 a 100 millones de citoblastos multipotentes y pluripotentes. Se hace referencia a dichas células en la presente memoria como citoblastos placentarios humana o citoblastos de tipo embrionario.

55 En una realización particular de la invención, se exponen las células, por ejemplo células endógenas de médula ósea o de una placenta perfundida postparto incluyendo, pero sin limitación, citoblastos de tipo embrionario, células progenitoras tales como células CD34+ o CD133+, células pluripotentes y células multipotentes, a los compuestos de la invención y se inducen a diferenciar. Las células endógenas pueden propagarse *in vitro*. En otra realización, las células endógenas pueden recogerse de la placenta y del medio de cultivo y cultivarse *in vitro* en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación en el tipo o linaje celular deseado.

En otra realización de la invención, los citoblastos o células progenitoras derivan de otras fuentes tales como sangre de cordón, sangre periférica o sangre de adulto, y se exponen a los compuestos de la invención y se inducen a diferenciar. En una realización preferida, se realiza la diferenciación *in vitro* en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación en el linaje o tipo celular deseado. Los compuestos de la invención se usan en los medios de diferenciación/cultivo mediante adición, generación *in situ* o de cualquier otra manera que permita el contacto de los citoblastos o células progenitoras con los compuestos de la invención.

Se ha descubierto que el momento de la administración de los compuestos de la invención tiene un profundo impacto sobre la diferenciación de las células progenitoras CD34⁺. Por tanto, en una realización de la invención, la diferenciación de células progenitoras CD34⁺ en células dendríticas se retarda o suprime mediante un método que comprende poner en contacto la célula progenitora el primer día de cultivo con un compuesto de la invención. En otra realización, se reduce o previene el desarrollo de células CD1a⁺ a partir de células progenitoras CD34⁺ mediante un método que comprende poner en contacto dichas células progenitoras con un compuesto de la invención el primer día de cultivo. En otra realización, se aumenta la persistencia de una población de células CD1a⁺ derivadas de células progenitoras CD34⁺ poniendo en contacto dichas células progenitoras con un compuesto de la invención después de cultivar dichas células progenitoras durante seis días en ausencia de dicho compuesto.

La presente invención engloba también métodos de modulación de la diferenciación de células progenitoras tempranas, tales como células CD34⁺ y CD133⁺ humanas, que comprenden poner en contacto las células progenitoras en diversos momentos durante las fases proliferativa y diferenciativa con uno o más de los compuestos de la invención. Por tanto, en una realización, la invención engloba un método de modulación de la diferenciación de las células progenitoras que comprende poner en contacto dichas células con uno o más compuestos de la invención el primer día de cultivo solo. En otra realización, se ponen en contacto dichas células con dicho compuesto o compuestos en una dosis cualquier día entre el primer día y el duodécimo día de cultivo. En otra realización, se ponen en contacto dichas células al menos dos veces con dicho compuesto o compuestos, en días diferentes, entre los días 0-12 inclusive. En aún otra realización, se ponen en contacto dichas células con uno o más compuestos dos veces al día, una vez al día o una vez cada dos días durante las fases proliferativa y/o de diferenciación. En otra realización, se efectúa dicho contacto *in vitro*. En aún otra realización, se efectúa dicho contacto *in vivo* en un sujeto. En una realización más específica, dicho sujeto es un ser humano, un mamífero no humano, un ave o un reptil.

En suma, la exposición de citoblastos o células progenitoras endógenos o exógenos que pueden cultivarse en una placenta perfundida postparto a compuestos de la invención puede ocurrir mientras se cultivan las células en la placenta, o preferiblemente, puede ocurrir *in vitro* después de recuperar y retirar las células de la placenta.

La memoria descriptiva divulga el uso de compuestos que tienen actividad de TNF- α como moduladores del desarrollo de citoblastos y/o células progenitoras. En realizaciones específicas, los compuestos son compuestos inmunomoduladores tales como las clases de compuestos conocidos como IMIDTM, incluyendo pero sin limitación análogos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (Celgene Corp., Warren, NJ) y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (Celgene Corp., Warren, NJ).

La memoria descriptiva divulga también el trasplante de citoblastos o células progenitoras pretratados para tratar o prevenir la enfermedad. En una realización, se administra también a un paciente necesitado de trasplante un compuesto de la invención antes, durante y/o después del trasplante.

La memoria descriptiva divulga además el uso de una célula progenitora o tipo de célula específico producido en un método de la invención. En otras palabras, la memoria descriptiva divulga el uso de leucocitos, granulocitos o células dendríticas elaborados a partir de la diferenciación de un progenitor hematopoyético, siempre que dicha diferenciación del progenitor esté modulada o regulada usando un compuesto de la invención.

En otras realizaciones, la invención engloba un citoblasto y un compuesto de molécula pequeña de la invención para uso en el control o regulación de citoblastos *in vivo* mediante la administración tanto de un citoblasto como de un compuesto de molécula pequeña de la invención a un paciente necesitado de ello.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ que se han puesto en contacto con un compuesto de la invención, particularmente uno que inhibe la actividad de TNF- α , en los seis primeros días de cultivo, en condiciones que promuevan la proliferación y diferenciación de dichas células progenitoras, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la composición farmacéutica incluye células que se han recogido y crioconservado después de seis días de cultivo. En otra realización específica, las células de la composición farmacéutica son células CD34⁺CD38⁻CD34⁻ o CD34⁺CD38⁺CD34⁺. En otra realización específica, el compuesto con el que se ponen en contacto las células es un compuesto inmunomodulador de la invención, o talidomida o un análogo de talidomida. En otra realización específica, el compuesto con el que se ponen en contacto las células es 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona.

En otra realización, la invención proporciona también un método para preparar una composición farmacéutica que comprende poner en contacto células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, en el que dichas células

progenitoras se cultivan durante seis días en un medio de cultivo y en condiciones que permitan la proliferación y diferenciación de dichas células progenitoras; recoger dichas células después de seis días de cultivo y combinar dichas células con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica de este método, se efectúa dicha puesta en contacto el primer día de cultivo. En otra realización específica de este método, se efectúa dicha puesta en contacto al menos dos veces durante dichos seis días de cultivo. La memoria descriptiva divulga también que dicho compuesto es un compuesto inmunomodulador pequeño de la invención. En aún otra realización específica de este método, se han aislado dichas células progenitoras de otras células sanguíneas antes de dicho cultivo. En otra realización específica de este método, dicho medio de cultivo contiene adicionalmente GM-CSF y TNF- α . En una realización más específica de este método, dicha 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona está presente a una concentración de entre 0,1 y 10,0 μ M. En otra realización más específica de este método, dicha 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona está presente a una concentración de 1,0 μ M. En otra realización específica de este método, dichas células se crioconservan después de dicha recogida.

La invención proporciona además 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para uso en un método para expandir una población de células progenitoras en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células progenitoras CD34+ o CD133+ y cualquiera de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona a dicho sujeto mamífero receptor. En una realización específica de este método, se diferencian dichas células progenitoras en el sujeto mamífero receptor. En otra realización específica de este método, se administran dichas células progenitoras a dicho sujeto en una preparación celular que está sustancialmente exenta de glóbulos rojos. En otra realización específica de este método, se administran dichas células progenitoras al sujeto mamífero receptor en una preparación celular que comprende células de médula ósea, células de placenta, células de sangre de cordón o PBMC. En otra realización específica de este método, se administran dichas células progenitoras al sujeto mamífero receptor junto con un portador. En otra realización específica de este método, dicha célula progenitora es una célula progenitora CD34+CD133+. En otra realización específica de este método, las células progenitoras expresan material genético incorporado de interés.

La presente invención proporciona también células que se producen mediante los métodos anteriores que son útiles como composiciones farmacéuticas.

En aún otras realizaciones, la invención engloba métodos de acondicionamiento de citoblastos o células progenitoras, por ejemplo células progenitoras CD34+, después de crioconservación y descongelación, para contrarrestar los efectos dañinos de la crioconservación y exposición a crioconservantes sobre los citoblastos. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos de acondicionamiento de citoblastos después de crioconservación y descongelamiento, para contrarrestar los efectos dañinos de la exposición a crioconservantes (p.ej., DMSO) sobre la capacidad proliferativa y migratoria de los citoblastos.

3.1. DEFINICIONES

Como se usa en la presente memoria, el término "biorreactor" hace referencia a un sistema *ex vivo* para propagar células, producir o expresar materiales biológicos y hacer crecer o cultivar tejidos celulares, organoides, virus, proteínas, polinucleótidos y microorganismos.

Como se usa en la presente memoria, "células DC" hace referencia a células dendríticas.

Como se usa en la presente memoria, "célula progenitora temprana" significa una célula progenitora CD34+, una célula progenitora CD133+ o el equivalente de mamífero, ave o reptil de cualquiera.

Como se usa en la presente memoria, el término "citoblasto embrionario" hace referencia a una célula que deriva de la masa celular interna de un blastocito (p.ej., un embrión humano de 4 a 5 días de edad) y que es pluripotente.

Como se usa en la presente memoria, el término "citoblasto de tipo embrionario" hace referencia a una célula que no deriva de la masa celular interna de un blastocito. Como se usa en la presente memoria, un "citoblasto de tipo embrionario" puede hacer referencia también a un "citoblasto placentario". Un citoblasto de tipo embrionario es preferiblemente pluripotente. Sin embargo, los citoblastos que pueden obtenerse de la placenta incluyen citoblastos de tipo embrionario, células multipotentes y células progenitoras comprometidas. Según los métodos de la invención, los citoblastos de tipo embrionario derivados de la placenta pueden recogerse de la placenta aislada una vez se ha desangrado y perfundido durante un periodo de tipo suficiente para retirar las células residuales. Preferiblemente, los citoblastos de tipo embrionario son humanos, aunque pueden derivar de cualquier mamífero.

Como se usa en la presente memoria, el término "desangrado" o "desangramiento", cuando se usa con respecto a la placenta, hace referencia a la retirada y/o drenaje de sustancialmente toda la sangre de cordón de la placenta. De acuerdo con la presente invención, el desangramiento de la placenta puede conseguirse, por ejemplo, pero no a modo de limitación, mediante drenaje, flujo de salida inducido por la gravedad, masaje, aplastamiento, bombeo, etc. En una realización preferida, el desangramiento de la placenta puede conseguirse además por perfusión, enjuagado o aclarado de la placenta con un fluido que puede contener o no agentes tales como anticoagulantes para ayudar al

desangramiento de la placenta.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "perfundir" o "perfusión" hace referencia al acto de verter o pasar un fluido sobre o a través de un órgano o tejido, preferiblemente el paso de fluido a través de un órgano o tejido, con suficiente fuerza o presión para retirar cualquier célula residual, p.ej., células no adheridas del órgano o tejido. Como se usa en la presente memoria, el término "perfundido" hace referencia al fluido recogido después de este paso a través de un órgano o tejido. En una realización preferida, el perfundido contiene uno o más anticoagulantes.

Como se usa en la presente memoria, el término "célula endógena" hace referencia a una célula "no ajena", concretamente una célula propia o autóloga que deriva de la placenta.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "célula exógena" hace referencia a una célula "ajena", concretamente una célula heteróloga (concretamente, una célula "no propia" derivada de una fuente distinta del donante de placenta) o autóloga (concretamente, una célula "propia" derivada del donante de placenta) que deriva de un órgano o tejido distinto de la placenta.

Como se usa en la presente memoria, "compuesto inmunomodulador" hace referencia a los compuestos divulgados en la sección 5.3 siguiente.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "organoide" hace referencia a una agregación de uno o más tipos celulares ensamblados con una apariencia superficial o una estructura real como cualquier órgano o glándula del cuerpo de mamífero, preferiblemente el cuerpo humano.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "célula multipotente" hace referencia a una célula que tiene la capacidad de crecer en cualquiera de un subconjunto de los aproximadamente 260 tipos celulares del cuerpo de mamífero. Al contrario que una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos celulares.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "célula pluripotente" hace referencia a una célula que tiene una versatilidad de diferenciación completa, concretamente, la capacidad de crecer en cualquiera de los aproximadamente 260 tipos celulares del cuerpo de mamífero. Una célula pluripotente puede ser autorrenovadora y puede permanecer durmiente o quiescente en un tejido. Al contrario que una célula totipotente (p.ej., un óvulo diploide fertilizado), un citoblasto embrionario no puede formar habitualmente un blastocito nuevo.

Como se usa en la presente memoria, el término "célula progenitora" hace referencia a una célula que está comprometida a diferenciación en un tipo específico de célula o a formar un tipo específico de tejido.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "citoblasto" hace referencia a una célula maestra que puede reproducirse infinitamente formando células especializadas de tejidos y órganos. Un citoblasto es una célula de desarrollo pluripotente o multipotente. Un citoblasto puede dividirse produciendo dos citoblastos hijos o un citoblasto hijo y una célula progenitora ("transitoria") que prolifera entonces en células formadas totalmente maduras del tejido.

Como se usa en la presente memoria, el término "célula totipotente" hace referencia a una célula que es capaz de formar un embrión completo (p.ej., un blastocito).

35 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Gráfico de barras que indica los resultados de cultivar células CD34+ de cordón en presencia de talidomida (THD), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml. Se usó un volumen igual de DMSO como control negativo. Se puntuaron las colonias hematopoyéticas de unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E), unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM) y números totales de colonias (CFU-Total) bajo el microscopio óptico el día 14 de cultivo. Eje Y: Números de colonias. Véase la sección 6.1 para detalles.

45 FIG. 2(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona inhibe la eritropoyesis y expansión de células CD34+CD38-. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican los porcentajes de población celular que expresan una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Talidomida ("Thal") (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de la tinción de Gly-A (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de la tinción de CD34 (F 2-H). Véase la sección 6.1 para detalles.

50 FIG. 3(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona inhibe la expresión de CXCR4 en células CD34+ de sangre de cordón humanas a los 14 días de cultivo con las citocinas IL3,

KL y G-CSF. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, células CD45+. C. DMSO (0,3 µg/ml). D. Thal (0,3 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (0,3 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (0,3 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de la tinción de CD34 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de la tinción de CXCR4 (FL2-H). Véase la sección 6.2 para detalles.

FIG. 4(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona estimula la expansión de poblaciones de células CD34+ y/o CD34+CD38-. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, GCSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (0,3 µg/ml). D. Thal (0,3 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (0,3 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (0,3 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de la tinción de CD38 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de la tinción de CD34 (FL2-H). Véase la sección 6.2 para detalles.

FIG. 5(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona produce una conservación significativa de las células progenitoras de sangre de cordón humanas. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Thal (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de la tinción de CD38 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de la tinción de CD34 (FL2-H). Véase la sección 6.2 para detalles.

FIG. 6(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona inhibe la expresión de CXCR4 y expande la población de células CD45+. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Thal (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CD45 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CXCR4 (FL2-H). Véase la sección 6.2 para detalles.

FIG. 7(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona produce una expansión del número de células progenitoras CD34+ y aumenta la producción de granulocitos y monocitos. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Thal (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CD11b (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CD34 (FL2-H). Véase la sección 6.2 para detalles.

FIG. 8(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona expande las células progenitoras CD34+ y contrarresta la represión mediada por DMSO de la producción de monocitos. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Thal (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CD14 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CD34 (FL2-H). Véase la sección 6.3 para detalles.

FIG. 9(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona muestra efectos supresores menores sobre la diferenciación de linfocitos B. Se cultivaron células CD45+ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Thal (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CD38 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CD19 (FL2-H). Véase la sección 6.3 para detalles.

FIG. 10(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células CD45+ de sangre de cordón humanas a 4-(amino)-2-

(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona supera la represión de CXCR5 producida por la exposición a DMSO. Se cultivaron células CD45⁺ de sangre de cordón durante 14 días con las citocinas IL3, IL6, G-CSF, Epo y KL. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. Thal (5 µg/ml). E. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). F. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CXCR5 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CD34 (FL2-H). Véase la sección 6.3 para detalles.

FIG. 11(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de células mononucleadas de sangre de cordón (MNC) humanas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona aumenta la población de células CD34⁺CD38⁺. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). E. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CD38 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CD34 (FL2-H). Véase la sección 6.3 para detalles.

FIG. 12(A-F). Citogramas de flujo. La exposición de MNC a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona regula negativamente la población de células CXCR4⁺CD45⁺, pero aumenta la población de células CXCR4⁺CD45⁻. Los porcentajes indicados en cada citograma indican el porcentaje de población celular que expresa una combinación particular de marcadores. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. Control, sin compuesto añadido. C. DMSO (5 µg/ml). D. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). E. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Eje X: Intensidad relativa de tinción de CD45 (FL1-H). Eje Y: Intensidad relativa de tinción de CXCR4 (FL2-H). Véase la sección 6.3 para detalles.

FIG. 13(A-E). Citogramas de flujo. Efecto de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre el compromiso de linaje de progenitores hematopoyéticos diferenciadores en la fracción celular nucleada de sangre de cordón umbilical. Los citogramas de flujo muestran que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona aumentan el porcentaje de células de linaje monocítico en comparación con el control, indicando que hay una modulación de la diferenciación que se desplaza hacia linajes que dan lugar a células linfoides y mieloides. A. Control, inmunoglobulina (Ig). B. DMSO (5 µg/ml). C. Thal (5 µg/ml). D. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (5 µg/ml). E. 3-(4-Amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 µg/ml). Véase la sección 6.4 para detalles.

FIG. 14. Resumen del estudio del efecto de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona sobre la diferenciación de células CD34⁺ y la maduración en células DC. Se cultivaron las células CD34⁺ en presencia o ausencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona 1,0 µM y DMSO (dimetilsulfóxido) durante cualquiera de la fase de expansión y maduración (día 1 a día 12) o durante la fase de maduración (día 6 a día 12). Se valoraron los marcadores inmunohistoquímicos el día 6 o el día 12 usando anticuerpos monoclonales conjugados con FITC y PE. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 15(A-D). Citogramas de flujo que muestran las características fenotípicas de células CD34⁺ el día 6 expuestas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona desde el día 1. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona suprime casi completamente el desarrollo de células CD86⁺CD1a⁺. Se marcaron doblemente las células con CD1a FITC y CD14 PE o CD1a FITC y CD86 PE. A: Células CD86⁺CD1⁺ generadas a partir de células CD34⁺ tratadas con DMSO (control). B: Células CD14⁺CD1⁺ generadas a partir de células CD34⁺ tratadas con DMSO (control). C: Células CD86⁺CD1⁺ generadas a partir de células CD34⁺ tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. D: Células CD14⁺CD1⁺ generadas a partir de células CD34⁺ tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. Los porcentajes en cada citograma indican el porcentaje de células que expresan una combinación particular de marcadores. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 16(A-D). Citogramas de flujo que muestran el efecto de la exposición a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona el día 6 durante la fase de expansión (día 1 a día 6) sobre células CD34⁺. Las células CD34⁺CD38⁻ expuestas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona se diferenciaban en células CD34⁺CD38⁺CD33⁺ después de 6 días. Se marcaron doblemente las células con CD33 FITC y CD83 PE o C38 PE y CD34 PE. A: Células tratadas con DMSO y marcadas para CD34 y CD38. B: Células tratadas con DMSO y marcadas para CD83 y CD33. C: Células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y marcadas para CD34 y CD38. D: Células tratadas con. Los porcentajes en cada citograma indican el porcentaje de células que expresan una combinación particular de marcadores. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 17. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona induce un desplazamiento en las poblaciones celulares derivadas de células CD34⁺ del día de cultivo 0 al día 6. Se cultivaron las células del día 0 al día 6 en presencia de diferentes concentraciones de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona, se marcaron doblemente entonces con CD34 y CD38 o CD1a y CD14. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona causa un marcado aumento de las células CD34⁺CD38⁻ y una disminución de las células CD1a⁺CD14⁻. Véase la

sección 6.6 para detalles.

FIG. 18. Modificaciones fenotípicas el día 6 de células CD34⁺ tratadas durante diversos tiempos con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. Se sembraron las células y se cultivaron durante 6 días. Se trataron las células con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona del día 0 al día 1 solo, del día 0 al día 2 solo, del día 0 al día 3 solo, del día 0 al día 4 solo, del día 0 a día 5 solo o del día 0 al día 6 solo. Para incubaciones de menos de 6 días, se eliminó por lavado la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona el día indicado y se resuspendieron las células en DMSO. A los 6 días, se marcaron las células con CD34 y CD38 o CD1a y CD14. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 19(A-B). Modificaciones fenotípicas el día 6 de células progenitoras CD34⁺ tratadas con una dosis única o múltiple de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. FIG. 19A: Condición 1: dosis única de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona el día 0; condición 2: 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona administrada el día 0 y el día 4; condición 3: 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona administrada el día 0, el día 2 y el día 4. El eje Y indica el porcentaje de células que expresan el marcador particular o combinación de marcadores. FIG. 19B: Condición 1: dosis única de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona el día 0; condición 2: 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona administrada el día 0, el día 4, el día 6 y el día 8; condición 3: 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona administrada el día 0, el día 2, el día 4, el día 6 y el día 8. Se valoró en las células la expresión de CD11c y CD15, un marcador granulocítico. El eje Y indica el porcentaje de células CD11c⁺CD15⁺ y CD11c⁻CD15⁺ puestas en contacto con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o DMSO (control). Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 20(A-F). Citogramas de flujo de células dendríticas el día 12 generadas a partir de células CD34⁺ expuestas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (1 μM) del día 1 al día 12. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona causa la disminución de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 el día 12 en comparación con el control. Se marcaron doblemente las células con anticuerpos de CD1a FITC y CD86 PE, anticuerpos de CD1a FITC y CD80 PE o anticuerpos de CD1a FITC y CD14 PE. A: Células tratadas con DMSO y teñidas el día 12 para CD86 y CD1a. B: Células tratadas con DMSO y teñidas el día 12 para CD80 y CD1a. C: Células tratadas con DMSO y teñidas el día 12 para CD14 y CD1a. D: Células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y teñidas el día 12 para CD86 y CD1a. E: Células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y teñidas el día 12 para CD80 y CD1a. F: Células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y teñidas el día 12 para CD14 y CD1a. Los porcentajes en cada citograma indican el porcentaje de células que expresan una combinación particular de marcadores. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 21(A-D). Citogramas de flujo de células dendríticas el día 12 generadas a partir de células CD34⁺ expuestas a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (1 μM) del día 1 al día 12. La exposición a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona da como resultado una modulación de la expresión de la molécula de adhesión CD54, causando una disminución de la expresión de CD54^{bright} y un aumento de la expresión de CD54^{dim} respecto al control (comparar los subpaneles B y F en la FIG. 21D). A: Células tratadas con DMSO y teñidas para HLA-DR y con IgG1. B: Células tratadas con DMSO y teñidas para CD54 y CD40. C: Células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y teñidas para HLA-DR y con IgG1. D: Células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y teñidas para CD54 y CD40. Los porcentajes en cada citograma indican el porcentaje de células que expresan una combinación particular de marcadores. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 22(A-B). La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona promueve la diferenciación granulocítica de células progenitoras CD34⁺. Citogramas de flujo de células CD34⁺ crecidas durante 12 días en presencia de DMSO (FIG. 22A) o 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (FIG. 22B), y marcadas entonces con anticuerpo del marcador granulocítico CD15. Los porcentajes en cada citograma indican el porcentaje de células que expresan una combinación particular de marcadores. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 23(A-D). La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona no induce la apoptosis de precursores de CD1a⁺ o CD14⁺. Citogramas de flujo de células aisladas CD1a⁺CD14⁻ y CD1a⁻CD14⁺ (progenitores de DC). Se cultivaron células progenitoras CD34⁺ durante un periodo de 6 días en presencia de SCF, Flt-3L, GM-CSF y TNF-α. El día 6, se aislaron las células CD1a⁺CD14⁻ y CD1a⁻CD14⁺ mediante clasificación celular magnética (Miltenyi) y se cultivaron las poblaciones de CD1a⁺CD14⁻ y CD1a⁻CD14⁺ purificadas durante 2 días adicionales en presencia de GM-CSF y TNF-α con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona (1 μM). Se monitorizaron entonces las células apoptóticas usando tinción con anexina V-FITC, un marcador de apoptosis, en combinación con yoduro de propidio (PI), una sonda de viabilidad. Los porcentajes en cada citograma indican el porcentaje de células de tinción positiva por anexina V-FITC y/o yoduro de propidio. El número de células positivas de anexina V-FITC era comparable en las células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y de control (comparar particularmente B3 y B4 en cada citograma). A: Células CD1a⁺CD14⁻ tratadas con DMSO. B: Células CD1a⁺CD14⁻ tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. C: Células CD1a⁻CD14⁺ tratadas con DMSO. D: Células CD1a⁻CD14⁺ tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 24(A-D). Citogramas de flujo de células CD34⁺ crecidas durante 12 días en presencia o ausencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona causa una disminución de la endocitosis mediada por receptor de manosa, como se demuestra por la captación disminuida de dextrano marcado con FITC respecto al control de DMSO. A: DMSO y 4 °C. B: 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 4 °C. C: DMSO y 37 °C. B. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 37 °C. El porcentaje en cada citograma indica la fracción de células que exhiben endocitosis. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 25(A-D). Citogramas de flujo de células CD34⁺ cultivadas durante 12 días y cultivadas en presencia o ausencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona los días 6-12. El cultivo en presencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona los días 6-12, después de cultivo los días 1-5 en ausencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona, da como resultado una endocitosis mediada por receptor de manosa comparable a la del control de DMSO. El porcentaje en cada citograma indica la fracción de células que exhiben endocitosis. A: DMSO y 4 °C. B: 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 4 °C. C: DMSO y 37 °C. B. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 37 °C. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 26. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona reduce la capacidad de las células CD34⁺ cultivadas durante 12 días de presentar antígeno. Se cultivaron células CD34⁺ durante 12 días en presencia o ausencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. Las células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona el día 12 muestran un índice de estimulación sustancialmente disminuido en comparación con el control de DMSO. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 27. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona tiene poca actividad de reducción de APC sobre células CD34⁺ cultivadas en 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona del día 6 al día 12. Se cultivaron las células CD34⁺ durante cinco días y se cultivaron entonces en presencia o ausencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona. La capacidad presentadora de antígeno de las células tratadas es comparable a la de las células tratadas con DMSO de control. Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 28. Ruta de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ cultivadas en presencia de GM-CSF y TNF- α .

FIG. 29. Gráfica resumen que muestra el efecto de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona sobre la ruta de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ cultivadas en presencia de GM-CSF y TNF- α . Véase la sección 6.6 para detalles.

FIG. 30. Diagrama que muestra las condiciones de maduración de células progenitoras hematopoyéticas Sca⁺Lin⁻. Se hicieron crecer las células durante 9 días en presencia de factor citoblástico (SCF), Flt-3L, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) en presencia de DMSO al 0,1 % (control), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona 10 μ M o ácido todo-trans-retinoico (ATRA) 10 μ M para impulsar las células a un fenotipo precursor de DC. Se cultivaron entonces las células del día 9 al día 12 en presencia de GM-CSF y TNF- α , más DMSO, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o ATRA, para impulsar la diferenciación de las células de m \ddot{u} rido a células dendríticas inmaduras. Véase la sección 6.8 para detalles.

FIG. 31(A-E). Células de m \ddot{u} rido presentes el día 9 en condiciones de cultivo normales (véase el Ejemplo 1, Materiales y métodos, descripción de la FIG. 30). Se marcaron las células con anticuerpos de CD80 (FIG. 31A), CD11 (FIG. 31B), CD32/16 (FIG. 31C), MHC II (I-A^b) (FIG. 31D), CD14 (FIG. 31E) o Gr-1 (FIG. 31F). Las células del día 9 exhibían marcaje con los marcadores CD88, CD11 y CD32/16, poco marcaje con los anticuerpos del marcador I-A^b y ninguno con CD14 o Gr-1. Véase la sección 6.8 para detalles.

FIG. 32(A-I). Citogramas de flujo de células de m \ddot{u} rido del día 12 tratadas con DMSO, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o ATRA. Se marcaron las células con anticuerpos de CD86 y CD11b. FIG. 32A-32C (fila superior): citogramas que muestran los porcentajes de células que expresan CD86 (eje Y) cuando se tratan con DMSO (control), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o ácido todo-trans-retinoico (ATRA). FIG. 32D-32F (fila media): porcentaje de células que expresan el marcador de histocompatibilidad mayor II (MHC II); tratamiento como en la fila superior. FIG. 32G-32I (fila inferior): porcentaje de células que expresan CD11b; tratamiento como en la fila superior. Véase la sección 6.8 para detalles.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención está basada, en parte, en el inesperado descubrimiento de que la exposición de citoblastos o células progenitoras a los compuestos de la invención da como resultado un medio regulable de control de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras en poblaciones específicas de células progenitoras o la diferenciación de células progenitoras en tipos celulares específicos, tales como células dendríticas, granulocitos, células endoteliales y células neurales. En particular, la exposición de los citoblastos o células progenitoras a los compuestos de la invención da como resultado la diferenciación regulable y la expansión de poblaciones específicas de células hematopoyéticas, incluyendo células CD34⁺, CD38⁺ y CD133⁺. Dicha regulación de la diferenciación se

logra sin una pérdida significativa de rendimiento debido a la muerte celular o diferenciación en tipos celulares o linajes celulares indeseados; en otras palabras, los compuestos de la invención no causan la apoptosis de una o más poblaciones celulares. Además, la exposición de las células progenitoras hematopoyéticas a los compuestos de la invención da como resultado una diferenciación regulable y la expansión de tipos celulares específicos.

5 Por tanto, la presente invención proporciona métodos de modulación de la diferenciación de citoblastos humanos, específicamente células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺, y de diferenciación de células progenitoras CD133⁺. En particular, la presente invención proporciona métodos que emplean 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para modular la diferenciación de poblaciones de células progenitoras a lo largo de linajes celulares y tisulares específicos. Además, la invención engloba métodos de expansión de células progenitoras tempranas, tales como células CD133⁺ o CD34⁺ humanas, particularmente CD34⁺CD38⁻, para trasplante en mamíferos, aves o reptiles, que comprenden exponer células progenitoras hematopoyéticas a un inhibidor o antagonista de TNF- α , en los que el inhibidor o antagonista es una molécula pequeña. La invención proporciona también métodos de producción de otros tipos celulares a partir de estas células progenitoras tempranas incluyendo, pero sin limitación, células de cerebro, riñón, tracto intestinal y músculo. Los compuestos de la invención actúan también suprimiendo la diferenciación de células dendríticas y promueven la diferenciación de células granulocíticas a partir de células progenitoras tempranas tales como células progenitoras CD34⁺ humanas.

Los compuestos de molécula pequeña que pueden usarse en conexión con la invención son 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona. Los compuestos se describen con detalle en la sección 5.3. Los compuestos preferidos divulgados en la memoria descriptiva son análogos de talidomida, aunque pueden usarse también productos de hidrólisis de talidomida, metabolitos, derivados y precursores de talidomida. En realizaciones particularmente preferidas, los compuestos son IMID™ (Celgene) tales como 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona.

Los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de un citoblasto o célula progenitora en un linaje celular específico incluyendo, pero sin limitación, un linaje mesenquimático, hematopoyético, adipogénico, hepatogénico, neurogénico, gliogénico, condrogénico, vasogénico, miogénico, condrogénico u osteogénico, que comprende incubar el citoblasto o célula progenitora con un compuesto de la invención, preferiblemente *in vitro*, durante un periodo de tiempo suficiente para dar como resultado la diferenciación de la célula en una célula de un linaje celular deseado. En una realización específica, se modula la diferenciación de un citoblasto o célula progenitora en una célula de linaje hematopoyético. En particular, pueden usarse los métodos de la invención para modular la generación de colonias de células sanguíneas a partir de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺, CD133⁺ y CD45⁺ de manera sensible a la dosis.

Los métodos de la invención engloban también la regulación de la diferenciación de una célula progenitora CD34⁺ en células dendríticas, que comprende incubar la célula progenitora con un compuesto de la invención, preferiblemente *in vitro*, durante un periodo de tiempo suficiente para dar como resultado la diferenciación de la célula en una célula de un linaje celular deseado. En una realización específica, se modula la diferenciación de dicha célula progenitora en una célula de linaje celular dendrítico mediante la puesta en contacto de dicha célula con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona o un análogo o fármaco de cualquiera. En otra realización específica, se modula la diferenciación de una célula progenitora CD34⁺ para suprimir la diferenciación a lo largo de un linaje mielóide y fomentar la diferenciación a lo largo de un linaje granulocítico. En una realización más específica, se modula la diferenciación de una célula progenitora CD34⁺ en una célula de un linaje celular granulocítico mediante un método que comprende poner en contacto una célula progenitora CD34⁺ con un compuesto de la invención el primer día en que se cultivan dichas células progenitoras.

Puede usarse cualquier citoblasto o célula progenitora de mamífero de acuerdo con los métodos de la invención incluyendo, pero sin imitación, citoblastos aislados de sangre de cordón (células "CB"), placenta y otras fuentes. Los citoblastos pueden incluir células pluripotentes, concretamente células que tienen una versatilidad de diferenciación completa, que se autorrenuevan y que pueden permanecer durmientes o quiescentes en tejido. Los citoblastos pueden incluir también células multipotentes o células progenitoras comprometidas. En una realización preferida, la invención utiliza citoblastos que son citoblastos viables quiescentes pluripotentes que existen en la placenta a término y pueden recuperarse después de un parto exitoso y expulsión de la placenta, desangramiento y perfusión, dando como resultado la recuperación de citoblastos multipotentes y pluripotentes.

En otra realización preferida, las células progenitoras son células progenitoras tempranas, particularmente células CD34⁺ o CD133⁺. Preferiblemente, las células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ derivan de médula ósea, placenta o sangre de cordón humanas. Pueden usarse también equivalentes de estas células de otros mamíferos. En ratones, pueden usarse por ejemplo células progenitoras Sca⁺ en los métodos de la invención. Pueden usarse también células progenitoras tempranas equivalentes de aves o reptiles.

En una realización particular de la invención, se exponen células endógenas de placenta, o producidas por una placenta postparto perfundida incluyendo, pero sin limitación, citoblastos de tipo embrionario, células progenitoras, células pluripotentes y células multipotentes, a los compuestos de la invención y se inducen a diferenciar mientras se

cultivan en una placenta aislada y perfundida. Las células endógenas propagadas en la placenta postparto perfundida pueden recogerse y/o recuperarse las moléculas bioactivas del perfundido, medio de cultivo o de las células de placenta mismas.

5 En otra realización de la invención, se exponen citoblastos o células progenitoras que derivan de fuentes distintas de placenta postparto a los compuestos de la invención y se inducen a diferenciarse mientras se cultivan *in vitro*. Por tanto, la invención engloba métodos para diferenciar citoblastos de mamífero en células progenitoras específicas, que comprenden diferenciar los citoblastos en condiciones y/o medios adecuados para la diferenciación deseada y en presencia de un compuesto de la invención

10 Además, la invención engloba métodos para modular o regular la diferenciación de una población de una célula progenitora específica en tipos celulares específicos, que comprenden diferenciar dicha célula progenitora en condiciones adecuadas para dicha diferenciación y en presencia de uno o más compuestos de la invención. Como alternativa, el citoblasto o célula progenitora puede exponerse a un compuesto de la invención y diferenciarse subsiguientemente usando condiciones adecuadas. Los ejemplos de condiciones adecuadas incluyen formulaciones de medios nutrientes suplementadas con suero humano y matrices de cultivo celular tales como MATRIGEL®
15 suplementadas con factores de crecimiento.

El método de la invención contempla también que pueden producirse diferentes poblaciones celulares mediante la puesta en contacto de la célula o células progenitoras con un compuesto de la invención en diversos momentos durante el cultivo, en la etapa de proliferación o diferenciación. Véase la sección 5.4, particularmente la sección 5.4.2 siguiente.

20 En una realización específica, la presente invención proporciona métodos que emplean moléculas pequeñas de amida e imida, particularmente aminoconjugados de talidomida, para modular y regular la hematopoyesis en el contexto de un acondicionamiento pretrasplante de progenitores hematopoyéticos.

La presente invención proporciona también métodos que emplean las moléculas pequeñas de la invención para modular y regular la hematopoyesis en el contexto del acondicionamiento *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos.
25 Los métodos de la invención engloban la regulación de citoblastos o células progenitoras *in vitro*, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto.

La invención engloba también un citoblasto o célula progenitora y un compuesto de la invención para uso en el control o regulación de citoblastos o células progenitoras *in vivo* mediante la administración tanto de un citoblasto o célula progenitora como un compuesto de la invención a un paciente necesitado de ello.

30 La memoria descriptiva divulga también el trasplante de citoblastos o células progenitoras pretratados para tratar o prevenir enfermedades. En una realización, se administra también a un paciente necesitado de trasplante un compuesto de la invención antes, durante y/o después del trasplante. En otra realización, se administra también a un paciente necesitado de trasplante citoblastos o células progenitoras no tratados, p.ej. células de sangre de cordón, células de sangre adultas, células de sangre periféricas o células de médula ósea. En otra realización, la invención
35 incluye la administración de los compuestos de la invención para uso en un sujeto que es el receptor de los citoblastos o células progenitoras no acondicionados con fines de desencadenar un efecto modulador sobre los citoblastos que ya se han trasplantado.

En ciertas realizaciones, el trasplante de médula ósea comprende trasplantar sangre de cordón (o citoblastos obtenidos de sangre de cordón), sangre periférica (concretamente, adulta) (o citoblastos obtenidos de sangre periférica), en el que dicha sangre de cordón o citoblastos se han pretratado con un compuesto de la invención. Además, la memoria descriptiva divulga el uso de glóbulos blancos elaborados a partir de células progenitoras hematopoyéticas que se han diferenciado en presencia de un compuesto de la invención. Por ejemplo, los glóbulos blancos producidos mediante la diferenciación de progenitor hematopoyético pueden usarse en el trasplante o pueden mezclarse con sangre de cordón o citoblastos de sangre de cordón antes del trasplante.

45 En otras realizaciones, la memoria descriptiva divulga un trasplante de médula ósea que comprende trasplantar células progenitoras tempranas, tales como células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺, obtenidas según los métodos de la invención, en el que dichas células progenitoras se han pretratado con un compuesto de la invención. En una realización de la invención, dichos precursores de células dendríticas son células precursoras CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻. Además, la invención engloba el uso de células elaboradas a partir de células progenitoras
50 CD34⁺ que se han diferenciado en presencia de un compuesto de la invención. Por ejemplo, pueden usarse en trasplante células precursoras CD34⁺CD38⁻CD33⁺, células precursoras CD34⁺CD38⁻CD33⁻, granulocitos, etc. producidos mediante la diferenciación de células progenitoras CD34⁺, usando los compuestos de la invención. Las células diferenciadas a partir de células CD133⁺, usando los compuestos de la invención, están también englobadas por la presente invención.

55 La invención engloba también métodos de acondicionamiento de citoblastos después de crioconservación y descongelamiento, para contrarrestar los efectos nocivos de la crioconservación y exposición a crioconservantes sobre los citoblastos. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos de acondicionamiento de

citoblastos después de crioconservación y descongelamiento, para contrarrestar los efectos nocivos de la exposición a crioconservantes (p.ej., DMSO) sobre la capacidad proliferativa y migratoria de los citoblastos.

5.1. MODULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE CITOBLASTOS Y CÉLULAS PROGENITORAS CD34+ O CD133+

5 5.1.1. Citoblastos

La presente invención proporciona métodos de modulación de la diferenciación de citoblastos humanos. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras *in vitro*, que comprenden incubar los citoblastos con el compuesto *in vitro*, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. La invención hace también referencia a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para uso en la regulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras *in vivo*, en las que la regulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras comprende suministrar los compuestos a un sujeto que es el receptor de citoblastos no acondicionados, seguido de la administración directa del compuesto al sujeto.

Los citoblastos de tipo embrionario obtenidos mediante los métodos de la invención pueden inducirse a diferenciar a lo largo de linajes celulares específicos incluyendo, pero sin limitación, linaje mesenquimático, hematopoyético, adipogénico, hepatogénico, neurogénico, gliogénico, condrogénico, vasogénico, miogénico, condrogénico u osteogénico.

En ciertas realizaciones, los citoblastos de tipo embrionario obtenidos según los métodos de la invención se inducen a diferenciar para uso en los protocolos de trasplante y tratamiento *ex vivo*. En ciertas realizaciones, se inducen a diferenciar los citoblastos de tipo embrionario obtenidos mediante los métodos de la invención en un tipo celular particular y se genomanipulan para proporcionar un producto génico terapéutico. En una realización específica, se incuban los citoblastos de tipo embrionario obtenidos mediante los métodos de la invención con un compuesto tal como una molécula orgánica pequeña, *in vitro*, lo que les induce a diferenciar, seguido de trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. En una realización preferida, los compuestos que se usan para controlar o regular la diferenciación de citoblastos no son polipéptidos, péptidos, proteínas, hormonas, citocinas, oligonucleótidos u ácidos nucleicos.

Los citoblastos que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, células de sangre de cordón (CB), células de placenta, citoblastos de tipo embrionario, citoblastos trofoblásticos, células progenitoras, citoblastos de médula ósea y células multipotentes, pluripotentes y totipotentes.

En particular, los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de poblaciones de citoblastos, además de a citoblastos mesenquimáticos, a linajes tisulares específicos. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden emplearse para regular la diferenciación de un citoblasto multipotente en células de linaje condrogénico, vasogénico, miogénico y osteogénico mediante la promoción de la regeneración y reparación musculoesqueléticas específicas, la neoangiogénesis y repoblación de tejidos musculares específicos, tales como miocardio y músculo esquelético, y la revascularización de una variedad de órganos y tejidos incluyendo, pero sin limitación, cerebro, médula espinal, hígado, pulmón, riñón y páncreas. Los métodos de la invención pueden emplearse para regular la diferenciación de un citoblasto multipotente en células de linaje adipogénico, condrogénico, osteogénico, neurogénico o hepatogénico.

El agente usado para modular la diferenciación puede introducirse en la placenta postparto perfundida para inducir la diferenciación de las células que se cultivan en la placenta. Como alternativa, el agente puede usarse para modular la diferenciación *in vitro* después de recoger o retirar las células de la placenta.

Los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de citoblastos progenitores en una célula de linaje hematopoyético, que comprenden incubar los citoblastos progenitores con el compuesto *in vitro* durante un periodo de tiempo suficiente para dar como resultado la diferenciación de estas células en un linaje hematopoyético. En particular, los métodos de la invención pueden usarse para modular la generación de colonias de células sanguíneas a partir de células progenitoras hematopoyéticas CD34+, CD133+ y CD45+ de manera sensible a la dosis (para la discusión de la dosificación, véase la sección 5.7).

Preferiblemente, los métodos de la invención pueden usarse para suprimir específicamente la generación de colonias de glóbulos rojos o eritropoyéticas (BFU-E y CFU-E), mientras que se acrecienta tanto la generación de colonias formadoras de leucocitos y plaquetas (CFU-GM) como la potenciación de la producción de unidades formadoras de colonias totales. Los métodos de la invención pueden usarse no sólo para regular la diferenciación de citoblastos, sino que pueden usarse también para estimular la tasa de formación de colonias, proporcionando beneficios significativos al trasplante de citoblastos hematopoyéticos al mejorar la velocidad de injerto de médula ósea y la recuperación de la producción de leucocitos y/o plaquetas.

En otras realizaciones, pueden usarse los métodos de la invención para regular la diferenciación de, p.ej., una célula precursora neuronal o neuroblasto en un tipo de célula neuronal específico tal como una neurona sensorial (p.ej., una célula retiniana, una célula olfativa, una neurona mecanosensorial, una neurona quimiosensorial, etc.), una

neurona motora, una neurona cortical o una interneurona. En otras realizaciones, pueden usarse los métodos de la invención para regular la diferenciación de tipos celulares que incluyen, pero sin limitación, neuronas colinérgicas, neuronas dopaminérgicas, neuronas GABAérgicas, células gliales (incluyendo oligodendrocitos, que producen mielina) y células endoteliales (que revisten el sistema ventricular cerebral). En aún otras realizaciones, pueden usarse los métodos de la invención para regular la diferenciación de células que son constituyentes de órganos incluyendo, pero sin limitación, células de Purkinje del corazón, epitelio biliar del hígado, células de islote beta de páncreas, células renales corticales o medulares y células fotorreceptores retinianos del ojo.

La valoración del estado de diferenciación de los citoblastos obtenidos según los métodos de la invención puede identificarse mediante la presencia de marcadores de superficie celular. Los citoblastos de tipo embrionario de la invención, por ejemplo, pueden distinguirse por los siguientes marcadores de superficie celular: OCT-4⁺ y ABC-pt. Además, la invención engloba citoblastos de tipo embrionario que tienen los siguientes marcadores de superficie celular: CD10, CD29, CD44, CD54, CD90, SH2, SH3, SH4, OCT-4 y ABC-p, o que carecen de los siguientes marcadores de superficie celular: CD34, CD38, CD45, SSEA3 y SSEA4, como se describe en la presente memoria anteriormente. Dichos marcadores de superficie celular se determinan rutinariamente según métodos bien conocidos en la materia, p.ej., mediante citometría de flujo, seguido de lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de superficie celular. Por ejemplo, para determinar la presencia de CD34 o CD38, las células pueden lavarse con PBS y teñirse doblemente entonces con anti-CD34 ficoeritrina y anti-CD38 isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

5.1.2. Células progenitoras tempranas CD34⁺ y CD133⁺

La presente invención proporciona también métodos de modulación de la diferenciación de células CD34⁺ o CD133⁺ humanas. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras *in vitro*, que comprenden incubar los citoblastos con el compuesto *in vitro*, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto.

Las células progenitoras obtenidas mediante los métodos de la invención pueden inducirse a diferenciar a lo largo de linajes celulares específicos incluyendo, pero sin limitación, para células progenitoras CD34⁺, un linaje mieloide o granulocítico y, para células CD133⁺, un linaje de células endoteliales o neurales. En ciertas realizaciones, se inducen las células progenitoras a diferenciar para uso en protocolos de trasplante y tratamiento *ex vivo*. En ciertas realizaciones, se inducen las células progenitoras a diferenciar en un tipo celular particular y se genomanipulan para proporcionar un producto génico terapéutico. En una realización específica, se incuban las células progenitoras con un compuesto, tal como una molécula orgánica pequeña, *in vitro*, que las induce a diferenciar, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. En una realización preferida, los compuestos que se usan para controlar o regular la diferenciación de citoblastos no son polipéptidos, péptidos, proteínas, hormonas, citocinas, oligonucleótidos o ácidos nucleicos. En otra realización preferida, se hace que la célula progenitora se diferencie en una célula progenitora CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻.

Preferiblemente, pueden usarse los métodos de la invención para suprimir específicamente la generación de glóbulos rojos o colonias eritropoyéticas (BFU-E y CFU-E), mientras que tanto se acrecienta la generación de colonias formadoras de leucocitos y plaquetas (CFU-GM) como se potencia la producción de unidades formadoras de colonias totales. Los métodos de la invención pueden usarse no solo para regular la diferenciación de citoblastos, sino que pueden usarse también para estimular la tasa de formación de colonias, proporcionando beneficios significativos al trasplante de citoblastos hematopoyéticos al mejorar la velocidad de injerto de médula ósea y la recuperación de la producción de leucocitos y/o plaquetas.

En otras realizaciones, pueden usarse los métodos de la invención para reducir la diferenciación de células progenitoras CD34⁺ en células CD1a⁺, particularmente células CD86⁺CD1a⁺. En otra realización, pueden usarse los métodos de la invención para reducir o prevenir la diferenciación de células progenitoras CD34⁺ en células CD14⁺CD1a⁻. Las células CD14⁺CD1a⁻ son células progenitoras de células dendríticas dérmicas o monocitos/macrófagos. En otra realización, pueden usarse los métodos de la invención para reducir la expresión en células progenitoras CD34⁺ proliferantes de las moléculas coestimulantes CD80 y CD86. En otra realización, pueden usarse los métodos de la invención para reducir la diferenciación de células progenitoras CD34⁺ proliferantes en células CD54^{bright} y para fomentar la diferenciación en células CD54^{dim}. En otra realización, pueden usarse los métodos de la invención para aumentar el número de células CD133⁺, que son células progenitoras de células endoteliales. En aún otra realización, pueden usarse los métodos de la invención para disminuir la diferenciación de células CD34⁺ proliferantes en células CD11c⁺CD15⁺ y para aumentar la diferenciación en células CD11c⁺CD15⁻, desplazando por tanto la diferenciación de un linaje de células dendríticas mieloides a un linaje granulocítico.

La valoración del estado de diferenciación de los citoblastos obtenidos según los métodos de la invención puede identificarse mediante la presencia de marcadores de superficie celular. Las células progenitoras de la invención, por ejemplo, pueden distinguirse por los marcadores de superficie celular CD34⁺ o CD133⁺. Además, la invención engloba células progenitoras proliferantes que poseen, o muestran una expresión aumentada respecto a un control de, uno o más de los siguientes marcadores: CD15, CD34, CD33, CD133 o CD54^{dim}, como se describe anteriormente en la presente memoria. La invención engloba también células progenitoras proliferantes que carecen, o muestran una expresión reducida respecto a un control, de uno o más de los siguientes marcadores: HLA-DR,

CD1a, CD11c, CD38, CD80, CD86, CD54^{bright} o CD14. En una realización preferida, las células progenitoras proliferantes de la invención exhiben CD34⁺CD38⁺CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻. Dichos marcadores de superficie celular se determinan rutinariamente según métodos bien conocidos en la materia, p.ej., mediante lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de superficie celular, seguido de citometría de flujo. Por ejemplo, para determinar la presencia de CD34 o CD38, las células pueden lavarse con PBS y entonces teñirse doblemente con anti-CD34 ficoeritrina y anti-CD38 isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

En ciertas realizaciones, las células diferenciadas pueden caracterizarse caracterizando la capacidad fagocítica de las células diferenciadas. La capacidad de fagocitosis de las células diferenciadas o en diferenciación puede valorarse, por ejemplo, marcando dextrano con FITC y determinando la cantidad de captación por métodos conocidos. La capacidad de las células diferenciadas o en diferenciación de estimular linfocitos T puede valorarse en una reacción de leucocitos mixtos (MLR), en la que se mezclan hipotéticamente células cargadas con antígeno con linfocitos T y se determina el nivel de activación de linfocitos T.

5.1.3. Identificación y caracterización de células

En ciertas realizaciones, las células diferenciadas pueden identificarse caracterizando genes expresados diferencialmente (por ejemplo, caracterizando un conjunto de genes de una célula o células progenitoras indiferenciadas de interés frente a un conjunto de genes de una célula diferenciada derivada de la célula progenitora). Por ejemplo, pueden usarse métodos de amplificación de ácido nucleico tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o métodos de amplificación basada en la transcripción (p.ej., transcripción *in vitro* (IVT)) para determinar el perfil de la expresión génica en diferentes poblaciones de células, p.ej., mediante el uso de una micromatriz de polinucleótido. Dichos métodos para determinar el perfil de expresión génica diferencial son bien conocidos en la materia (véanse, p.ej., Wieland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2720-2724 (1990); Lisitsyn *et al.*, Science 259: 946-951 (1993); Lisitsyn *et al.*, Meth. Enzymology 254: 291-304 (1995); patente de EE.UU. n° 5.436.142; patente de EE.UU. n° 5.501.964; Lisitsyn *et al.*, Nature Genetics 6: 57-63 (1994); Hubank y Schatz, 1994, Nucleic Acids Research 22: 5640-5648; Zeng *et al.*, 1994, Nucleic Acids Research 22: 4381-4385; patente de EE.UU. n° 5.525.471; Linsley *et al.*, patente de EE.UU. n° 6.271.002, titulada "Método de amplificación de ARN", expedida el 7 de agosto de 2001; Van Gelder *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.716.785, titulada "Procesos para manipulaciones genéticas usando promotores", expedida el 10 de febrero de 1998; Stoflet *et al.*, 1988, Science 239: 491-494, 1988; Sarkar y Sommer, 1989, Science 244: 331-334; Mullis *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.683.195; Malek *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.130.238; Kacian y Fultz, patente de EE.UU. n° 5.399.491; Burg *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.437.990; R.N Van Gelder *et al.* (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1663; D.J. Lockhart *et al.*, 1996, Nature Biotechnol. 14, 1675; Shannon, patente de EE.UU. n° 6.132.997; Lindemann *et al.*, patente de EE.UU. n° 6.235.503, titulada "Procedimiento para la hibridación sustractiva y el análisis de diferencias", expedida el 22 de mayo de 2001).

Están disponibles kits comercialmente disponibles para determinar el perfil génico, p.ej., la serie de kits displayPROFILE™ (Qbiogene, Carlsbad, CA), que usan un enfoque basado en gel para la determinación del perfil de expresión génica. Los kits utilizan una PCR de exhibición diferencial de fragmentos de restricción (RFDD-PCR) para comparar los patrones de expresión génica en células eucarióticas. Pueden usarse también un kit de sustracción PCR-Select (Clontech) y un kit de cribado diferencial PCR-Select (Clontech), que permiten la identificación de clones expresados diferencialmente en una colección de sustracción. Después de generar conjuntos de genes expresados diferencialmente con el kit de sustracción PCR-Select, se usa el kit de cribado diferencial PCR-Select. Se hibrida la colección de sustracción con sondas sintetizadas directamente a partir de poblaciones de muestra y de referencia, una sonda compuesta por ADNc con sustracción y una sonda compuesta por ADNc con sustracción inversa (una segunda sustracción efectuada a la inversa). Los clones que hibridan con las sondas de muestra pero no de referencia se expresan diferencialmente; sin embargo, las sondas sin sustracción no son suficientemente sensibles para detectar mensajes escasos. Las sondas con sustracción están enriquecidas en gran medida en ADNc expresados diferencialmente, pero pueden dar resultados falsos positivos. Usar tanto sondas con sustracción como sin sustracción según las instrucciones del fabricante (Clontech) identifica genes expresados diferencialmente.

En otra realización, se identifican y caracterizan los citoblastos o células progenitoras diferenciados mediante un ensayo de unidades formadoras de colonias que es comúnmente conocido en la materia, tal como el medio Mesen Cult™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia británica).

La determinación de que un citoblasto o célula progenitora se ha diferenciado en un tipo celular particular puede lograrse mediante métodos bien conocidos en la materia, p.ej., midiendo los cambios en la morfología y marcadores de superficie celular usando técnicas tales como citometría de flujo o inmunocitoquímica (p.ej., teñir células con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcador celular), mediante el examen de la morfología de células usando microscopía óptica o confocal o midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como PCR y determinación del perfil de expresión génica.

5.2. POBLACIONES DE CITOBLASTOS Y CÉLULAS PROGENITORAS

La presente invención proporciona métodos de modulación de la diferenciación de citoblastos humanos. Puede

usarse cualquier citoblasto de mamífero en los métodos de la invención incluyendo, pero sin limitación, citoblastos aislados de sangre de cordón (células CB), sangre periférica, sangre adulta, médula ósea, placenta, citoblastos mesenquimáticos y otras fuentes. En una realización no preferida, los citoblastos son células que se han aislado de fuentes distintas de placenta pero no son de células embrionarias.

- 5 Las fuentes de citoblastos mesenquimáticos incluyen médula ósea, saco vitelino embrionario, placenta, cordón umbilical, piel fetal y adolescente y sangre. Las células de médula ósea pueden obtenerse, por ejemplo, de cresta ilíaca, fémures, tibias, espina dorsal, costillas u otros espacios medulares.

Los citoblastos para usar de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden incluir células pluripotentes, concretamente células que tienen una versatilidad de diferenciación completa, que son autorrenovables y pueden permanecer durmientes o quiescentes en el tejido. Los citoblastos pueden incluir también células multipotentes, células progenitoras comprometidas y células fibroblastoides. En una realización preferida, la invención utiliza citoblastos que son citoblastos pluripotentes viables quiescentes aislados de una placenta a término desangrada profundida.

10

Las poblaciones de citoblastos pueden consistir en citoblastos placentarios obtenidos mediante un servicio comercial, p.ej., LifeBank USA (Cedar Knolls, NJ), ViaCord (Boston MA), Cord Blood Registry (San Bruno, CA) y Cryocell (Clearwater, FL).

15

Las poblaciones de citoblastos pueden consistir también en citoblastos placentarios recogidos según los métodos divulgados en la publicación de solicitud de EE.UU. n° US 20020123141, publicada el 5 de septiembre de 2002, titulada "Método de recogida de citoblastos placentarios" y la publicación de solicitud de EE.UU. n° US 20030032179, publicada el 13 de febrero de 2003, titulada "Placenta de mamífero postparto, su uso y citoblastos placentarios a partir de la misma".

20

En una realización, pueden usarse citoblastos de sangre de cordón. Se hace referencia a la primera recogida de sangre de la placenta como sangre de cordón, que contiene predominantemente células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ y CD38⁺. En las primeras veinticuatro horas de perfusión postparto, pueden aislarse altas concentraciones de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺CD38⁻ de la placenta. Después de aproximadamente veinticuatro horas de perfusión, pueden aislarse altas concentraciones de células CD34⁺CD38⁻ de la placenta junto con las células mencionadas anteriormente. La placenta profundida aislada de la invención proporciona una fuente de grandes cantidades de citoblastos enriquecidos en citoblastos CD34⁺CD38⁻ y citoblastos CD34⁻CD38⁻: la placenta aislada que se ha profundido durante veinticuatro horas o más proporciona una fuente de grandes cantidades de citoblastos enriquecidos en citoblastos CD34⁻ y CD38⁻.

25

30

Las células preferidas para usar de acuerdo con la presente invención son citoblastos de tipo embrionario que se originan en placenta desangrada profundida, o células que derivan de citoblastos placentarios de tipo embrionario. Los citoblastos de tipo embrionario de la invención pueden caracterizarse midiendo los cambios de morfología y marcadores de superficie celular usando técnicas tales como citometría de flujo e inmunocitoquímica, y midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas tales como PCR. En una realización de la invención, dichos citoblastos de tipo embrionario pueden caracterizarse por la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular: CD10, CD29, CD44, CD54, CD90, SH2, SH3, SH4, OCT-4 y ABC-p, o por la ausencia de los siguientes marcadores de superficie celular: CD34, CD38, CD45, SSEA3 y SSEA4. En una realización preferida, dichos citoblastos de tipo embrionario pueden caracterizarse por la presencia de los marcadores de superficie celular OCT-4 y APC-p. Dichos marcadores de superficie celular se determinan rutinariamente según métodos bien conocidos en la materia, p.ej., mediante citometría de flujo, seguida de lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de superficie celular. Por ejemplo, para determinar la presencia de células CD34 o CD38, las células pueden lavarse con PBS y entonces teñirse doblemente con anti-CD34 ficoeritrina y anti-CD38 isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

35

40

Los citoblastos de tipo embrionario originarios de placenta tienen características de los citoblastos embrionarios, pero no derivan del embrión. En otras palabras, la invención engloba el uso de células OCT-4⁺ y ABC-p⁺ que son citoblastos indiferenciados que se aíslan de placenta postparto profundida. Dichas células son tan versátiles (p.ej., pluripotentes) como los citoblastos embrionarios humanos. Como se menciona anteriormente, pueden aislarse una serie de diferentes citoblastos pluripotentes o multipotentes de placenta profundida en diferentes puntos temporales, p.ej., células hematopoyéticas CD34⁺CD38⁺, CD34⁺CD38⁻ y CD34⁻CD38⁻. Según los métodos de la invención, se usa placenta humana después del nacimiento como fuente de citoblastos de tipo embrionario.

45

50

Por ejemplo, después de la expulsión desde la matriz, se desangra la placenta lo más rápidamente posible para prevenir o minimizar la apoptosis. Posteriormente, lo antes posible después del desangramiento, se perfunde la placenta para retirar sangre, células residuales, proteínas, factores y cualquier otro material presente en el órgano. Pueden retirarse también los materiales de desecho de la placenta. La perfusión continúa normalmente con un profundido apropiado durante al menos dos a más de veinticuatro horas. En varias realizaciones adicionales, la placenta se perfunde durante al menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 horas. En otras palabras, esta invención está basada al menos en parte en el descubrimiento de que las células de una placenta postparto pueden activarse mediante desangramiento y perfusión durante una cantidad de tiempo suficiente. Por lo tanto, la placenta puede

55

usarse fácilmente como una fuente rica y abundante en citoblastos de tipo embrionario, pudiendo usarse dichas células para investigación, incluyendo el descubrimiento de fármacos, el tratamiento y la prevención de enfermedades, en particular cirugías o terapias de trasplante, y la generación de células, tejidos y organoides comprometidos. Véase la solicitud en tramitación junto con la presente de nº de serie 10/004.942, presentada el 5 de diciembre de 2001, titulada "Método de recogida de citoblastos placentarios" y la solicitud nº de serie 10/076.180, presentada el 13 de febrero de 2002, titulada "Placenta de mamífero postparto, su uso y los citoblastos placentarios de la misma".

Los citoblastos de tipo embrionario se extraen de una placenta drenada mediante una técnica de perfusión que utiliza cualquiera o ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical. La placenta se drena preferiblemente por desangramiento y recogida de la sangre residual (p.ej., sangre de cordón umbilical residual). Se procesa entonces la placenta drenada de tal manera que se establezca un entorno de biorreactor natural *ex vivo* en que se reclutan citoblastos de tipo embrionario residentes en el parénquima y el espacio extravascular. Los citoblastos de tipo embrionario migran a la microcirculación vacía drenada donde, según los métodos de la invención, se recogen, preferiblemente por lavado en un recipiente de recogida por perfusión.

Se contempla específicamente como parte de la invención la modulación de células progenitoras CD34⁺ y CD133⁺ en células mieloides, particularmente células dendríticas o granulocíticas. Informes recientes indican que dichas células son pluripotentes; por tanto, la invención contempla también la modulación del desarrollo de estos progenitores en células de cerebro, riñón, tracto intestinal, hígado o músculo.

Puede usarse cualquier citoblasto o célula progenitora CD34⁺ o CD133⁺ de mamífero, ave o reptil en los métodos de la invención incluyendo, pero sin limitación, citoblastos aislados de sangre de cordón (células CB), sangre periférica, sangre adulta, médula ósea, placenta incluyendo placenta perfundida (véase la publicación de solicitud de EE.UU. nº US 20030032179, publicada el 13 de febrero de 2003, titulada "Placenta de mamífero postparto, su uso y citoblastos placentarios de la misma", citoblastos mesenquimáticos y otras fuentes. En una realización preferida, los citoblastos son citoblastos hematopoyéticos o células que se han aislado de médula ósea. Dichas células pueden obtenerse de otros órganos o tejidos, pero dichas fuentes son menos preferidas.

En una realización, pueden usarse células progenitoras de sangre de cordón o de placenta postparto. Como se señala anteriormente, la sangre de cordón contiene predominantemente células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ y CD38⁺. En las primeras veinticuatro horas de perfusión postparto, pueden aislarse altas concentraciones de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺CD38⁻ de una placenta perfundida aislada. Después de aproximadamente veinticuatro horas de perfusión, pueden aislarse altas concentraciones de células CD34⁺CD38⁻ de la placenta junto con las células anteriormente mencionadas. En otra realización, pueden obtenerse poblaciones de células progenitoras mediante un servicio comercial, p.ej., Life Bank USA (Cedar Knolls, NJ), ViaCord (Boston MA), Cord Blood Registry (San Bruno, CA) y Cryocell (Clearwater, FL).

5.3. LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

Se hace referencia a los compuestos divulgados en la presente memoria como "compuestos inmunomoduladores" e incluyen compuestos inmunomoduladores que son racémicos, estereoisoméricamente enriquecidos o estereoisoméricamente puros y sales, solvatos, hidratos, estereoisómeros, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos preferidos usados en la invención son moléculas orgánicas pequeñas que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1000 g/mol y no son proteínas, péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos u otras macromoléculas.

Como se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, el término "estereoisoméricamente puro" significa una composición que comprende un estereoisómero de un compuesto y está sustancialmente exento de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral estará sustancialmente exenta del enantiómero opuesto del compuesto. Una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene dos centros quirales estará sustancialmente exenta de otros diastereómeros del compuesto. Como se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, el término "enantioméricamente puro" significa una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral. Como se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, el término "estereoisoméricamente enriquecido" significa una composición que comprende más de aproximadamente un 60 % en peso de un estereoisómero de un compuesto, preferiblemente más de aproximadamente un 70 % en peso, más preferiblemente más de aproximadamente un 80 % en peso de un estereoisómero de un compuesto. Como se usa en la presente memoria, el término "enantioméricamente puro" significa una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral. De forma similar, el término "enantioméricamente enriquecido" significa una composición estereoisoméricamente enriquecida de un compuesto que tiene un centro quiral.

Como se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, el término "compuestos inmunomoduladores" o "IMID™" (Celgene Corporation) usado en la presente memoria engloba moléculas orgánicas pequeñas que inhiben notablemente la producción de IL1 β e IL12 monocíticas inducidas por TNF- α y LPS e inhiben parcialmente la producción de IL6. Los compuestos inmunomoduladores específicos de la invención se discuten a continuación. Estos compuestos pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, en Celgene, o prepararse de

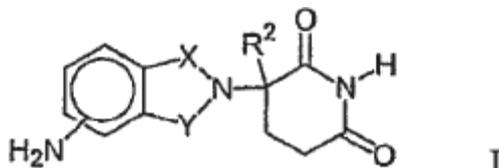
acuerdo con los métodos descritos en las patentes o publicaciones enumeradas en la presente memoria.

El TNF- α es una citocina inflamatoria producida por macrófagos y monocitos durante la inflamación aguda. El TNF- α es responsable de un diverso intervalo de eventos de señalización en células. El TNF- α puede desempeñar un papel patológico en el cáncer. Sin limitarse a teoría particular alguna, uno de los efectos biológicos ejercidos por los compuestos inmunomoduladores de la invención es la reducción de la síntesis de TNF- α . Los compuestos inmunomoduladores de la invención potencian la degradación de ARNm de TNF- α .

Además, sin limitarse a teoría particular alguna, los compuestos inmunomoduladores usados en la invención pueden ser también coestimulantes potentes de linfocitos T y aumentar la proliferación celular drásticamente de manera dependiente de la dosis. Los compuestos inmunomoduladores de la invención pueden tener también un mayor efecto coestimulante sobre el subconjunto de linfocitos T CD8+ que sobre el subconjunto de linfocitos T CD4+. Además, los compuestos tienen preferiblemente propiedades antiinflamatorias y coestimulan eficazmente los linfocitos T.

Los ejemplos específicos de compuestos inmunomoduladores divulgados en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, derivados de ciano y carboxi de estirenos sustituidos tales como los divulgados en la patente de EE.UU. nº 5.929.117; 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. nº 5.874.448; las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetrasustituidas descritas en la patente de EE.UU. nº 5.798.368; 1-oxo- y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas (p.ej., derivados de 4-metilo de talidomida y EM-12) incluyendo, pero sin limitación, aquellas divulgadas en la patente de EE.UU. nº 5.635.517 y una clase de amidas cíclicas no polipeptídicas divulgadas en las patentes de EE.UU. nº 5.698.579 y 5.877.200. Los compuestos inmunomoduladores de la invención no incluyen talidomida.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos divulgados en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, 1-oxo- y 1,3 dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas sustituidas con amino o amino sustituido en el anillo de benceno como se describen en la patente de EE.UU. nº 5.635.517. Estos compuestos tienen la estructura I:



en que uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂ y R² es hidrógeno o alquilo inferior, en particular metilo. Los compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero sin limitación:

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina;

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisoindolina;

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-6-aminoisoindolina;

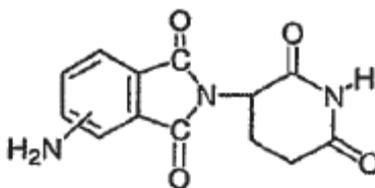
1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-7-aminoisoindolina;

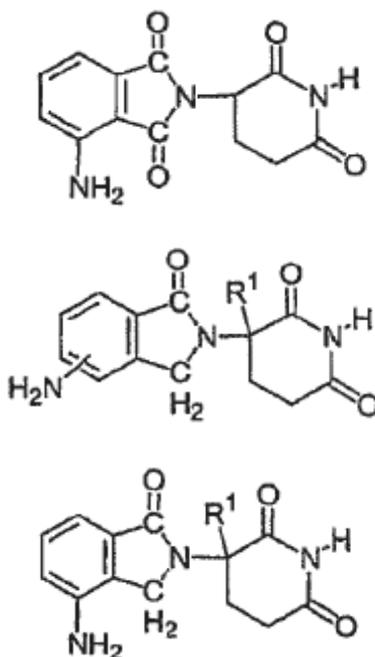
1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina

y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisoindolina.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos divulgados en la presente memoria pertenecen a la clase de 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidas sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles sustituidos, tales como aquellos descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.281.230, 6.316.471, 6.335.349 y 6.476.052 y la solicitud de patente internacional nº PCT/US97/13375 (publicación internacional nº WO 98/03502).

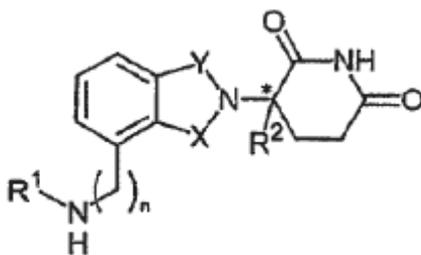
Los compuestos representativos de esta clase son de fórmulas:





5 en las que R¹ es hidrógeno o metilo. En una realización separada, la memoria descriptiva divulga el uso de formas enantioméricamente puras (p.ej., enantiómeros (R) o (S) ópticamente puros) de estos compuestos.

Todavía otros compuestos inmunomoduladores específicos divulgados en la presente memoria pertenecen a una clase de isoindolimidazinas divulgadas en las solicitudes de patente de EE.UU. n° 10/032.286 y 09/972.487 y la solicitud internacional n° PCT/US01/50401 (publicación internacional n° WO 02/059106). Los compuestos representativos son de fórmula II:



II

10 y sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros diastereómeros, racematos y mezclas de estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

15 R¹ es H, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆), alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquil (C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R³, C(S)NR³R³ o alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

R² es H, F, bencilo, alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈) o alquinilo (C₂-C₈);

20 R³ y R^{3'} son independientemente alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆), alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅), alquil (C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵ o C(O)OR⁵;

R⁴ es alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), alquil (C₁-C₄)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆) o alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅);

R⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo o heteroarilo (C₂-C₅);

25 cada aparición de R⁶ es independientemente H, alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo (C₂-C₅) o alquil (C₀-C₈)-C(O)O-R⁵ o los grupos R⁶ pueden unirse formando un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 o 1; y

* representa un centro de carbono quiral.

En compuestos específicos de fórmula II, cuando n es 0 entonces R¹ es cicloalquilo (C₃-C₇), alqueno (C₂-C₈), alquino (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆), alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅), C(O)R³, C(O)OR⁴, alquil (C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(S)NHR³ o alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

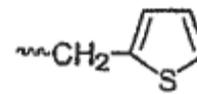
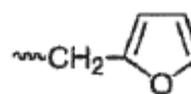
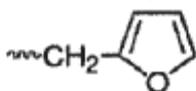
5 R² es H o alquilo (C₁-C₈) y

R³ es alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alqueno (C₂-C₈), alquino (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆), alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅), alquil (C₅-C₈)-N(R⁶)₂; alquil (C₀-C₈)-NH-C(O)OR⁵; alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵ o C(O)OR⁵; y las demás variables tienen las mismas definiciones.

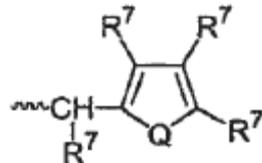
10 En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H o alquilo (C₁-C₄).

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es alquilo (C₁-C₈) o bencilo.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es H, alquilo (C₁-C₈), bencilo, CH₂OCH₃, CH₂CH₂OCH₃ o



En otra realización de los compuestos de fórmula II, R¹ es



15 en las que Q es O o S, y cada aparición de R⁷ es independientemente H, alquilo (C₁-C₈), bencilo, CH₂OCH₃ o CH₂CH₂OCH₃.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)R³.

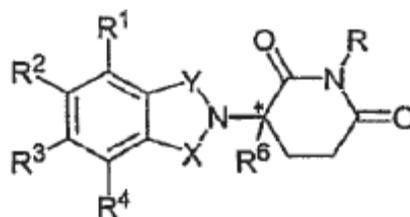
20 En otros compuestos específicos de fórmula II, R³ es alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅), alquilo (C₁-C₈), arilo o alquil (C₀-C₄)-OR⁵.

En otros compuestos específicos de fórmula II, el heteroarilo es piridilo, furilo o tienilo.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)OR⁴.

En otros compuestos específicos de fórmula II, el H de C(O)NHC(O) puede reemplazarse por alquilo (C₁-C₄), arilo o bencilo.

25 Todavía otros compuestos inmunomoduladores específicos de la invención pertenecen a una clase de isoindolimidazidas divulgadas en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 09/781.179, la publicación internacional n° WO 98/54170 y la patente de EE.UU. n° 6.395.754. Los compuestos representativos son de fórmula III:



III

30 y las sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos y mezclas de estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

R es H o CH₂OCOR';

(i) cada uno de R^1 , R^2 , R^3 o R^4 , independientemente de los demás, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R^1 , R^2 , R^3 o R^4 es nitro o $-NHR^5$ y el resto de R^1 , R^2 , R^3 o R^4 son hidrógeno;

R^5 es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos;

5 R^6 es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benceno, cloro o fluoro;

R^7 es $R^7-CHR^{10}-N(R^8R^9)$;

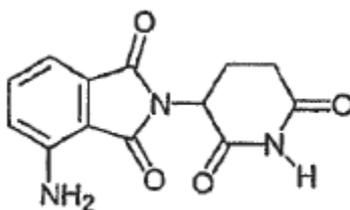
R^7 es m-fenileno o p-fenileno o $-(C_nH_{2n})-$ en que n tiene un valor de 0 a 4;

10 cada uno de R^8 y R^9 tomados independientemente entre sí es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R^8 y R^9 tomados conjuntamente son tetrametileno, pentametileno, hexametileno o $-CH_2CH_2[X]X_1CH_2CH_2-$ en que $[X]X_1$ es $-O-$, $-S-$ o $-NH-$;

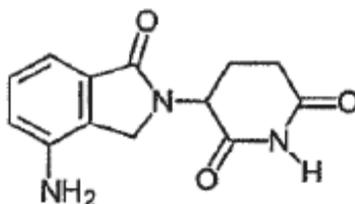
R^{10} es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o fenilo; y

* representa un centro de carbono quiral.

15 Los compuestos inmunomoduladores de la invención son 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il) y pueden obtenerse mediante métodos sintéticos estándares (véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 5.635.517). Los compuestos están disponibles en Celgene Corporation, Warren, N.J. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona tiene la siguiente estructura química:



La 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona tiene la siguiente estructura química:



20 5.4. MÉTODOS DE CULTIVO DE CITOBLASTOS

25 En ciertas realizaciones de la invención, se exponen los citoblastos o células progenitoras, incluyendo pero sin limitación, citoblastos de tipo embrionario, células progenitoras, células pluripotentes, células totipotentes, células multipotentes, células endógenas de una placenta postparto perfundida, células de sangre de cordón, citoblastos o células progenitoras derivados de sangre periférica o sangre adulta o células de médula ósea a los compuestos de la invención y se inducen a diferenciar. Estas células pueden propagarse *in vitro* usando métodos bien conocidos en la materia o, como alternativa, pueden propagarse en una placenta postparto perfundida.

30 En ciertas realizaciones, pueden recogerse células endógenas de una placenta postparto perfundida de la placenta y el medio de cultivo y cultivarse *in vitro* en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación en el tipo o linaje celular deseado. Véase la publicación de solicitud de EE.UU. n° US 20030032179, publicada el 13 de febrero de 2003, titulada "Placenta de mamífero postparto, su uso y citoblastos placentarios de la misma".

35 En otra realización de la invención, los citoblastos o células progenitoras no derivan de una placenta postparto perfundida, sino que en lugar de ello se aíslan de otras fuentes tales como sangre de cordón, médula ósea, sangre periférica o sangre adulta, se exponen a los compuestos de la invención y se inducen a diferenciar. En una realización preferida, se realiza la diferenciación *in vitro* en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación en el linaje o tipo celular deseado. Los compuestos de la invención se usan en los medios de diferenciación/cultivo mediante adición, generación *in situ* o cualquier otra manera que permita el contacto de los citoblastos o células progenitoras con los compuestos de la invención.

En otra realización, los citoblastos cultivados, p.ej. citoblastos cultivados *in vitro* o en una placenta postparto

perfundida, se estimulan a proliferar en cultivo, por ejemplo, mediante la administración de eritropoyetina, citocinas, linfocinas, interferones, factores estimulantes de colonias (CSF), interferones, quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento hematopoyéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factores de citoblastos, trombopoyetina (Tpo), interleucinas y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

- 5 Después de la recogida y/o aislamiento de las células cultivadas, pueden identificarse y caracterizarse mediante un ensayo de unidad formadora de colonias, que es comúnmente conocido en la materia, tal como el medio Mesen Cult™ (Stem cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia británica).

Los métodos para cultivar citoblastos o células progenitoras *in vitro* son bien conocidos en la materia, p.ej. véanse Thomson *et al.*, 1998, Science 282: 1145-47 (citoblastos embrionarios); Hirashima *et al.*, 1999, Blood 93(4): 1253-63 y Hatzopoulos *et al.*, 1998, Development 125: 1457-1468 (progenitores celulares endoteliales); Slager *et al.*, 1993, Dev. Genet. 14(3): 212-24 (progenitores neuronales o musculares); Genbachev *et al.*, 1995, Reprod. Toxicol. 9(3): 245-55 (citotrofoblastos, concretamente, progenitores de células epiteliales placentarias); Nadkarni *et al.* 1984, Tumori 70: 503-505, Melchner *et al.*, 1985, Blood 66(6): 1469-1472, publicación internacional PCT WO 00/27999 publicada el 18 de mayo de 2000, Himori *et al.*, 1984, Intl. J. Cell Cloning 2: 254-262 y Douay *et al.*, 1995, Bone Marrow Transplantation 15: 769-775 (células progenitoras hematopoyéticas); Shablott *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726-31 (células germinales primordiales); Yan *et al.*, 2001, Devel. Biol. 235: 422-432 (citoblastos trofoblásticos). Dichos métodos pueden adaptarse fácilmente para uso en los métodos de la invención, a condición de que el cultivo de las células progenitoras incluya una etapa o etapas de cultivo de células con un compuesto de la invención, en los momentos indicados, produciendo la población o poblaciones deseadas de células diferenciadas.

5.4.1. Cultivo de citoblastos *in vitro*

Los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras *in vitro*, que comprenden incubar las células con un compuesto tal como una molécula orgánica pequeña de la presente invención, *in vitro*, que las induzca a diferenciar en células de un linaje celular deseado, seguido de trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. En una realización preferida, se inducen las células a diferenciar en un linaje celular hematopoyético.

En ciertas realizaciones, los citoblastos cultivados de interés se exponen *in vitro* a una concentración 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg o 10 µg/ml de un compuesto de la invención. Preferiblemente, se exponen las células de interés a una concentración de talidomida de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, una concentración de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml (Celgene Corp., Warren, NJ), una concentración de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, una concentración de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o una concentración de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml (véase también la sección 5.7, "Composiciones farmacéuticas").

En ciertas realizaciones, los citoblastos de tipo embrionario se inducen a propagar en el biorreactor de placenta mediante la introducción de nutrientes, hormonas, vitaminas, factores de crecimiento o cualquier combinación de los mismos en la disolución de perfusión. Pueden añadirse suero y otros factores de crecimiento a la solución o medio de perfusión de propagación. Los factores de crecimiento son habitualmente proteínas e incluyen, pero sin limitación: citocinas, linfocinas, interferones, factores estimulantes de colonias (CSF), interferones, quimiocinas e interleucinas. Otros factores de crecimiento que pueden usarse incluyen factores de crecimiento hematopoyéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factores de citoblastos, trombopoyetina (Tpo), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento fibroblástico básico, factor de crecimiento derivado de placenta y factor de crecimiento epidérmico.

Los factores de crecimiento introducidos en la disolución de perfusión pueden estimular la propagación de citoblastos de tipo embrionario indiferenciados, células progenitoras comprometidas o células diferenciadas (p.ej., células hematopoyéticas diferenciadas). Los factores de crecimiento pueden estimular la producción de materiales biológicos y moléculas bioactivas incluyendo, pero sin limitación, inmunoglobulinas, hormonas, enzimas o factores de crecimiento como se describen anteriormente. La placenta cultivada debería "alimentarse" periódicamente para retirar los medios gastados, despoblar de células liberadas y añadir medio reciente. La placenta cultivada debería almacenarse en condiciones estériles para reducir la posibilidad de contaminación, y mantenerse a presión de forma intermitente y periódica para crear condiciones que mantengan un suministro adecuado de nutrientes a las células de la placenta. Debería reconocerse que la perfusión y cultivo de la placenta puede tanto automatizarse como informatizarse para una eficacia y capacidad aumentadas.

5.4.2. Cultivo de células progenitoras *in vitro*

Los métodos de la invención engloban también la regulación y modulación del desarrollo de células progenitoras, particularmente células progenitoras CD34⁺ y CD133⁺. En una realización de la invención, se inducen las células

progenitoras a diferenciar en un linaje celular hematopoyético. En una realización específica, el linaje es un linaje granulocítico. En una realización alternativa, se inducen células CD133⁺ a diferenciar en células endoteliales, células de cerebro, células de riñón, células de hígado o células de tracto intestinal.

- 5 Las células progenitoras pueden cultivarse mediante métodos estándares, como se señala anteriormente. Adicionalmente, el cultivo de las células progenitoras puede comprender poner en contacto las células en diversos momentos o marcos temporales durante el cultivo, para impulsar la diferenciación de células progenitoras a linajes celulares diferentes.

10 Por tanto, en un método de cultivo de células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺, se siembran células el día 0 en medio que contiene factor de citoblastos (SCF), Flt-3L, GM-CSF y TNF- α y se cultivan durante seis días. El sexto día, se resiembran las células en medio que contiene GM-CSF y TNF- α y se continúa el cultivo durante seis días adicionales. Este método da como resultado la generación de células dendríticas. En una variación de este método, se siembran inicialmente las células en medio que contiene GM-CSF e IL-4 y se cambia entonces el sexto día a medio acondicionado para monocitos (véase Steinman *et al.*, publicación internacional nº WO 97/29182). Para producir una población de células progenitoras CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻, se ponen en contacto las células progenitoras con un compuesto de la invención el día 0, y se recogen las células progenitoras CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻ el día 6.

20 Los inventores han descubierto que el momento de la adición del compuesto o compuestos de la invención, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, tiene un efecto sustancial sobre la ruta de diferenciación de células CD34⁺ en células de linajes particulares, y sobre la diferenciación de células CD133⁺. Las células progenitoras CD34⁺, cultivadas en condiciones estándares, siguen una ruta o linaje de desarrollo mieloide, concretamente se vuelven células dendríticas al cabo de 12 días después de la siembra inicial (concretamente, después del cultivo inicial). Sin embargo, la adición de un compuesto de la invención en uno de varios momentos particulares durante los primeros seis días de cultivo altera sustancialmente esta ruta. Por ejemplo, si se exponen células CD34⁺, particularmente CD34⁺ derivadas de médula ósea, a un compuesto de la invención, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona el primer día de cultivo, se suprime la diferenciación a lo largo del linaje mieloide, como se evidencia por el aumento del número de células CD34⁺CD38⁻ y la disminución del número de células CD1a⁺CD14⁻ el día 6 de cultivo, respecto a un control no expuesto a un compuesto de la invención (concretamente, expuesto a DMSO). Además, la exposición a un compuesto de la invención conduce a la supresión del desarrollo de células que expresan marcadores de superficie expresados por células en un linaje celular dendrítico, tales como CD80 y CD86. La puesta en contacto el día inicial de cultivo, o en cualquier punto hasta tres días después del día inicial de cultivo, con un compuesto de la invención conduce a dicha modulación del desarrollo de células progenitoras CD34⁺. El aumento del número de células CD34⁺ se intensifica si se procuran múltiples dosis de un compuesto de la invención entre el día 0 y el día 6, por ejemplo dosis el día 0 y el día 2, el día 0 y el día 4, dosis el día 3 y el día 6 o dosis el día 2, el día 4 y el día 6.

En un aspecto particularmente útil de la invención, la adición de un compuesto de la invención el primer día de cultivo de células progenitoras CD34⁺ y la continuación de la exposición hasta el día 12, conduce al desarrollo de una célula progenitora única que expresa una combinación única de marcadores de superficie celular: CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻. La población de células CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻ representa una etapa intermedia de diferenciación. Esta población es útil como población expansible de células progenitoras que puede trasplantarse fácilmente a un paciente necesitado de una población de desarrollo rápido de células de linaje hematopoyético, por ejemplo células granulocíticas. En otra realización, pueden sembrarse células CD34⁺ y cultivarse durante la fase proliferativa (aproximadamente 6 días) en medio estándar (concretamente, no expuesto a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona o similares), cambiarse entonces al mismo o medio similar que contiene 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o similar, y continuar el cultivo hasta el día 12. En esta realización, las células en diferenciación muestran típicamente una expresión disminuida de CD80, CD86 y CD14, pero dan como resultado una persistencia aumentada de una población de células CD1a⁺ respecto a los controles. Dichas células en diferenciación no se impiden de volverse células dendríticas. En otra realización, se tratan células CD34⁺ durante la fase proliferativa (días 1-6 después de la siembra) durante al menos tres días consecutivos con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona u otro compuesto de la invención. En aún otra realización, se tratan células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ dos o más veces con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona u otro compuesto divulgado en la presente memoria durante los primeros seis días después de la siembra. Dichos tratamientos múltiples dan como resultado un aumento en la proliferación de las poblaciones tanto de CD34⁺ como de CD133⁺. Los tratamientos múltiples con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona u otro compuesto de la invención causan también un desplazamiento en la diferenciación de las células progenitoras CD34⁺ desde un linaje CD11c⁺CD15⁻ hacia un linaje CD11c⁻CD15⁺, concretamente, desde un linaje de célula dendrítica mieloide hacia un linaje granulocítico (FIG. 6B).

60 El tratamiento de las células progenitoras desde el día 0 de cultivo, particularmente dosis múltiples entre el día 0 y el día 6, da también como resultado un aumento del número de células progenitoras CD133⁺, particularmente un aumento de la población de progenitores CD34⁺CD133⁺. CD133 es un marcador hematopoyético que es una

alternativa al aislamiento de CD34, ya que las células CD133⁺ pueden expandirse de la misma manera que el subconjunto CD34⁺ y conservar su capacidad multilineaje (véase Kobari *et al.*, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10(2): 273-81 (2001)). Se ha reseñado que CD133⁺ está presente en células CD34⁻ de tejido cerebral fetal humano y mostraba potentes injerto, proliferación, migración y diferenciación neural cuando se inyectaba en ratones neonatos (véase *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19: 97(26): 14720-5 (2000)). Los citoblastos hematopoyéticos CD133⁺ se ha mostrado que están enriquecidos en actividad progenitora con capacidad clonogénica aumentada y mayor injerto en ratones NOD-SCID.

A pesar de lo anterior, si un compuesto de la invención se pone en contacto con células progenitoras CD34⁺ en proliferación después de tres días de cultivo (concretamente, en cualquier momento entre 3-6 días después del cultivo inicial), las células progenitoras en proliferación, que ya han empezado a expresar el marcador de superficie celular CD1a, muestran una persistencia sustancialmente aumentada de la expresión de este marcador respecto a controles tratados con DMSO. Es importante señalar que no está asociada citotoxicidad con esta persistencia aumentada. En otras palabras, el tratamiento con ActimidTM no causa la apoptosis de otras poblaciones celulares. El efecto neto es un mantenimiento de la capacidad inmune existente y el desarrollo de una nueva capacidad inmune.

Por tanto, en una realización del método de la invención, se modula la diferenciación de células CD34⁺ en células dendríticas (concretamente se suprime) poniendo en contacto las células progenitoras CD34⁺ con un compuesto de la invención el día 0 de cultivo (concretamente, el primer día de cultivo). En otra realización, se potencia la diferenciación de células CD34⁺ en células granulocíticas poniendo en contacto las células progenitoras CD34⁺ con un compuesto de la invención el día 0 de cultivo (concretamente, el primer día de cultivo). En otra realización, se potencia la diferenciación de células CD34⁺ en una población de células CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻ poniendo en contacto las células progenitoras CD34⁺ con un compuesto de la invención durante los 3 primeros días de cultivo. En otra realización, se potencia o aumenta una población CD34⁺CD133⁺ poniendo en contacto células progenitoras con un compuesto de la invención en dosis múltiples del día 0 al día 6 de cultivo. En otra realización, se potencia o aumenta la persistencia de una población de células CD1a⁺ poniendo en contacto las células progenitoras CD34⁺ con un compuesto de la invención el día 6 de cultivo, en la que dichas células CD34⁺ se diferencian en células que exhiben el marcador de superficie CD1a y en la que dicho cultivo incluye ningún contacto con dicho compuesto durante hasta seis días.

En las realizaciones anteriores, se entenderá que dichas variaciones en la administración de ActimidTM, RevimidTM o un compuesto relacionado pueden hacerse en las células progenitoras *in vivo*, p.ej., tal como en un paciente al que se han trasplantado o injertado dichas células, así como en las células progenitoras *in vitro*.

Los métodos de la invención engloban la regulación de la diferenciación de citoblastos o células progenitoras *in vitro*, que comprenden incubar las células con un compuesto, tal como una molécula orgánica pequeña de la presente invención, *in vitro*, que las induce a diferenciar en células de un linaje celular deseado, seguido del trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. En una realización preferida, se inducen las células a diferenciar en un linaje celular hematopoyético. En una realización alternativa, se inducen las células CD133⁺ a diferenciar en células endoteliales, células de cerebro, células de riñón, células de hígado o células de tracto intestinal.

Debería señalarse que los métodos descritos en la presente memoria se contemplan para uso con células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ derivadas de mamíferos, preferiblemente seres humanos, pero se contemplan también para uso con células progenitoras de aves o reptiles. Los compuestos de la invención, sin embargo, son potencial y variablemente potentes dependiendo de la especie de la que deriven las células progenitoras. Por lo tanto, se contempla también cierta variación en los métodos de cultivo, particularmente con respecto a la concentración del compuesto o compuestos administrados. Por ejemplo, las células progenitoras de origen murino son menos sensibles a los compuestos de la invención, por ejemplo 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, y requerirían mayores concentraciones para conseguir los efectos obtenibles a 1 µM con células progenitoras de origen humano. Los especialistas en la materia entenderían que dichas optimizaciones son rutinarias.

5.5. INGENIERÍA GENÉTICA DE CITOBLASTOS Y CÉLULAS PROGENITORAS

En otra realización preferida de la invención, se genomanipulan los citoblastos o células progenitoras para diferenciar de acuerdo con los métodos de la invención antes o después de exposición a los compuestos de la invención usando, por ejemplo, un vector vírico tal como un vector adenovírico o retrovírico, o usando medios mecánicos tales como captación liposómica o mediada químicamente del ADN. En realizaciones específicas, se genomanipulan las células progenitoras CD34⁺, se tratan entonces con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona o un análogo de cualquiera. En otra realización, se tratan dichas células con un compuesto de la invención y entonces se genomanipulan.

Puede introducirse un vector que contiene un transgén en una célula de interés mediante métodos bien conocidos en la materia, p.ej., transfección, transformación, transducción, electroporación, infección, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, LIPOFECTINTM, fusión lisosómica, lípidos catiónicos sintéticos, el uso de una pistola génica o un transportador vector de ADN de tal modo que el transgén se transmita a células hija, p.ej., los citoblastos de tipo embrionario o células progenitoras hijos producidos por la división de un citoblasto de tipo embrionario. Para las diversas técnicas para la transformación o transfección de

células de mamífero, véanse Keown *et al.*, 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook *et al.*, 2001, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

5 Preferiblemente, se introduce el transgén usando cualquier técnica, siempre que no sea destructiva para la membrana nuclear de la célula u otras estructuras celulares o genéticas existentes. En ciertas realizaciones, se inserta el transgén en el material genético nucleico mediante microinyección. La microinyección de células y estructuras celulares es comúnmente conocida y practicada en la materia.

10 Para una transfección estable de células de mamífero cultivadas, tales como cultivo de células en una placenta, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. La eficacia de integración depende del vector y de la técnica de transferencia usados. Para identificar y seleccionar los integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (p.ej., para resistencia a antibióticos) en el citoblasto de tipo embrionario hospedador junto con la secuencia génica de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección farmacológica (p.ej., las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las demás células mueren). Dichos métodos son particularmente útiles en métodos que implican recombinación homóloga en células de mamífero (p.ej., en citoblastos de tipo embrionario) antes de la introducción o el trasplante de las células recombinantes en un sujeto o paciente.

15 Pueden usarse una serie de sistemas de selección para seleccionar citoblastos hospedadores transformados, tales como células de tipo embrionario o células progenitoras, tales como células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺. En particular, el vector puede contener marcadores detectables o seleccionables. Otros métodos de selección incluyen, pero sin limitación, seleccionar otro marcador tal como: genes de timidina cinasa de herpesvirus simplex (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22: 817) en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También puede usarse la resistencia antimetabolito como base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150: 1) e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30: 147).

20 El transgén puede integrarse en el genoma de la célula de interés preferiblemente por integración aleatoria. En otras realizaciones, el transgén puede integrarse mediante un método dirigido, p.ej., mediante recombinación homóloga dirigida (concretamente, "activación génica" o "desactivación génica" de un gen de interés en el genoma de la célula de interés), Chappel, patente de EE.UU. n° 5.272.071 y la publicación PCT n° WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991; patente de EE.UU. n° 5.464.764; Capecchi *et al.*, expedida el 7 de noviembre de 1995; patente de EE.UU. n° 5.627.059, Capecchi *et al.* expedida el 6 de mayo de 1997; patente de EE.UU. n° 5.487.992, Capecchi *et al.*, expedida el 30 de enero de 1996).

25 Son conocidos en la materia métodos para generar células que tienen modificaciones génicas orientadas mediante recombinación homóloga. El constructo comprenderá al menos una porción de un gen de interés con una modificación genética deseada, e incluirá regiones de homología con el locus diana, concretamente la copia endógena del gen diana en el genoma del hospedador. Los constructos de ADN para integración aleatoria, en contraposición con aquellos usados para recombinación homóloga, no tienen que incluir regiones de homología para mediar la recombinación. Pueden incluirse marcadores en el constructo orientador o constructo aleatorio para efectuar una selección positiva y negativa para inserción del transgén.

30 Para crear una célula recombinante homóloga, p.ej., un citoblasto de tipo embrionario recombinante homólogo, célula placentaria endógena o célula exógena cultivada en la placenta, se prepara un vector de recombinación homóloga en que un gen de interés está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por secuencias génicas que son endógenas del genoma de la célula diana, para permitir que aparezca recombinación homóloga entre el gen de interés portado por el vector y el gen endógeno en el genoma de la célula diana. Las secuencias de ácido nucleico flanqueantes adicionales son de suficiente longitud para una recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno en el genoma de la célula diana. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (en ambos extremos 5' y 3') en el vector. Los métodos para construir vectores de recombinación homólogos y animales recombinantes homólogos a partir de citoblastos recombinantes son comúnmente conocidos en la materia (véanse, p.ej., Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51: 503; Bradley, 1991, Curr. Opin. Bio/Technol. 2: 823-29 y las publicaciones PCT n° WO 90/11354, WO 91/01140 y WO 93/04169).

35 En una realización específica, se usan los métodos de Bonadio *et al.* (patente de EE.UU. n° 5.942.496, titulada "Métodos y composiciones para transferencia génica múltiple en células óseas", expedida el 24 de agosto de 1999 y del documento PCT WO95/22611, titulado "Métodos y composiciones para estimular células óseas", publicado el 24 de agosto de 1995) para introducir ácidos nucleicos en una célula de interés, tal como un citoblasto, célula progenitora o célula exógena cultivada en la placenta, p.ej. células progenitoras óseas.

5.6. USOS DE CITOBLASTOS Y CÉLULAS PROGENITORAS ACONDICIONADOS PARA DIFERENCIACIÓN

5.6.1. Usos generales

Los citoblastos y progenitores CD34⁺ y CD133⁺ de la invención pueden inducirse a diferenciar para uso en protocolos de trasplante y tratamiento *ex vivo*. En una realización, las poblaciones de citoblastos se diferencian en un tipo celular particular y se genomanipulan proporcionando un producto génico terapéutico. En otra realización, las poblaciones de células progenitoras se expanden en células progenitoras tempranas y se genomanipulan, proporcionando un producto génico terapéutico. En otra realización, las poblaciones de células progenitoras se diferencian en un tipo celular particular, tal como un granulocito, y se genomanipulan, proporcionando un producto génico terapéutico.

Los compuestos de la invención tienen también utilidad en entornos clínicos en que el trasplante tiene el objetivo principal de restaurar la producción de glóbulos blancos de médula ósea, tal como la reversión de neutropenia y leucopenia, que son el resultado de enfermedad y/o microablación clínica. Los compuestos tienen también utilidad en la restauración de la producción de células progenitoras tempranas o granulocitos como resultado de enfermedad, diversos efectos secundarios terapéuticos o mieloablación. Los compuestos de la invención tienen también utilidad en casos en que se prefiera la supresión de la generación de glóbulos rojos, sin supresión de médula ósea.

En ciertas realizaciones, se administran citoblastos que se han tratado con los compuestos de la invención junto con células no tratadas, tales como citoblastos de sangre de cordón o sangre periférica, a un paciente necesitado de ello. En otras realizaciones, se administran células CD34⁺ o CD133⁺ que se han tratado con los compuestos de la invención junto con células no tratadas, tales como citoblastos de sangre de cordón o sangre periférica, a un paciente necesitado de ello. En una realización, se administran células progenitoras CD34⁺, tratadas desde el primer día de cultivo con un compuesto de la invención, con células no tratadas a un paciente necesitado de ello. En una realización más específica, la célula progenitora transferida es una célula progenitora CD34⁺CD38⁻CD33⁻.

Los citoblastos, p.ej. citoblastos de tipo embrionario o hematopoyéticos, o células progenitoras, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, pueden formularse como inyectable (véase el documento PCT WO 96/39101). En una realización alternativa, pueden formularse células y tejidos, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, usando hidrogeles polimerizables o reticulables como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.709.854, 5.516.532 o 5.654.381.

Pueden usarse citoblastos de tipo embrionario en lugar de clases específicas de células progenitoras (p.ej., condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas células parenquimáticas pancreáticas, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc.) en protocolos terapéuticos o de investigación en que se usarían típicamente células progenitoras.

5.6.2. Reemplazo o acrecentamiento de tejido

Los citoblastos, particularmente citoblastos de tipo embrionario, y células progenitoras de la invención, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, pueden usarse para una amplia variedad de protocolos terapéuticos dirigidos al trasplante o infusión de una población celular deseada, tal como una población de citoblastos o células progenitoras. Los citoblastos o células progenitoras pueden usarse para reemplazar o acrecentar tejidos existentes, para introducir tejidos nuevos o alterados o para unir tejidos o estructuras biológicas.

Se da a conocer en la presente memoria que pueden usarse citoblastos, tales como citoblastos de tipo embrionario de la placenta, o células progenitoras tales como células progenitoras hematopoyéticas, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, como trasplantes hematopoyéticos autólogos y alogénicos, incluyendo de tipo de HLA coincidente y no coincidente. De acuerdo con el uso de citoblastos de tipo embrionario como trasplantes hematopoyéticos alogénicos, puede ser preferible tratar el hospedador para reducir el rechazo inmunológico de las células donantes, tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. n° 5.800.539, expedida el 1 de septiembre de 1998 y la patente de EE.UU. n° 5.806.529, expedida el 15 de septiembre de 1998.

Por ejemplo, pueden usarse citoblastos de tipo embrionario, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, en protocolos de trasplante terapéutico, p.ej., para acrecentar o reemplazar citoblastos o células progenitoras del hígado, páncreas, riñón, pulmón, sistema nervioso, sistema muscular, hueso, médula ósea, timo, bazo, tejido mucoso, gónadas o cabello. Igualmente, pueden usarse células progenitoras hematopoyéticas, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, en lugar de células progenitoras de médula ósea o endoteliales.

Pueden usarse citoblastos, por ejemplo citoblastos de tipo embrionario, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, para acrecentar, reparar o reemplazar cartílago, tendón o ligamentos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se recubren prótesis (p.ej., prótesis de cadera) con constructos de tejido de cartílago de reemplazo crecidos a partir de citoblastos de tipo embrionario de la invención. En otras realizaciones, se reconstruyen articulaciones (p.ej. rodilla) con constructos de tejido de cartílago crecidos a partir de citoblastos de tipo embrionario. Los constructos de tejido de cartílago pueden emplearse también en cirugía reconstructiva mayor para

diferentes tipos de articulaciones (para los protocolos véase, p.ej., Resnick, D. y Niwayama, G., eds., 1988, "Diagnosis of Bone and Joint Disorders", 2ª ed., W. B. Saunders Co.).

5 Los citoblastos y células progenitoras tratados según los métodos de la invención pueden usarse para reparar el daño de tejidos y órganos resultante de enfermedad. En dicha realización, pueden administrarse a un paciente
 10 citoblastos de tipo embrionario para regenerar o restaurar tejidos u órganos que se han dañado como consecuencia de la enfermedad, p.ej., potenciar el sistema inmunitario después de quimioterapia o radiación o reparar tejido cardíaco después de infarto de miocardio. Los citoblastos y/o células progenitoras tratados según los métodos y con los compuestos inmunomoduladores, de la invención, o administrados junto con los compuestos inmunomoduladores de la invención, pueden trasplantarse a un individuo necesitado de ello para reparar y/o reemplazar tejido hepático, pancreático o cardíaco.

15 Los citoblastos y células progenitoras tratados según los métodos de la invención pueden usarse también para acrecentar o reemplazar células de médula ósea en trasplante de médula ósea. Se usa actualmente el trasplante de médula ósea autólogo y alogénico humano como terapia para enfermedades tales como leucemia, linfoma y otros trastornos potencialmente mortales. Sin embargo, el inconveniente de estos procedimientos es que debe retirarse una gran cantidad de médula ósea donante para asegurar que hay suficientes células para el injerto.

20 Los citoblastos de tipo embrionario recogidos según los métodos de la invención pueden proporcionar citoblastos y células progenitoras que reducirían la necesidad de una gran donación de médula ósea. Sería también, según los métodos de la invención, para obtener una pequeña donación de médula ósea y expandir entonces el número de citoblastos y células progenitoras cultivando y expandiendo en la placenta antes de infusión o trasplante a un receptor.

25 Los grandes números de citoblastos de tipo embrionario y/o progenitores obtenidos usando los métodos de la invención reducirían, en ciertas realizaciones, la necesidad de grandes donaciones de médula ósea. Deben infundirse aproximadamente 1×10^8 a 2×10^8 células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso de paciente para injerto en un trasplante de médula ósea (concretamente, de aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). Obtener 70 ml requiere una donación intensiva y una pérdida significativa de sangre en el proceso de donación. En una realización específica, las células de una donación de médula ósea pequeña (p.ej., 7-10 ml) podrían expandirse por propagación, por ejemplo en un biorreactor placentario, antes de infusión en un receptor. Los citoblastos y células progenitoras, particularmente células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, pueden proporcionar por tanto citoblastos y/o
 30 células progenitoras que reducirían o eliminarían la necesidad de una gran donación de médula ósea.

Los citoblastos de tipo embrionario aislados de la placenta pueden usarse, en realizaciones específicas, en terapia de reemplazo enzimático autólogo o heterólogo para tratar enfermedades o afecciones específicas incluyendo, pero sin limitación, enfermedades de almacenamiento lisosómico tales como de Tay-Sachs, de Niemann-Pick, síndromes de Fabry, Gaucher, Hunter y Hurler, así como otras gangliosidosis, mucopolisacaridosis y glicogenosis.

35 En otras realizaciones, las células pueden usarse como portadores transgénicos autólogos o heterólogos en terapia génica para corregir errores congénitos del metabolismo tales como adrenoleucodistrofia, fibrosis quística, enfermedades de almacenamiento de glicógeno, hipotiroidismo, anemia falciforme, síndrome de Pearson, enfermedad de Pompe, fenilcetonuria (PKU) y enfermedad de Tay-Sachs, porfirias, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, mucopolisacaridosis, enfermedad granulomatosa crónica y tirosinemia o para tratar
 40 cáncer, tumores u otras afecciones patológicas.

En otras realizaciones, las células pueden usarse en terapias o protocolos de regeneración o reemplazo de tejido autólogo o heterólogo incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de defectos epiteliales corneales, reparación de cartílago, dermoabrasión facial, membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (p.ej., retina, neuronas auditivas en la membrana basilar, neuronas olfativas en el epitelio olfativo), quemaduras y reparación de heridas por lesiones traumáticas de la piel, trasplante de cuero cabelludo (cabello) o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

45 Además, normalmente circulan un pequeño número de citoblastos y células progenitoras por la corriente sanguínea. En otra realización, dichos citoblastos exógenos o células progenitoras exógenas se recogen por aféresis, un procedimiento en que se extrae la sangre, se retiran selectivamente uno o más componentes y se reinfunde el resto de la sangre al donante. Las células exógenas recuperadas por aféresis se expanden mediante los métodos de la invención, eliminando por tanto la necesidad de donación de médula ósea completamente.

55 En otra realización, se usa la expansión de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con los métodos de la invención como tratamiento suplementario además de la quimioterapia. La mayoría de agentes de quimioterapia usados para orientarse a y destruir células cancerosas actúan destruyendo todas las células en proliferación, concretamente células que experimentan división celular. Puesto que la médula ósea es uno de los tejidos en proliferación más activamente del cuerpo, los citoblastos hematopoyéticos frecuentemente se dañan o destruyen por agentes de quimioterapia y, en consecuencia, la producción de células sanguíneas disminuye o cesa. La quimioterapia debe suspenderse a intervalos para permitir que el sistema hematopoyético del paciente reponga el

suministro de células sanguíneas antes de retomar la quimioterapia. Puede llevar un mes o más que los citoblastos anteriormente quiescentes proliferen y aumenten el recuento de glóbulos blancos hasta niveles aceptables de modo que pueda retomarse la quimioterapia (cuando de nuevo se destruyen los citoblastos de médula ósea).

5 Mientras las células sanguíneas se regeneran entre los tratamientos de quimioterapia, sin embargo el cáncer tiene tiempo de crecer y posiblemente volverse más resistente a los fármacos de quimioterapia debido a la selección natural. Por lo tanto, cuanto más tiempo se procure la quimioterapia y menor sea la duración entre tratamientos, mayores oportunidades de terminar exitosamente con el cáncer. Para acortar el tiempo entre tratamientos de quimioterapia, podrían introducirse en el paciente los citoblastos de tipo embrionario o células progenitoras diferenciadas de acuerdo con los métodos de la invención. Dicho tratamiento reduciría el tiempo en que el paciente exhibe un bajo recuento de células sanguíneas, y por lo tanto permitiría una reanudación más temprana del tratamiento de quimioterapia.

En otra realización, los citoblastos placentarios humanos pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades genéticas tales como la enfermedad granulomatosa crónica.

5.6.3. Mejora de la inflamación

15 Los citoblastos y células progenitoras, cuya diferenciación se ha modulado según los métodos de la invención, pueden usarse como agentes antiinflamatorios generales. Los inventores han descubierto que los citoblastos y células progenitoras, por ejemplo, de sangre de cordón, cuando se trasplantan a un paciente, reducen o eliminan sustancialmente la respuesta inflamatoria. Por tanto, en una realización, los métodos divulgados en la presente memoria comprenden administrar a un paciente que tiene una respuesta inflamatoria, o que es probable que desarrollen una respuesta inflamatoria, citoblastos o células progenitoras cuya diferenciación se ha modulado por uno o más de los compuestos de la invención. En realizaciones específicas, los citoblastos son citoblastos de tipo embrionario y las células progenitoras son citoblastos hematopoyéticos, particularmente células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺.

25 Los inventores han descubierto también que el tratamiento de un individuo con los compuestos de la invención, concretamente 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, estimula el desarrollo y la diferenciación de células que modulan, mejoran o reducen la respuesta inflamatoria. Por tanto, otra realización de la invención comprende 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para uso en el tratamiento de un individuo que tiene una respuesta inflamatoria, o que es probable que desarrolle una respuesta inflamatoria, en el que el tratamiento comprende administrar una dosis eficaz de uno o más compuestos de la invención a dicho individuo. En otra realización, el método comprende poner en contacto citoblastos o células progenitoras con los compuestos de la invención antes de la administración a dicho individuo y la administración entonces de una dosis terapéuticamente eficaz de dichas células a dicho individuo. En aún otra realización, la célula así tratada puede coadministrarse con uno o más de los compuestos de la invención a dicho individuo en dosis terapéuticamente eficaces.

En otras realizaciones, la inflamación puede reducirse mediante la administración de otros compuestos en combinación con los compuestos y/o células de la invención. Por ejemplo, dichos compuestos adicionales pueden comprender esteroides tales como prednisona, o cualquiera de los agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como los inhibidores de cox-1/cox-2 ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno, acetaminofeno, inhibidores específicos de cox-1 o derivados de cualquiera de estos compuestos. Dichos agentes antiinflamatorios adicionales pueden suministrarse mediante cualquier vía estándar, tal como intravenosa, intradérmica o por inhalación, y pueden suministrarse simultáneamente a los compuestos y/o células de la invención o en momentos diferentes.

45 Los métodos anteriores pueden usarse para tratar cualquier enfermedad o afección asociada a, causada por o que dé como resultado inflamación. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para tratar la inflamación causada por traumatismos tales como lesión accidental. Los métodos pueden usarse también para tratar la inflamación causada por lesión que está asociada a procedimientos quirúrgicos, en particular procedimientos quirúrgicos relacionados con los vasos tales como injertos de tejido natural, injertos vasculares sintéticos, válvulas cardíacas o angioplastias. Los métodos pueden usarse también para prevenir la estenosis o reestenosis. Los métodos anteriores pueden usarse también para tratar la inflamación resultante de cualquier enfermedad o afección incluyendo, pero sin limitación, enfermedades o afecciones tales como enfermedad cardíaca, aterosclerosis, alergia o hipersensibilidad, trastornos inmunitarios, trastornos autoinmunitarios tales como artritis o inflamaciones debidas a infecciones. Además de tratar una afección inflamatoria que ya existe, las células y/o compuestos de la invención pueden administrarse a un individuo profilácticamente, para reducir la aparición de inflamación. Esto es particularmente útil como forma de terapia preoperatoria, con lo que la reducción de la respuesta inflamatoria postoperatoria mejora las posibilidades del individuo de un resultado clínico exitoso y reduce el tiempo de estancia hospitalaria y los periodos de incapacidad.

La monitorización de la eficacia del efecto antiinflamatorio de los tratamientos anteriores puede lograrse mediante cualquier método conocido, tales como inspección visual, barridos de IRM o TAC, determinación de la temperatura sistémica o local, etc. Debido a que una proteína conocida como proteína C reactiva es un marcador para inflamación, puede monitorizarse la eficacia de los métodos de tratamiento anteriores ensayando la reducción de la

cantidad de proteína C reactiva en un individuo, particularmente en la zona que experimentó anteriormente inflamación.

5.6.4. Producción de poblaciones de células dendríticas y células granulocíticas

5 Los compuestos de la invención pueden administrarse específicamente para modular la diferenciación de citoblastos y/o células progenitoras a lo largo de una ruta de desarrollo granulocítico frente a una ruta de desarrollo de células dendríticas. De manera similar, la célula de la invención puede modularse *in vivo* o *ex vivo*, produciendo poblaciones expandidas de células dendríticas o granulocitos.

10 Las células dendríticas pueden usarse como reactivos para terapias de base inmunitaria. Por ejemplo, pueden cocultivarse células dendríticas con linfocitos T y antígeno de proteína *in vitro*, impulsando por tanto la activación específica de antígeno *ex vivo* de linfocitos T. Se administran entonces los linfocitos T activados de forma autóloga para efectuar una respuesta inmunitaria específica de antígeno *in vivo* (documento WO 97/24438). En otro ejemplo, pueden activarse linfocitos T *in vitro* mediante la puesta en contacto de los linfocitos T con células dendríticas que expresan directamente una proteína antigénica a partir de un constructo recombinante. Los linfocitos T activados pueden usarse para infusión autóloga (documento WO 97/29183).

15 Los linfocitos T activados con péptidos o fragmentos de proteína específicos se vuelven agentes inmunizantes contra las proteínas, células u organismos de los que derivan los péptidos o fragmentos. Por ejemplo, las células dendríticas pueden cargarse con péptidos específicos de tumor. La aplicación específica de activación de linfocitos T *ex vivo* impulsada por DC al tratamiento de cáncer de próstata se describe y reivindica en la patente de EE.UU. nº 5.788.963. Mayordomo *et al.* demostraron que las células dendríticas derivadas de médula ósea sometidas a pulsos con péptidos tumorales sintéticos desencadenan inmunidad protectora y antitumoral terapéutica (*Nature Medicine* 1: 1297-1302 (1995); *J. Exp. Med.*, 183: 1357-1365 (1996)). La patente de EE.UU. nº 5.698.679 describe proteínas de fusión de inmunoglobulina que suministran péptidos antigénicos a células presentadoras de antígeno (APC) diana, incluyendo células dendríticas, *in vivo*. Puede usarse este mismo enfoque con péptidos o antígenos derivados de virus, bacterias o parásitos para crear vacunas víricas, bacterianas o parasitarias.

25 Las células dendríticas son también dianas para intervención terapéutica en el tratamiento de diversos trastornos inmunomediados. Por ejemplo, las células dendríticas se han implicado como un actor importante en la patogénesis y patofisiología del SIDA (p.ej., sirven como reservorios para el virus VIH). Véanse Zoetewij *et al.*, *J. Biomed. Sci.* 5(4): 253-259 (1998); Grouard *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 9(4): 563-567 (1997); Weissman *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.* 10(2): 358-367 (1997). Se describen métodos *in vitro* para cribar candidatos farmacéuticos a agentes que anulen la infección por VIH de DC en la patente de EE.UU. nº 5.627.025. En otro ejemplo, las células dendríticas pueden manipularse para inducir insensibilidad ante linfocitos T de tejido u órgano donante en un receptor (véase la patente de EE.UU. nº 6.375.950).

35 Los granulocitos pueden usarse en transfusiones de granulocitos en el tratamiento o la prevención de infecciones, p.ej., sepsis neonatal bacteriana, infecciones asociadas a neutropenia en pacientes de cáncer e infecciones potenciales en pacientes que reciben trasplantes de médula ósea. Los granulocitos pueden usarse también en la prevención o el tratamiento de alergia. Por ejemplo, los granulocitos implicados en la inflamación mediada por IgE (concretamente, granulocitos recubiertos con anticuerpos de IgE, algunos de los cuales tienen especificidad por el alérgeno) pueden inactivarse y usarse para aliviar los síntomas de una respuesta inmunitaria ya establecida contra el alérgeno (véase la patente de EE.UU. nº 6.383.489).

40 Por tanto, en una realización divulgada en la memoria descriptiva, se expande una población de granulocitos en un individuo a partir de las células progenitoras de la invención mediante un método que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, en la que dicha cantidad es suficiente para inducir la producción de una pluralidad de granulocitos a partir de células CD34⁺ endógenas de dicho individuo. En otra realización, se expande una población de granulocitos en un individuo mediante un método que comprende administrar a dicho individuo una población de células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺, en la que dichas células se han puesto en contacto con un compuesto de la invención durante al menos tres días, y administrar dicha población de células a dicho individuo. En otra realización, se expande la población de granulocitos en un individuo mediante un método que comprende administrar a dicho individuo una población de células progenitoras CD34⁺ o CD133⁺ y un compuesto de la invención, en la que la dosis de dicho compuesto de la invención es suficiente para causar la diferenciación de una pluralidad de dicha población de células en granulocitos. En una realización específica de las realizaciones anteriores, dichas células progenitoras CD34⁺ son células CD34⁺CD38⁻CD33⁺.

5.6.5. Tratamiento de otras enfermedades y afecciones

55 Los citoblastos y células progenitoras diferenciados de la invención, o los compuestos de la invención, pueden usarse también, solos o en combinación, para tratar o prevenir una variedad de otras enfermedades o afecciones. En ciertas realizaciones, por ejemplo, la enfermedad o trastorno incluye, pero sin limitación, una enfermedad vascular o cardiovascular, aterosclerosis, diabetes, anemia aplásica, mielodisplasia, infarto de miocardio, trastorno convulsivo, esclerosis múltiple, apoplejía, hipotensión, parada cardíaca, isquemia, inflamación, pérdida de función cognitiva relacionada con la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa,

enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad renal isquémica, traumatismo cerebral o de médula espinal, derivación cardiopulmonar, glaucoma, isquemia retiniana, traumatismo retiniano, enfermedades de almacenamiento lisosómico tales como síndromes de Tay-Sachs, Niemann-Pick, Fabry, Gaucher, Hunter y Hurler, así como otras gangliosidosis, mucopolisacaridosis, glicogenosis, errores congénitos del metabolismo tales como adrenoleucodistrofia, fibrosis quística, enfermedades de almacenamiento de glicógeno, hipotiroidismo, anemia falciforme, síndrome de Pearson, enfermedad de Pompe, fenilcetonuria (PKU), porfirias, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, mucopolisacaridosis, enfermedad granulomatosa crónica y tirosinemia, enfermedad de Tay-Sachs, cáncer, tumores u otras afecciones patológicas o neoplásicas.

En otras realizaciones, pueden usarse las células de la invención (p.ej., que se han expuesto a los compuestos de la invención) en el tratamiento de cualquier clase de lesión debida a traumatismos, particularmente traumatismos que implican inflamación. Los ejemplos de dichas afecciones relacionadas con traumatismos incluyen lesiones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo lesiones de cerebro, médula espinal o tejido que rodea lesiones del SNC del sistema nervioso periférico (SNP) o lesiones de cualquier otra parte del cuerpo. Dicho traumatismo puede estar causado por accidentes o puede ser el resultado clínico normal o anormal de un procedimiento médico tal como cirugía o angioplastia. El traumatismo puede estar relacionado con una ruptura u oclusión de un vaso sanguíneo, por ejemplo, en apoplejía o flebitis. En realizaciones específicas, pueden usarse las células en terapias o protocolos de regeneración o reemplazo de tejido autólogo o heterólogo incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de defectos epiteliales corneales, reparación de cartílago, dermoabrasión facial, membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (p.ej., retina, neuronas auditivas en membrana basilar, neuronas olfativas en epitelio olfativo), quemaduras y reparación de heridas por lesiones traumáticas de la piel, o para reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

En una realización específica, la enfermedad o trastorno es anemia aplásica, mielodisplasia, leucemia, un trastorno de médula ósea o una enfermedad o trastorno hematopoyético. En otra realización específica, el sujeto es un ser humano.

5.7. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención engloba composiciones farmacéuticas que comprenden una dosis y/o varias dosis de uno o más de los compuestos de la invención, en las que dicha dosis o varias dosis son eficaces tras administración única o múltiple, antes o después del trasplante de células progenitoras o citoblastos CD34⁺ o CD133⁺ humanos acondicionados o no acondicionados a un individuo, ejerciendo un efecto suficiente para inhibir, modular y/o regular la diferenciación de estos citoblastos y/o células progenitoras en tipos celulares específicos, p.ej., células de linaje hematopoyético, particularmente células de linaje mielóide. En este contexto, como en otras partes del contexto de esta invención, "individuo" significa cualquier individuo al que se administran los compuestos o células, p.ej. un mamífero, ave o reptil.

Por tanto, en una realización específica, dicha dosis o varias dosis de los compuestos de la invención, administradas a un individuo, modulan la diferenciación de células progenitoras CD34⁺ endógenas en células dendríticas. En una realización más específica, la dosis o varias dosis aumentan el número de células granulocíticas en dicho individuo al que se han administrado dicha dosis o varias dosis. En otra realización más específica, la dosis o varias dosis aumentan el número de células progenitoras CD34⁺CD38⁻CD33⁺ o CD34⁺CD38⁻CD33⁻ en un mamífero al que se han administrado dicha dosis o varias dosis.

En otras realizaciones, se trasplantan células progenitoras o citoblastos CD34⁺ o CD133⁺ de interés a un sujeto humano o paciente necesitado de ello. Posteriormente al trasplante, se administra un compuesto de la invención al sujeto humano o paciente para modular la diferenciación de las células trasplantadas de interés *in vivo*. En una realización específica, dichas células se diferencian *in vivo* en granulocitos. En aún otras realizaciones, se modula la diferenciación de células progenitoras o citoblastos de interés en un sujeto humano o paciente *in situ* mediante la administración de un compuesto de la invención.

En aún otra realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden poblaciones de citoblastos o células progenitoras de sangre de cordón aisladas que se han acrecentado con células progenitoras hematopoyéticas que se han diferenciado por exposición a compuestos que inhiben la actividad de TNF- α , de acuerdo con los métodos de la invención. En otra realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden sangre de cordón que se suplementa con citoblastos o células progenitoras puestos en contacto con los compuestos de la invención; en una realización específica, dichos citoblastos o células progenitoras se han diferenciado por dichos compuestos.

En aún otra realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden tanto uno o más de los compuestos inmunomoduladores de la invención como los citoblastos y/o células progenitoras de la invención. Dichas composiciones pueden prepararse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 días antes de la administración para modular la diferenciación de los citoblastos y/o células progenitoras a lo largo de diferentes rutas de desarrollo/diferenciación.

En aún otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender los citoblastos o células progenitoras mismos, en las que dichas células se han diferenciado según los métodos divulgados en la presente memoria. Por tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de citoblastos y/o células progenitoras, en la que dicha pluralidad de citoblastos y/o células progenitoras se ha puesto en contacto con uno o más de los compuestos inmunomoduladores de la invención a una concentración y durante un tiempo suficiente para que dicho compuesto o compuestos modulen la diferenciación de dichas células.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden los compuestos de la invención, administrados a un individuo; las células de la invención, administradas a un individuo en combinación con los compuestos de la invención, administrados separadamente y las células de invención puestas en contacto con los compuestos de la invención administrados a dicho individuo.

La invención proporciona métodos de tratamiento y prevención de una enfermedad o trastorno mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una composición de la invención a un sujeto mamífero, preferiblemente humano, para efectuar la modulación de la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras o citoblastos CD34⁺ o CD133⁺ trasplantados a, o residentes en, el sujeto. En una realización, la invención proporciona un método de modulación de la diferenciación de células progenitoras o citoblastos CD34⁺ y CD133⁺ para aumentar en un mamífero el número de células granulocíticas. En otra realización, puede modularse cualquier linaje celular que pueda derivar de una célula progenitora o citoblasto CD34⁺ y/o CD133⁺ mediante la administración de los compuestos de la invención a un mamífero, preferiblemente un ser humano. El término "mamífero", como se usa en la presente memoria, engloba cualquier mamífero. Preferiblemente, el mamífero está necesitado de dicho tratamiento o prevención. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, conejillos de Indias, monos, etc., más preferiblemente un ser humano.

La administración de compuestos de la invención puede ser sistémica lo local. En la mayoría de casos, la administración a un mamífero dará como resultado la liberación sistémica de los compuestos de la invención (concretamente, a la corriente sanguínea). Los métodos de administración incluyen las vías entéricas, tales como administración oral, bucal, sublingual y rectal; la administración tópica, tal como transdérmica e intradérmica y la administración parenteral. Las vías parenterales adecuadas incluyen inyección a través de una aguja hipodérmica o catéter, por ejemplo, las rutas de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intraventricular, intratecal, intraocular e intracameral y no inyección, tales como administración intravaginal, rectal o nasal. Preferiblemente, los compuestos y composiciones de la invención se administran por vía oral. En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la invención localmente a la zona necesitada de tratamiento. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante infusión local durante cirugía, aplicación tópica, p.ej. junto con un apósito de herida después de cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas de Silastic o fibras.

Los compuestos de la invención pueden administrarse mediante sistemas de suministro típicos así como no estándares, p.ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc. Por ejemplo, los compuestos y composiciones de la invención pueden suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533; Treat *et al.*, en "Liposomes" en "Therapy of Infectious Disease and Cancer", López-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989); López-Berestein, *ibíd.*, pág. 317-327; véase en general *ibíd.*). En otro ejemplo, los compuestos y composiciones de la invención pueden suministrarse en un sistema de liberación controlado. En una realización, puede usarse una bomba (véanse Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14: 201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88: 507 Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 3: 574). En otro ejemplo, pueden usarse materiales poliméricos (véanse "Medical Applications of Controlled Release", Langer and Wise (eds.), CRC Press., Boca Raton, Fla. (1974); "Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance", Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228: 190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105). En todavía otro ejemplo, puede disponerse un sistema de liberación controlada en la proximidad de la zona diana para tratar, p.ej. el hígado, requiriendo por tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p.ej., Goodson, en "Medical Applications of Controlled Release", *supra*, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). Pueden usarse otros sistemas de liberación controlada discutidos en la revisión por Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533). Cuando se administra como una composición, se formulará un compuesto de la invención con una cantidad adecuada de un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable para proporcionar la forma de administración apropiada al mamífero. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en mamíferos, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" hace referencia a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con que se formula un compuesto de la invención para administración a un mamífero. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser disolución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además,

pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Preferiblemente, cuando se administran a un mamífero, los compuestos y composiciones de la invención y los vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables son estériles. Un medio acuoso es un vehículo preferido cuando se administra el compuesto de la invención por vía intravenosa, tal como agua, disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol.

Los presentes compuestos y composiciones pueden tomar la forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, aglomerados comprimidos oblongos, polvos, gránulos, jarabes, elixires, disoluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios o formulaciones de liberación mantenida de los mismos, o cualquier otra forma adecuada para administración a un mamífero. En una realización preferida, los compuestos y composiciones de la invención se formulan para administración de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración oral o intravenosa a seres humanos. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una cápsula de gelatina dura. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticamente adecuados y métodos para la formulación de los mismos en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., 19ª ed., 1995, capítulos 86, 87, 88, 91 y 92.

Los compuestos y composiciones de la invención formulados para suministro oral están preferiblemente en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras o cualquier forma farmacéutica comprimida. Además, cuando están en forma de comprimido o píldora, los compuestos y composiciones pueden recubrirse para retardar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción mantenida durante un periodo extenso de tiempo. Son también adecuadas membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto impulsor osmóticamente activa para los compuestos y composiciones administrados por vía oral de la invención. En estas últimas plataformas, se embebe el fluido del entorno que rodea la cápsula por el compuesto impulsor, que se hincha para desplazar el agente o composición de agente a través de una abertura. Estas plataformas de suministro pueden proporcionar un perfil de suministro de orden esencialmente cero en contraposición a los perfiles con picos de las formulaciones de liberación inmediata. Puede usarse también un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir vehículos, excipientes y diluyentes estándares tales como estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, jarabe y metilcelulosa; las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, aceite mineral, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo. Dichos vehículos son preferiblemente de pureza farmacéutica. Los compuestos y composiciones administrados por vía oral de la invención pueden incluir opcionalmente uno o más agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; uno o más agentes aromatizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria o cereza o uno o más agentes colorantes para proporcionar una preparación farmacéuticamente palatable.

El régimen de dosificación terapéuticamente eficaz para el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de su naturaleza y gravedad, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándares según el criterio de un facultativo médico. Además, pueden usarse ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar las dosificaciones óptimas. Por supuesto, la cantidad de compuesto de la invención que constituye una dosis terapéuticamente eficaz depende también de la vía de administración. En general, los intervalos de dosificación adecuados para administración oral son de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 20 mg de un compuesto de la invención por kg de peso corporal al día, preferiblemente de aproximadamente 0,7 mg a aproximadamente 6 mg, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 mg a aproximadamente 4,5 mg. En una realización preferida, se administra por vía oral a un mamífero, preferiblemente un ser humano, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg de un compuesto de la invención al día, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 300 mg al día, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 250 mg en dosis única o divididas. Las cantidades de dosificación descritas en la presente memoria hacen referencia a las cantidades totales administradas; es decir, si se administra más de un compuesto de la invención, las dosificaciones preferidas corresponden a la cantidad total de compuestos de la invención administrados. Las composiciones orales contienen preferiblemente de 10 a 95 % de un compuesto de la invención en peso. Las formas de dosificación oral unitarias preferidas incluyen píldoras, comprimidos y cápsulas, más preferiblemente cápsulas. Típicamente, dichas formas de dosificación unitarias contendrán aproximadamente 0,01 mg, 0,1 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg o 500 mg de un compuesto de la invención, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg de compuesto por dosificación unitaria.

En otra realización, los compuestos y composiciones de la invención pueden administrarse por vía parenteral (p.ej., por vías intramuscular, intratecal, intravenosa e intraarterial), preferiblemente intravenosa. Típicamente, los compuestos y composiciones de la invención para administración intravenosa son disoluciones en vehículos acuosos isotónicos estériles, tales como agua, disolución salina, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. Cuando sea necesario, las composiciones pueden incluir también un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden incluir opcionalmente un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de inyección. Para administración intravenosa, los compuestos y composiciones de la invención pueden suministrarse como un polvo liofilizado seco estéril o concentrado anhidro en un envase sellado herméticamente, tal

como una ampolla o saquito, indicando el envase la cantidad de agente activo. Dicho polvo o concentrado se diluye entonces con un medio acuoso apropiado antes de la administración intravenosa. Puede proporcionarse una ampolla de agua estéril, disolución salina u otro medio acuoso apropiado con el polvo o concentrado antes de la administración. O pueden suministrarse las composiciones en forma premezclada lista para administración. Cuando se va a administrar un compuesto o composición de la invención por infusión intravenosa, puede dispensarse, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua estéril de pureza farmacéutica, disolución salina u otro medio adecuado.

La administración rectal puede efectuarse mediante el uso de supositorios formulados a partir de portadores convencionales tales como manteca de cacao, aceites vegetales modificados y otras bases grasas. Los supositorios pueden formularse mediante métodos bien conocidos usando formulaciones bien conocidas, por ejemplo, véase "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., 19ª ed., 1995, pág. 1591-1597.

Para formular y administrar las formas de dosificación tópicas, pueden usarse medios de suministro transdérmico e intradérmico bien conocidos tales como lociones, cremas y pomadas y dispositivos de suministro transdérmico tales como parches (Ghosh, T. K.; Pfister, W. R.; Yum, S. I. "Transdermal and Topical Drug Delivery Systems", Interpharm Press, Inc. pág. 249-297). Por ejemplo, un diseño de parche de tipo depósito puede comprender una película de soporte recubierta con un adhesivo y un compartimento de depósito que comprende un compuesto o composición de la invención, que está separado de la piel por una membrana semipermeable (p.ej., la patente de EE.UU. nº 4.615.699). La capa de soporte recubierta adhesiva se extiende alrededor de los límites del depósito, proporcionando un sello concéntrico con la piel y manteniendo el depósito adyacente a la piel.

La invención proporciona también paquetes o kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases llenados con uno o más compuestos de la invención. Puede estar opcionalmente asociado con dicho envase o envases una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, reflejando dicha nota la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana. En una realización, el kit contiene más de un compuesto de la invención. En otra realización, el kit comprende un compuesto de la invención y otro agente biológicamente activo.

En los compuestos de la invención se ensaya preferiblemente *in vitro* e *in vivo* la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes del uso en seres humanos. Por ejemplo, pueden usarse ensayos *in vitro* para determinar si se prefiere la administración de un compuesto específico de la invención o una combinación de compuestos de la invención. Puede demostrarse que los compuestos y composiciones de la invención son eficaces y seguros usando sistemas de modelo animal. Serán conocidos otros métodos por el especialista en la materia.

5.8. ENSAYOS QUE USAN LOS MÉTODOS DE LA INVENCIÓN

La metodología descrita anteriormente, concretamente el examen del efecto de IMID™ tales como 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona sobre la diferenciación en células progenitoras tempranas, tales como células CD34⁺, puede aplicarse a cualquier compuesto de interés cuyo efecto sobre la diferenciación se desee conocer. Esto puede lograrse de varios modos.

En una realización, compuesto puede sustituirse simplemente por 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o cualquiera de los demás compuestos de la invención. Aquí, las células progenitoras CD34⁺ y/o células progenitoras CD133⁺ pueden ponerse en contacto con el compuesto de interés a concentraciones variables que permitan la proliferación y/o diferenciación de las células progenitoras en células comprometidas y/o totalmente diferenciadas. Pueden usarse los métodos de cultivo divulgados en la presente memoria, particularmente los métodos de cultivo divulgados en la sección 5.4. El efecto, si lo hubiera, del compuesto de interés se determina valorando el cambio, si lo hubiera, de las poblaciones celulares que se diferencian a partir de las células progenitoras, donde el cambio puede monitorizarse mediante cualquier cambio fenotípico, pero se valora preferiblemente determinando los marcadores de superficie celular que están presentes o ausentes. Como los métodos de la invención, el compuesto de interés puede administrarse en una única dosis en cualquier momento desde el cultivo inicial para conseguir la célula o células diferenciadas finalmente. Como alternativa, el compuesto de interés puede administrarse en dosis múltiples durante la etapa proliferativa, la etapa de diferenciación o ambas. El cambio en las características fenotípicas de las células progenitoras en proliferación/diferenciación se compara preferiblemente con un cultivo de control de células, tales como células tratadas con DMSO. Sería de particular interés cualquier efecto sobre la proliferación o diferenciación tales como, pero sin limitación: modulación de la tasa de proliferación, modulación de la tasa de diferenciación, modulación de la diferenciación de las células progenitoras en células precursoras comprometidas, bloqueo de la diferenciación en tipos celulares particulares y potenciación de la diferenciación en tipos celulares particulares.

En otra realización, el cultivo, proliferación y diferenciación tienen lugar como anteriormente, pero el compuesto de interés se pone en contacto con la célula o células progenitoras junto con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona. De esta manera, pueden determinarse los efectos, posiblemente sinérgicos, de múltiples compuestos. Sería de particular interés cualquier compuesto que no tuviera efecto sobre la proliferación o diferenciación solo, o ligero, pero que tuviera un efecto significativo en combinación con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-

piperidil)isoindolin-1,3-diona. En otra realización, pueden ponerse en contacto dos compuestos cualesquiera de interés con las células progenitoras en condiciones de cultivo, como anteriormente, que permitan normalmente la proliferación y diferenciación de las células progenitoras. Aquí, preferiblemente un experimento en que se ponen en contacto células precursoras con dos compuestos de interés contiene un control en que se ponen en contacto las células progenitoras con solo uno de cada uno de dichos compuestos; un control en que se ponen en contacto las células con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y un control en que no se ponen en contacto las células con un compuesto, o se ponen en contacto con DMSO. De nuevo, las variaciones en las dosificaciones y el momento de la dosificación son como se describe anteriormente y en la sección 5.4.

6. EJEMPLOS DE TRABAJO

6.1. EJEMPLO 1: Efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la diferenciación de células progenitoras CD34+

En el siguiente ejemplo, se estudiaron los efectos de talidomida (Thal), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la diferenciación de células (progenitoras hematopoyéticas) CD34+ y la generación de unidades de formación de colonias (CFU). De forma significativa, los resultados demuestran que pueden usarse 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para suprimir específicamente la generación de colonias eritropoyéticas (BFU-E y CFU-E), mientras que se tanto se acrecienta la generación de colonias formadoras de leucocitos y plaquetas (CFU-GM) como se potencia la producción de unidades de formación de colonias totales (CFU-Total).

Los métodos de la invención pueden usarse por lo tanto para regular la diferenciación de citoblastos, y pueden usarse también para estimular la tasa de formación de colonias, proporcionando beneficios significativos para el trasplante de citoblastos hematopoyéticos al mejorar la velocidad de injerto de médula ósea y la recuperación de la producción de leucocitos y/o plaquetas.

Se sembraron células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón en discos de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1000 células por pocillo en IMDM suplementado con suero fetal de ternero al 20 % y citocinas (IL-3, G-CSF y ligando kit (R&D Systems, Inc.). Se expusieron las células a talidomida (Thal), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, o DMSO (un compuesto de control) y se dejaron cultivar durante 6 días. Se sembraron células CD34+ de sangre de cordón en discos de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1000 células por pocillo en IMDM suplementado con suero fetal de ternero al 20 % y citocinas (IL-3, GCSF y ligando kit (KL) (R&D Systems, Inc.)). Después de cultivar, se tiñeron las células y se clasificaron con un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Se recolectaron 400 µl de células teñidas y se diluyeron a 1,0 ml con suero fetal de ternero al 1 % en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se contaron las células para determinar el efecto de la modulación de la diferenciación de citoblastos. Se muestran en la FIG. 1 los recuentos celulares obtenidos.

Estos resultados demuestran que los compuestos de la invención son eficaces en la modulación del compromiso de linaje de los citoblastos progenitores hematopoyéticos. Por tanto, pueden usarse 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para suprimir específicamente la generación de glóbulos rojos o colonias eritropoyéticas (BFU-E y CFU-E), mientras que tanto se acrecienta la generación de colonias formadoras de leucocitos y plaquetas (CFU-GM) como se potencia la producción de unidades formadoras de colonias totales. Los métodos de la invención pueden usarse por lo tanto para regular la diferenciación de citoblastos, y pueden usarse también para estimular la tasa de formación de colonias específicas, proporcionando beneficios significativos al trasplante de citoblastos hematopoyéticos al mejorar la velocidad de injerto de médula ósea y la recuperación de la producción de leucocitos y/o plaquetas mediante el compromiso de los citoblastos originales hacia linajes injertables deseados. Se representan además en la FIG. 2 la inhibición de la eritropoyesis y la expansión de poblaciones progenitoras CD34+CD38- por 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona.

6.2. EJEMPLO 2: Efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la proliferación y diferenciación de células CD34+ de sangre de cordón humanas

En el siguiente ejemplo, se estudiaron los efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la proliferación y diferenciación de células mononucleares de sangre de cordón (CB) en células (progenitoras hematopoyéticas) CD34+. Las células mononucleares de sangre de cordón son una población mixta de células que incluyen una pequeña población de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+). Un subconjunto de esta pequeña población de células CD34+ incluye una población (aproximadamente un 1 % de las células mononucleares CB totales) de células CD34+CD38+ y una población aún menor (menos de un 1 % de las células mononucleares CB totales) de células CD34+CD38-. De forma significativa, los resultados demuestran que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona causa la regulación positiva (diferenciación aumentada) de células CD34+ y que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-

piperidil)isoindolin-1,3-diona y la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona pueden aparentemente inhibir o retardar la diferenciación de citoblastos o células progenitoras hematopoyéticas en comparación con los controles positivos y negativos (FIGS. 3-7).

6.2.1. Materiales y métodos

5 Se iniciaron células CB CD34+ a 4×10^4 células/ml en una placa de 24 pocillos en FCS al 20 %/IMDM (suero fetal de ternero/medio de Dulbecco modificado por Iscove) suplementado con citocinas (IL3, G-CSF y ligando Kit) (R&D Systems, Inc.). Se incluyeron talidomida (Thal), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona en el cultivo a tres concentraciones diferentes: 5 µg/ml, 1 µg/ml y 0,3 µg/ml. Se usaron los mismos volúmenes de DMSO como controles. Se usó también un control negativo sin ningún compuesto (indicado por "ninguno" en las FIG. 3-7). Se cultivaron las células a 37 °C y 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada durante 7 días. Se recolectaron entonces las células de cada pocillo.

Se determinó el número de células totales de cada pocillo contando en un CELL-DYN® 1700 (Abbott Diagnostics) y se analizó la expresión de CXCR4, CD45, CD34, CD38, CD11b y Gly-A por tinción con FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) (FIGS. 3-7).

15 Se cultivaron células CB de dos donantes diferentes (CB2276 y CB2417), se ensayaron y se analizaron separadamente (Tabla 1).

6.2.2. Resultados y discusión

Se ensayaron los efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la expansión estimulada por citocinas de células CD34+. Como se muestra en la FIG. 4, talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona no tienen un efecto significativo sobre la proliferación de células CD34+ que se cultivan en presencia de IL-3, ligando Kit (KL) y G-CSF cuando se comparan con el control negativo ("ninguno"). Sin embargo, talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona parecen inducir el rendimiento de un número ligeramente mayor de células cuando se comparan con el control de DMSO. Considerando que el DMSO tiene generalmente un efecto negativo sobre la proliferación celular en estos experimentos, estos resultados sugieren que los compuestos talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona pueden tener un efecto estimulante sobre la proliferación de células CD34+ que se cultivan en presencia de IL-3, KL y G-CSF, puesto que se usa la misma cantidad de DMSO como portador. A este respecto, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona tienen un mayor efecto que talidomida.

Se analizaron los efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la expresión de la diferenciación celular por análisis FACS de las proteínas de superficie CXCR4 y CD34 (FIG. 3 y 4). 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, pero no talidomida, mostraban un efecto inhibitorio sobre la expresión de CXCR4. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona tenía un efecto más potente que la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona.

Con respecto a la proteína de superficie CD34+, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona causaba la regulación positiva (proliferación aumentada) de células CD34+ tanto en cultivos de CB2276 como de CB2417. Talidomida y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, sin embargo, exhibían un efecto similar en un donante pero no en el otro donante. De forma interesante, tanto en células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona como 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, la mayoría de células CD34+ y CD34- son CD38-, mientras que las células en las poblaciones tratadas con control, DMSO y talidomida son principalmente CD38+. Esto indica que pueden usarse 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para suprimir específicamente la generación de glóbulos rojos o colonias eritropoyéticas (BFU-E y CFU-E), mientras que tanto se acrecienta la generación de colonias formadoras de leucocitos y plaquetas (CFU-GM) como se potencia la producción de unidades formadoras de colonias totales. Los métodos de la invención pueden usarse por lo tanto para regular la diferenciación de citoblastos, y pueden usarse también para estimular la tasa de formación de colonias, proporcionando beneficios significativos al trasplante de citoblastos hematopoyéticos al mejorar la velocidad de injerto de médula ósea y la recuperación de la producción de leucocitos y/o plaquetas. Véase la Tabla 4 siguiente.

Se analizaron los efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la expresión de la diferenciación celular por análisis FACS de proteínas de superficie de células que eran CD34+CD38- frente a CD34+CD38+ o que eran CD11b+. Se exponen los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de los efectos sobre la diferenciación celular y la expresión de marcadores de superficie celular de CD34, CD38 y CD11b en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón

Población de células CD34+CD38-/CD34+CD38+

CB2276

	Ninguno	DMSO	Thal	4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona
5 µg/ml	1,2/6,3	2,7/3,7	3,5/6,5	17,3/02	
1 µg/ml	1,5/8,5	2,6/5,3	1,0/3,8	15,0/0,2	10,3/1
0,3 µg/ml	ND	1,5/5,7	3,2/15,1	5,9/0,2	9,8/1,7

CB2417

	Ninguno	DMSO	Thal	4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona
5 µg/ml	0,5/5,7	0,8/5,2	1,1/3,0	14,7/0,1	4,2/0,3
1 µg/ml	0,5/4,9	0,7/3,9	1,0/3,8	12,0/0,8	3,8/0,6
0,3 µg/ml	ND	0,5/4,4	0,8/5,0	5,9/0,2	3,4/0,9

CB2276

	Ninguno	DMSO	Thal	4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona
5 µg/ml	11,7 %	5,0 %	8,1 %	1,6 %	4,8 %
1 µg/ml	9,1 %	7,3 %	6,2 %	3,8 %	8,6 %
0,3 µg/ml	ND	7,0 %	7,6 %	6,9 %	13,3 %

CB2417

	Ninguno	DMSO	Thal	4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona
5 µg/ml	12,0 %	7,2 %	6,5 %	2,5 %	5,5 %
1 µg/ml	7,2 %	5,3 %	5,2 %	3,9 %	8,2 %
0,3 µg/ml	ND	5,1 %	7,8 %	8,4 %	11,2 %

No hubo un cambio significativo de tamaño de la población de células CD11b+ y, en el caso de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, se observó una mayor población de células CD11b+ a concentraciones menores.

- 5 Sin embargo, el nivel de expresión de CD11b disminuyó en células tratadas tanto con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona como 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, como se determina por la inmunofluorescencia media (MIF), indicando que se reprimía la expresión de CD11b. Esto sugiere que las células CD11b+ están en un estado menos diferenciado cuando se cultivan en presencia de.

6.3. EJEMPLO 3: Efectos de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre células MNC de sangre de cordón humana

En los ejemplos anteriores, se mostró que 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona regulan negativamente de forma significativa la expresión de CXCR4 en células CD34+ de sangre de cordón y aumentan la población de células CD34+CD38-. En este ejemplo, se muestra que 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona tienen actividades similares sobre las células mononucleadas (MNC) de sangre de cordón.

6.3.1. Materiales y métodos

Se aislaron MNC de sangre de cordón, que se habían criopreservado y descongelado usando métodos estándares, mediante el método de separación de Ficoll estándar y se cultivaron en placas de 24 pocillos a $0,5 \times 10^6$ células/ml en FCS al 20 %-IMDM con citocinas (IL6, KL y G-CSF 10 ng/ml cada una) por triplicado. Los grupos experimentales eran ninguno (citocinas solo), DMSO (1,7 μ l), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona (5,0 μ g en 1,7 μ l de DMSO), 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona (5 μ g en 1,7 μ l de DMSO). Se recolectaron las células cultivadas y se analizaron por tinción con FACS después de 1 semana de cultivo. Se resumen los resultados en la Tabla 2 y en las FIG. 8-12. Se expresan los datos como media \pm DE de tres pocillos independientes.

Tabla 2

	Ninguno	DMSO	4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona
Células totales (1×10^6)	0,50 \pm 0,10	0,30 \pm 0,17	0,223 \pm 0,06	0,30 \pm 0
CD34(%)	2,50 \pm 0,33	2,73 \pm 0,07	3,31 \pm 0,64	2,34 \pm 0,22
Células CD34+ totales	7933 \pm 7310	8133 \pm 4623	7800 \pm 2600	7166 \pm 802
CD34+CD38- (%)	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,04	1,70 \pm 0,22	0,80 \pm 0,29
CXCR4+CD45+ (%)	8,7 \pm 0,54	12,1 \pm 1,30	2,9 \pm 0,5	3,6 \pm 0,9
CXCR4+CD45- (%)	0,48 \pm 0,15	0,66 \pm 0,04	4,27 \pm 0,23	3,28 \pm 0,89

6.3.2. Resultados y discusión

Como se muestra en la Tabla 2 y en las FIG. 8-12, el número de células totales de MNC cultivadas con DMSO, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona era menor que en el grupo de control ("Ninguno", citocinas solo). Esto puede ser el resultado de los efectos del DMSO. Los cultivos celulares que se cultivaron con MID 1 exhibían un mayor porcentaje de células CD34+ que todos los demás grupos, mientras que los números totales de células CD34+ eran similares en todos los grupos. Los números de células CD34+CD38- eran significativamente mayores en células tratadas con IMJD1 y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, lo que es consistente con los resultados de tratar células CD34+ purificadas con los compuestos. Está bien aceptado que las células CD34+CD38- son células progenitoras hematopoyéticas menos diferenciadas que injertan y proliferan después del trasplante con mayor eficacia que las células CD34+CD38+ (Dao *et al.* 1998, *Blood* 91 (4): 1243-55; Huang *et al.*, 1994, *Blood* 83(6): 1515-26).

El DMSO parece estimular la expresión de CXCR4 en MNC de sangre de cordón. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona inhibían significativamente la expresión de CXCR4 en células CD45+ en comparación con ambos grupos de control.

Una mayoría de células CXCR4+ en los cultivos de células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona eran negativas de CD45. Esta población celular era significativamente mayor en las células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona.

Los resultados indican que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona son útiles en el acondicionamiento de citoblastos para contrarrestar los efectos dañinos de la criopreservación, descongelamiento y/o exposición a criopreservantes sobre los citoblastos. Los resultados indican además que la supresión por DMSO de la producción de células CD34+ y CD14+ puede contrarrestarse tratando con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, lo que potencia esa capacidad proliferativa de las células CD34+ y CD14+.

6.4. EJEMPLO 4. Efectos de talidomida, 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona sobre la producción de monocitos

6.4.1. Materiales y métodos

5 Se cultivaron células CD34+ de sangre de cordón humana purificada (más de 90 % de CD34+) en medio de FCS al 20 %-IMDM suplementado con citocinas (IL3, IL6, G-CSF, KL y Epo) a 4×10^4 células/ml durante 14 días a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂. Los grupos experimentales consistían en un grupo en que (i) no se añadieron DMSO ni compuestos químicos ("Ninguno"), (ii) DMSO solo, (iii) talidomida disuelta en DMSO, (iv) 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona disuelta en DMSO y (v) 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona disuelta en DMSO. Se recolectaron alícuotas de células y se tiñeron con anticuerpo monoclonal conjugado con CD34-PE y anticuerpo monoclonal conjugado con CD14-FITC.

6.4.2. Resultados y discusión

15 Los resultados mostraron que en el grupo "Ninguno", solo un 0,95 % de las células totales eran CD34+. En el grupo tratado con DMSO, solo un 0,17 % de las células eran CD34+, sugiriendo que el DMSO tiene un efecto negativo sobre la expansión y conservación de CD34+. En el grupo tratado con talidomida, un 0,24 % de las células eran CD34+, que no es significativamente diferente de las células tratadas con DMSO. En los grupos tratados con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona, sin embargo, había un porcentaje significativamente mayor de células CD34+ (18,7 % y 7,1 %, respectivamente). (Véanse también los resultados experimentales resumidos en la FIG. 13 y la leyenda de la figura acompañante).

20 CD14 es un marcador para monocitos. En el grupo "Ninguno", un 11,5 % de las células eran CD14+, mientras que en el grupo tratado con DMSO, un 3,7 % eran CD14+, indicando que disminuía la producción de monocitos. Como era el caso para la expresión de CD34 anterior, los resultados del grupo tratado con talidomida y el grupo tratado con DMSO eran similares. Puesto que los grupos tratados con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona se expusieron a DMSO también, puede deducirse que la producción de monocitos que se inhibe por DMSO se supera por el tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona.

6.5. EJEMPLO 5: Efectos del pretratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona sobre células nucleadas trasplantadas de sangre de cordón umbilical y placenta

30 Este experimento demuestra que el pretratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona aumenta la supervivencia de células nucleadas placentarias (PLNC) trasplantadas, células nucleadas de sangre de cordón umbilical (UCBNC) y células de médula ósea (BMNC).

6.5.1. Materiales y métodos

Se obtuvieron células nucleadas placentarias (PLNC), células nucleadas de sangre de cordón umbilical (UCBNC) y células de médula ósea (BMNC) de donantes humanos. Se obtuvieron las PLNC y UCBNC de placenta y cordón umbilical usando métodos descritos en la sección 5.4 anterior.

35 Se pretrataron las células por incubación en DMEM suplementado con suero CB humano al 2 % con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona 10 g/ml durante 24 horas. Se lavaron entonces las células, se resuspendieron en plasma autólogo y se administraron por vía intravenosa a ratones SJL/L adultos receptores (Jackson Laboratories) que tenían ablación de médula ósea producida por una irradiación mortal (900 cGy) según métodos estándares. Dicha irradiación es más de un 90 % mortal a los 50 días después de la irradiación (Ende *et al.*, 2001, *Life Sciences* 69(13): 1531-1539; Chen y Ende, 2000, *J. Med.* 31: 21-30; Ende *et al.*, 2000, *Life Sci.* 67(1): 53-9; Ende y Chen, 2000, *Am. J. Clin. Pathol.* 114: 89).

6.5.2. Resultados y discusión

45 Se muestran en la Tabla 3 siguiente los efectos del pretratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona sobre PLNC, UCBNC y BMNC trasplantadas. Como puede verse en la Tabla 3, el pretratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona aumenta la supervivencia de células nucleadas placentarias (PLNC), células nucleadas de sangre de cordón umbilical (UCBNC) y células de médula ósea (BMNC) trasplantadas.

Tabla 3

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales irradiados	Nº de animales muertos a los 50 días	% del peso corporal inicial a los 50 días
1	PLNC 5×10^6 intravenoso	3	1	84
2	PLNC 50×10^6 intravenoso	3	0	89
3	PLNC 5×10^6 + pretratamiento intravenoso con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	4	0	102
4	UCBNC 100×10^6 intravenoso	3	0	81
5	UCBNC 10×10^6 + pretratamiento intravenoso con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	3	0	84
6	UCBNC 10×10^6 intravenoso		1	78
7	BMNC $0,5 \times 10^6$	3	3	79
8	BMNC 5×10^6	3	3	74
9	BMNC 50×10^6	3	2	83
10	Control	12	11	N/A

Abreviaturas:

PLNC: células nucleadas placentarias

UCBNC: células nucleadas de sangre de cordón umbilical

5 BMNC: células de médula ósea

N/A: no aplicable

6.6. Modulación de la diferenciación de células progenitoras CD34+

6.6.1. Materiales y métodos

10 Se obtuvieron células progenitoras CD34⁺ de médula ósea y sangre de cordón en Clonetics y se cultivaron en MDM de Iscove con BIT 95000 (StemCell Technologies) en presencia de SCF, Flt-3L, GM-CSF y TNF- α durante 6 días, y después en presencia de GM-CSF y TNF- α durante 6 días adicionales.

15 Análisis del fenotipo de superficie celular: Se procesaron las células para tinción doble (30 min a 4 °C) el día 6 y el día 12 usando AcM conjugados con FITC y PE. Los anticuerpos usados eran de BD Pharmingen: CD34 (PE), CD38 (FITC), CD33 (FITC), CD1a (FITC), CD86(PE), CD14(PE), CD83 (PE), CD54 (PE), CD11b (PE), CD11c (PE), HLA-DR (PE), CD15 (FITC) y CD133 (PE) de Miltenyi. Se efectuó el análisis de fluorescencia en un citómetro de flujo FACScan después de la adquisición de 10.000 eventos (Coulter). Los resultados presentados son representativos de cuatro experimentos independientes.

20 Detección de la apoptosis: Se determinó la exposición a fosfatidilserina usando tinción con anexina V-FITC en combinación con yoduro de propidio (kit I de detección de la apoptosis de BD Pharmingen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Fagocitosis: Se analizó la actividad endocítica de las células midiendo la captación de FITC-dextrano. Se incubaron las células con dextrano-FITC 1 mg/ml (Sigma) en medio completo a 37 °C durante 1 hora y a 4 °C durante 1 hora como control negativo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

25 Ensayo de proliferación de linfocitos T: Después de 13 días de cultivo, se recogieron células DC derivadas de CD34⁺ y, después de tratamiento con mitomicina C (50 μ g/ml, Sigma), se usaron como células estimuladoras para linfocitos T CD3⁺ adultos alogénicos purificados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios sanos. Los linfocitos T sensibles CD3⁺ se usaron a una concentración de 5×10^4 células/pocillo. Se añadieron células

estimuladoras en dosis graduadas a los linfocitos T en placas de cultivo de tejido de fondo transparente negras de fondo plano de 96 pocillos para detección de quimioluminiscencia. Se efectuaron los cultivos en medio RPMI 1640 suplementado con FBS termoinactivado al 10 %, glutamina y penicilina-estreptomina. Después de 6 días de cultivo, se midió la proliferación celular con el ensayo de quimioluminiscencia BrdU (Roche, Nutley N.J.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se presentan como media \pm DE obtenidos de cultivos por triplicado.

6.6.2. Resultados y discusión

Se encontró que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona altera significativamente el desarrollo de DC a partir de progenitores CD34⁺. Para estudiar el efecto de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona sobre la generación de DC, se cultivaron células progenitoras CD34⁺ con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona (1 μ M) durante un periodo de 12 días durante la fase de expansión y maduración (día 1 a día 12) o un periodo de 6 días durante la fase de maduración (día 6 a día 12) (FIG. 14). La adición de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona del día 1 al día 12 inhibía la adquisición del fenotipo de DC (FIG. 15) y, lo más importante, aumentaba la población de células CD34⁺CD38⁻, alterando la diferenciación normal de células CD34⁺CD38⁻ en células CD34⁺CD38⁺ (FIG. 16). Sin embargo, las células CD34⁺ tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona adquirían el marcador mielóide CD33, y estas células presentaban un fenotipo CD34⁺CD38⁻CD33⁺ el día 6. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona prevenía casi completamente la generación de células CD1a⁺ para el día 6, y particularmente la generación de células dobles positivas CD86⁺CD1a⁺. Esta población doble positiva se cree que es la precursora de DC de Langerhans epidérmicas. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona disminuía también la generación de células CD14⁺CD1a⁻ que pueden dar lugar tanto a DC dérmicas como a monocitos/macrófagos. El aumento en la población de progenitores tempranos (células CD34⁺CD38⁻) y el bloqueo de los progenitores de DC mieloides (células CD1a⁺CD14⁻ y CD1a⁻CD14⁺) eran dependientes de la dosis y alcanzaban el máximo a 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona 1 μ M (FIG. 17). Este efecto era reversible y se observaba interferencia con la ruta de diferenciación de CD34 solo si los progenitores CD34⁺ se cultivaban durante al menos 3 días con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona (FIG. 18).

Dosis múltiples de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona entre los días 0 y 6 intensificaban el aumento de la población de CD34⁺ (FIG. 19A).

Las células progenitoras CD34⁺ cultivadas en presencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona exhibían también el día 12 una expresión disminuida de moléculas coestimulantes (CD86, CD80) (FIG. 20). La molécula de adhesión CD54 estaba alterada, con la expresión disminuida de las poblaciones de CD54^{bright} y la expresión aumentada de las de CD54^{dim} (FIG. 21). Se redujo la expresión de moléculas HLA-DR en progenitores CD34⁺ tratados con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona.

Cuando se añadió 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona el día 6, después de cultivo durante los días 0-6 sin tratamiento, y cuando la población de CD1a⁺ se había generado ya, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona aumentaba la persistencia de la población de CD1a⁺ (Tabla 1). El cultivo tratado con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona contenía relativamente más precursores de CD1a⁺ el día 12 que el control de DMSO. La adición de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona a células CD34⁺ diferenciadas el día 6 disminuía también considerablemente la generación de precursores de CD14⁺ y la expresión de moléculas coestimulantes (CD86, CD80).

Tabla 1. Caracterización fenotípica el día 12 de DC generadas a partir de células progenitoras CD34⁺ en presencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona del día 6 al día 12

Día 12	DMSO del día 6 al día 12	4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona del día 6 al día 12
CD1a+	8,5 %	11,5 %
CD14+	19,0 %	8,0 %
CD86+	28,8 %	18,5 %
CD80+	19,6 %	13,8 %

La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona promueve la diferenciación granulocítica: para determinar si el bloqueo de la generación de DC estaba asociado a un cambio a una ruta de diferenciación mielóide diferente, se monitorizó la expresión del marcador granulocítico CD15. La expresión de la molécula de superficie CD15 aumentaba en células progenitoras CD34⁺ cultivadas en presencia de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona (FIG. 22). En presencia de un cóctel de citocinas que impulsa la diferenciación a DC, la adición de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona desviaba la expansión/maduración de las células progenitoras a

un fenotipo de tipo más granulocítico. Se estudió también el sesgo en la diferenciación mieloide monitorizando la expresión de 2 marcadores: CD11c, expresado por progenitores de DC mieloides de células de Langerhans y DC intersticiales, y CD15 expresado por progenitores granulocíticos. La disminución en la población de CD11c⁺CD15⁻ estaba asociada a un aumento simultáneo de la población granulocítica CD11c⁻CD15⁺ (FIG. 19B). De forma interesante, dosis múltiples de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) potenciaban el desplazamiento hacia el linaje granulocítico.

El bloqueo en la generación de DC no está mediado por una destrucción específica de los progenitores de DC: para determinar si la disminución de los progenitores de DC estaba mediada por una destrucción específica, se cultivaron células progenitoras CD34⁺ durante un periodo de 6 días en presencia de SCF, Flt-3L, GM-CSF y TNF- α . El día 6, se aislaron células CD1a⁺CD14⁻ y CD1a⁻CD14⁺ (progenitoras de DC) mediante clasificación celular magnética (Miltenyi). Se cultivaron las poblaciones purificadas durante 2 días adicionales en presencia de GM-CSF y TNF- α con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) (1 μ M). No había un aumento significativo del nivel de poblaciones de anexina V⁺-PI⁻ (apoptosis temprana) y anexina V⁺-PI⁺ (apoptosis tardía) tras el tratamiento con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) (FIG. 23).

La actividad funcional de DC generadas a partir de progenitores CD34⁺ se altera: se ensayó la capacidad fagocítica de células derivadas de células progenitoras CD34⁺ cultivadas con citocinas con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) mediante endocitosis mediada por receptor de manosa de dextrano-FITC el día 12. Cuando se añadía 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) del día 1 al día 12, había una fuerte disminución de la capacidad fagocítica en comparación con el control de DMSO (FIG. 24). Cuando se añadía 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) del día 6 al día 12, la capacidad fagocítica era comparable con la de las células de control de DMSO (FIG. 25).

Se evaluó la capacidad de presentación de antígeno (APC) de células CD34⁺ cultivadas con citocina con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) midiendo su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T alogénicos CD3⁺ en un ensayo de reacción leucocitaria mixta (MLR) el día 12. Cuando se añadía 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) del día 1 al día 12, las células CD34⁺ mostraban una capacidad reducida de estimular la proliferación de linfocitos T en comparación con el control de DMSO (FIG. 26). En contraposición, cuando se añadía 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) del día al día 12, la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T era comparable a la de células de control de DMSO (FIG. 27). La ruta de diferenciación normal seguida por las células CD34⁺ se representa en la FIG. 28.

Estos resultados indican que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) atenúa drásticamente la diferenciación de células progenitoras CD34⁺ en células dendríticas. Como consecuencia, las células tratadas con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) presentaban una baja capacidad fagocítica y una capacidad de APC reducida. De forma más importante, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) aumentaba los progenitores hematopoyéticos tempranos, las células CD34⁺CD38⁻. Se ha mostrado que estos progenitores hematopoyéticos tempranos dan un mejor injerto y repoblación en el modelo de ratón NOD-SCID (Tamaki *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 69(6): 976-86 (2002)). Además, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) sesgaba la diferenciación de células CD34⁺ al cambiar la diferenciación mieloide hacia el linaje granulocítico, incluso cuando la presión de citocinas está a favor de la diferenciación de células dendríticas. Además, se encontró que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) no tiene efectos tóxicos sobre las células CD34⁺ y no perjudica la capacidad de las células de proliferar. Esta modulación de la función de DC y la promoción de la diferenciación granulocítica puede tener una utilidad terapéutica significativa para el tratamiento de diversos cánceres, trastornos inmunológicos y enfermedades infecciosas, y en trasplantes de órgano y medicina regenerativa.

Véase la FIG. 29 para un resumen gráfico de lo anterior.

6.7. La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) modula la diferenciación de células progenitoras CD133⁺

Las múltiples dosis de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona), además de intensificar el aumento de la población de CD34⁺, aumentan también la expresión de CD133, que se expresa habitualmente por células progenitoras hematopoyéticas CD34^{bright} y algunas subpoblaciones de CD34⁻ primitivas (FIG. 19A, 19B). La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona), al enriquecer en células hematopoyéticas CD34⁺CD133⁺ primitivas, debería tener implicación clínica para la recuperación hematopoyética después del trasplante de citoblastos. Además, los citoblastos CD133⁺ pueden dar lugar también al linaje endotelial y contribuyen en términos de la curación de heridas. Las múltiples dosis de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona) no exacerbaban el bloqueo de la generación de precursores de DC de Langerhans.

6.8. Generación de células dendríticas de mürido a partir de células progenitoras hematopoyéticas Sca⁺ de médula ósea (BM)

6.8.1. Materiales y métodos

Se obtuvo médula ósea de ratón de ratones C57BL/6 endogénicos en Clonetics. Se enriquecieron los progenitores

Sca+Lin⁻ usando el cóctel de enriquecimiento de progenitores de múdo SpinSep (StemCell Technologies) y se cultivaron en MDM de Iscove con BIT 95000 (StemCell Technologies) en presencia de los factores de crecimiento de múdo SCF, Flt3L, GM-CSF y M-CSF durante 9 días para promover la expansión de células Sca⁺ y un fenotipo precursor de DC, y entonces en presencia de GM-CSF y TNF- α durante 3 días adicionales para impulsar a las células a un fenotipo de DC inmaduro. Véase la FIG. 30. Se cultivaron las células Sca+Lin⁻ enriquecidas en presencia de DMSO (al 0,1 %), 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona 10 μ M o ácido todo-trans-retinoico (ATRA) (ICN Biomedicals) 10 μ M desde el día 0. Se añadieron los compuestos a las células el día 0 y el día 9.

Análisis del fenotipo de superficie celular de múdo: se procesaron las células de múdo para doble tinción (14 min a TA) el día 9 y el día 12, usando AcM conjugados con FITC y PE. Los anticuerpos usados eran de BD Pharmingen: Sca (PE), CD11b (FITC), Gr-1 (FITC), CD86 (PE), CD14 (PE), CD80 (PE), I-A^b (PE), CD40 (PE) y CD32.1/16.1 (FITC) de Miltenyi. Se efectuó el análisis de fluorescencia en un citómetro de flujo FACScan (Coulter) después de la adquisición de 10.000 eventos.

6.8.2. Resultados y discusión

Se encontró que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona altera el desarrollo de DC de múdo a partir de progenitores Sca⁺. El día 9, las células presentaban un fenotipo precursor de DC con alta expresión en superficie de los marcadores dendríticos/mieloides CD32/16 (receptores de Fc), CD11b, CD80, baja expresión de I-A^b y CD86 y falta de expresión de los marcadores de linaje como CD14 y Gr-1 (FIG. 31). La 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona no mostraba un efecto significativo sobre la expresión de marcadores de superficie celular para el día 9, mientras que el ATRA mostraba una regulación negativa notable de la expresión de CD80, I-A^b y Sca⁺ (datos no mostrados). Sin embargo, para el día 12, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona mostraba regulación negativa de CD86 y expresión brillante de I-A^b y regulación positiva de la expresión de CD11b (FIG. 32). El ATRA mostraba efectos similares pero más pronunciados que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona. Además, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona no mostraba efectos sobre la expresión de CD40 y CD80, mientras que el ATRA mostraba una regulación negativa marcada de estas moléculas (no mostrado).

Estos resultados sugieren que la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona inhibe la diferenciación de precursores de DC en DC inmaduras mediante la regulación negativa de la expresión de CD86 y MHC II. Los efectos del compuesto no son tan drásticos como aquellos observados en progenitores hematopoyéticos humanos, y esto en paralelo a la baja actividad de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona en ratón *in vitro* e *in vivo* en otros modelos. El efecto de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona es mucho menos pronunciado que el del ATRA, que es un teratógeno en ratones.

6.9. Aplicación del ensayo de diferenciación a compuestos distintos de IMID

La metodología descrita anteriormente, concretamente el examen del efecto de los IMID tales como 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona sobre la diferenciación de células progenitoras tempranas tales como células CD34⁺, puede aplicarse a cualquier compuesto de interés cuyo efecto sobre la diferenciación se desee conocer. Como ejemplo de la extensión de este método de ensayo a otros compuestos, se comparó el efecto de ácido retinoico (ATRA) y aspirina con el de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona sobre la diferenciación de células CD34⁺ hacia el linaje de DC frente a las células de control (tratadas con DMSO). Se estudió el ácido retinoico debido a su efecto conocido sobre la proliferación y diferenciación celulares, su uso terapéutico en algunos cánceres y su efecto teratógeno conocido. A la inversa, se estudió el efecto de la aspirina porque es un fármaco antiinflamatorio usado comúnmente sin propiedades inmunomoduladoras. Se presentan a continuación en la Tabla 2 los resultados del día 6 de células progenitoras CD34⁺ cultivadas en presencia de SCF, Flt-3L, GM-CSF y TNF- α , con o sin compuesto durante un periodo de 6 días (la flecha ascendente indica un aumento de la población celular; la flecha descendente indica una disminución).

Tabla 2. Comparación del efecto de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, ácido retinoico y aspirina sobre la diferenciación de células progenitoras CD34⁺

Población celular	4-(Amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona	RA todo trans	Aspirina
CD34 ⁺ CD38 ⁻	↑	↓	Sin cambios
CD34 ⁻ CD38 ⁺	↓	↑	Sin cambios
CD1a ⁺ CD14 ⁻	↓	↓	Sin cambios
CD1a ⁻ CD14 ⁺	↓	↓	Sin cambios

CD15⁺

↑

↑

Sin cambios

En la bibliografía, se ha mostrado que otros fármacos modulan la diferenciación celular, por ejemplo, un artículo reciente reseña la modulación por corticosteroides de la generación de DC a partir de células progenitoras CD34⁺. El perfil difiere de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, con un aumento de la población de CD1a⁺ y una disminución de la población de CD14⁺.

5 6.10. EJEMPLO 10: Inducción de la diferenciación en tipos celulares particulares

Se inducen células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en un tipo celular particular mediante exposición a un factor de crecimiento. Los factores de crecimiento que se usan para inducir la inducción incluyen, pero sin limitación: GM-CSF, IL-4, Flt3L, CD40L, IFN-alfa, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-2, IL-6, ácido retinoico, factor de crecimiento de fibroblastos básico, TGF-beta-1, TGF-beta-3, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento epidérmico, cardiotropina-1, angiotensinógeno, angiotensina I (AI), angiotensina II (AII), agonistas de receptor de tipo 2 de AII AT₂ o análogos o fragmentos de los mismos.

6.10.1. Inducción de la diferenciación en neuronas

Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en neuronas. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación neuronal:

- 15 1. Se hacen crecer citoblastos placentarios durante 24 h en medio de preinducción consistente en DMEM/FBS al 20 % y beta-mercaptoetanol 1 mM.
2. Se retira el medio de preinducción y se lavan las células con PBS.
3. Se añade medio de inducción neuronal consistente en DMEM y beta-mercaptoetanol 1-10 mM. Como alternativa, puede usarse medio de inducción consistente en DMEM/DMSO al 2 %/hidroxianisol butilado 200 µM para potenciar la eficacia de la diferenciación neuronal.
- 20 4. En ciertas realizaciones, pueden aparecer cambios morfológicos y moleculares tan pronto como 60 minutos después de la exposición a medio exento de suero y beta-mercaptoetanol (Woodbury *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 61: 364-370). Puede usarse RT/PCR para valorar la expresión, p.ej., de genes de receptor de factor de crecimiento nervioso y de cadena pesada de neurofilamentos.

25 6.10.2. Inducción de la diferenciación en adipocitos

Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en adipocitos. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación adipogénica.

1. Se hacen crecer citoblastos en MSCGM (Bio Whittaker) o DMEM suplementado con suero de sangre de cordón al 15 %.
- 30 2. Se usan tres ciclos de inducción/mantenimiento. Cada ciclo consiste en alimentar los citoblastos placentarios con medio de inducción de la adipogénesis (Bio Whittaker) y cultivar las células durante 3 días (a 37 °C, 5 % de CO₂), seguido de 1-3 días de cultivo en medio de mantenimiento de la adipogénesis (Bio Whittaker). Se usa un medio de inducción que contiene dexametasona 1 µM, indometacina 0,2 mM, insulina 0,01 mg/ml, IBMX 0,5 mM, DMEM rico en glucosa, FBS y antibióticos.
- 35 3. Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, se cultivan las células durante 7 días adicionales en medio de mantenimiento de la adipogénesis, reemplazando el medio cada 2-3 días.
4. La adipogénesis puede valorarse mediante el desarrollo de múltiples vesículas lipídicas intracitoplasmáticas que pueden observarse fácilmente usando el tinte lipófilo aceite rojo O. Se emplean ensayos de RT/PCR para examinar la expresión de genes de lipasa y proteína de unión a ácido graso.

40 6.10.3. Inducción de la diferenciación en condrocitos

Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en condrocitos. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación condrogénica:

1. Se mantienen citoblastos placentarios en MSCGM (Bio Whittaker) o DMEM suplementado con suero de sangre de cordón al 15 %.
- 45 2. Se toman alícuotas de citoblastos placentarios en un tubo de polipropileno estéril. Se centrifugan las células (150xg durante 5 minutos) y se lavan dos veces en medio de condrogénesis incompleto (Bio Whittaker).
3. Después del último lavado, se resuspenden las células en medio de condrogénesis completo (Bio Whittaker) que contiene TGF-beta-3 0,01 µg/ml a una concentración de 5×10⁵ células/ml.

4. Se toman alícuotas de 0,5 ml de células en un tubo de cultivo de polipropileno de 15 ml. Se sedimentan las células a 150xg durante 5 minutos. Se deja intacto el sedimento en el medio.

5. Se incuban tubos tapados sin apretar a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas.

5 6. Se alimentan los sedimentos celulares cada 2-3 días con medio de condrogénesis completo recién preparado.

7. Se mantienen los sedimentos suspendidos en el medio mediante agitación diaria usando un vórtex de baja velocidad.

8. Se recolectan los sedimentos de células condrogénicas después de 14-28 días de cultivo.

10 9. La condrogénesis puede caracterizarse, p.ej., mediante la observación de la producción de matriz eosinófila, valoración de la morfología celular y/o RT/PCR para examen de la expresión génica de colágeno 2 y colágeno 9.

6.10.4. Inducción de la diferenciación en osteocitos

Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en osteocitos. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación osteogénica:

15 1. Se cultivan cultivos adherentes de citoblastos placentarios en MSCGM (Bio Whittaker) o DMEM suplementado con suero de sangre de cordón al 15 %.

2. Se dejan reposar los cultivos durante 24 horas en matraces de cultivo de tejido.

3. Se induce la diferenciación osteogénica reemplazando el MSCGM por medio de inducción osteogénico (Bio Whittaker) que contiene dexametasona 0,1 µM, 2-fosfato de ácido ascórbico 0,05 mM y beta-glicerofosfato 10 mM.

20 4. Se alimentan las células cada 3-4 días durante 2-3 semanas con medio de inducción osteogénico.

5. Se ensaya la diferenciación usando un tinte específico de calcio y RT/PCR para la expresión génica de fosfatasa alcalina y osteopontina.

6.10.5. Inducción de la diferenciación en hepatocitos

25 Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en hepatocitos. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación hepatogénica:

1. Se cultivan citoblastos placentarios en DMEM/CBS al 20 % suplementado con factor de crecimiento de hepatocitos 20 ng/ml y factor de crecimiento epidérmico 100 ng/ml. Puede usarse sustituto de suero KnockOut en lugar de FBS.

2. Se añade IL-6 50 ng/ml a los matraces de inducción.

30 6.10.6. Inducción de la diferenciación en células pancreáticas

Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en células pancreáticas. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación pancreática:

35 1. Se cultivan citoblastos placentarios en DMEM/CBS al 20 % suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico 10 ng/ml y factor transformante beta 1 2 ng/ml. Puede usarse sustituto de suero KnockOut en lugar de CBS.

2. Se añade medio acondicionado de cultivos de células neuronales positivas de nestina al medio a una concentración 50/50.

3. Se cultivan las células durante 14-28 días, realimentando cada 3-4 días.

40 4. Se caracteriza la diferenciación ensayando la proteína insulina o la expresión génica de insulina por RT/PCR.

6.10.7. Inducción de la diferenciación en células cardiacas

Este ejemplo describe la inducción de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario a diferenciar en células cardiacas. Se emplea el siguiente protocolo para inducir la diferenciación miogénica:

45 1. Se cultivan citoblastos placentarios en DMEM/CBS al 20 % suplementado con ácido retinoico 1 µM, factor de crecimiento de fibroblastos básico 10 ng/ml, factor de crecimiento transformante beta-1 2 ng/ml y factor de

crecimiento epidérmico 100 ng/ml. Puede usarse sustituto de suero KnockOut en lugar de CBS.

2. Como alternativa, se cultivan citoblastos placentarios en DMEM/CBS al 20 % suplementado con cardiotropina-1 50 ng/ml durante 24 horas.

5 3. Como alternativa, se mantienen los citoblastos placentarios en medio exento de proteína durante 5-7 días, se estimulan entonces con extracto de miocardio humano (análisis de dosis crecientes). Se produce extracto de miocardio homogeneizando 1 g de miocardio humano en tampón HEPES al 1 % suplementado con suero de sangre de cordón al 1 %. Se incuba la suspensión durante 60 minutos, se centrifuga entonces y se recoge el sobrenadante.

4. Se cultivan las células durante 10-14 días, realimentando cada 3-4 días.

5. Se valora la diferenciación usando ensayos de expresión génica RT/PCR de actina cardiaca.

10 **6.10.8. Caracterización de células de sangre de cordón y/o citoblastos de tipo embrionario antes y/o después de la diferenciación**

15 Los citoblastos de tipo embrionario, las células de sangre de cordón y/o las poblaciones de células de sangre de cordón adicionadas con citoblastos de tipo embrionario se caracterizan antes y/o después de la diferenciación midiendo los cambios de morfología y marcadores de superficie celular usando técnicas tales como citometría de flujo e inmunohistoquímica, y midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas tales como PCR. Las células que se han expuesto a factores de crecimiento y/o que se han diferenciado se caracterizan por la presencia o ausencia de los siguientes marcadores de superficie celular: CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+. Preferiblemente, los citoblastos de tipo embrionario se caracterizan, antes de la diferenciación, por la presencia de los marcadores de superficie celular OCT-4+, APC-p+, CD34- y CD38-. Los citoblastos portadores de estos marcadores son tan versátiles (p.ej., pluripotentes) como los citoblastos embrionarios humanos. Las células de sangre de cordón se caracterizan, antes de la diferenciación, por la presencia de los marcadores de superficie celular CD34+ y CD38+. Las células diferenciadas derivadas de citoblastos de tipo embrionario, células de sangre de cordón y/o poblaciones de células de sangre de cordón adicionadas con citoblastos de tipo embrionario preferiblemente no expresan estos marcadores.

20

25

La presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. Es más, resultarán evidentes diversas modificaciones de la invención además de aquellas descritas en la presente memoria para los especialistas en la materia a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones se pretende que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 **7. BIBLIOGRAFÍA**

La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debería considerarse como la admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder dicha publicación en virtud de la invención anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un método para suprimir la generación de BFU-E y CFU-E mientras se acrecienta la generación de CFU-GM y se potencia la producción de CFU-Total, comprendiendo dicho método:
 - 5 poner en contacto los citoblastos o células progenitoras de mamífero *in vitro* con 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona o 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona en condiciones en que dichos citoblastos o células progenitoras se diferencien; y

en el que los citoblastos o células progenitoras de mamífero son CD34⁺ o CD133⁺.
 2. El método de la reivindicación 1, en el que dichos citoblastos o células progenitoras se diferencian en células hematopoyéticas después de dicho contacto.
 - 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que dichos citoblastos son citoblastos placentarios, citoblastos de sangre de cordón, citoblastos de sangre periférica o citoblastos de médula ósea.
 4. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de dicho compuesto es de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.
 - 15 5. El método de la reivindicación 1, en el que los citoblastos o células progenitoras son citoblastos o células progenitoras humanos.
 6. El método de la reivindicación 1, en el que dichos citoblastos o células progenitoras son células CD34⁺.
 7. El método de la reivindicación 6, en el que dichas células se diferencian en células CD38⁺CD33⁺ como resultado de dicho contacto o en el que dichas células se diferencian como resultado de dicho contacto en células que exhiben:
 - 20 una expresión de CD11c reducida respecto a un control;
 - una expresión de CD38 reducida respecto a un control;
 - una expresión de CD80 reducida respecto a un control;
 - una expresión de CD86 reducida respecto a un control;
 - una expresión de CD1a aumentada respecto a un control;
 - 25 una expresión de CD14 reducida respecto a un control;
 - una expresión de HLA-DR reducida respecto a un control;
 - una expresión de CD15 aumentada respecto a un control;
 - una expresión de CD33 aumentada respecto a un control;
 - una expresión de CD54 aumentada respecto a un control;
 - 30 una expresión de CD133 aumentada respecto a un control;
 - o una combinación de cualquiera de las características marcadoras anteriores;
 - en el que dicho control son células CD34⁺ cultivadas en las mismas condiciones que dichas células en ausencia de dicho compuesto.
 8. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células CD34⁺ o CD133⁺ se han crioconservado y
 - 35 descongelado antes de dicha diferenciación.
 9. Un compuesto seleccionado de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)piperidin-2,6-diona para uso en un método de tratamiento de un individuo necesitado de granulocitos, en el que dicho método comprende poner en contacto *in vitro* citoblastos o células progenitoras de mamífero CD34⁺ o CD133⁺ con dicho compuesto en condiciones en que dichas células se diferencien para suprimir
 - 40 la generación de BFU-E y CFU-E, mientras se acrecienta la generación de CFU-GM y la potenciación de la producción de CFU-Total, seguido de trasplante directo de las células diferenciadas a dicho individuo.
 10. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que dicho individuo tiene infección, enfermedad granulomatosa crónica, alergia o neutropenia.
 11. El compuesto para uso de la reivindicación 10, en el que dicha infección es infección asociada a

neutropenia, sepsis neonatal bacteriana o infección en un paciente que recibe trasplante de médula ósea.

12. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que dichos citoblastos o células progenitoras se diferencian en células hematopoyéticas después de dicho contacto.
- 5 13. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que dichos citoblastos son citoblastos placentarios, citoblastos de sangre de cordón, citoblastos de sangre periférica o citoblastos de médula ósea.
14. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que el compuesto se prepara para usar a una concentración de aproximadamente 0,005 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.
15. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que los citoblastos o células progenitoras son citoblastos o células progenitoras humanos.
- 10 16. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que dichos citoblastos o células progenitoras son células CD34⁺.
17. El compuesto para uso de la reivindicación 16, en el que dichas células se diferencian en células CD38⁻ CD33⁺ como resultado de dicho contacto o en el que dichas células se diferencian como resultado de dicho contacto en células que exhiben:
- 15 una expresión de CD11c reducida respecto a un control;
una expresión de CD38 reducida respecto a un control;
una expresión de CD80 reducida respecto a un control;
una expresión de CD86 reducida respecto a un control;
una expresión de CD1a aumentada respecto a un control;
- 20 una expresión de CD14 reducida respecto a un control;
una expresión de HLA-DR reducida respecto a un control;
una expresión de CD15 aumentada respecto a un control;
una expresión de CD33 aumentada respecto a un control;
una expresión de CD54 aumentada respecto a un control;
- 25 una expresión de CD133 aumentada respecto a un control;
o una combinación de cualquiera de las características marcadoras anteriores;
en el que dicho control son células CD34⁺ cultivadas en las mismas condiciones que dichas células en ausencia de dicho compuesto.
- 30 18. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en el que dichas células CD34⁺ o CD133⁺ se han crioconservado y descongelado antes de dicha diferenciación.

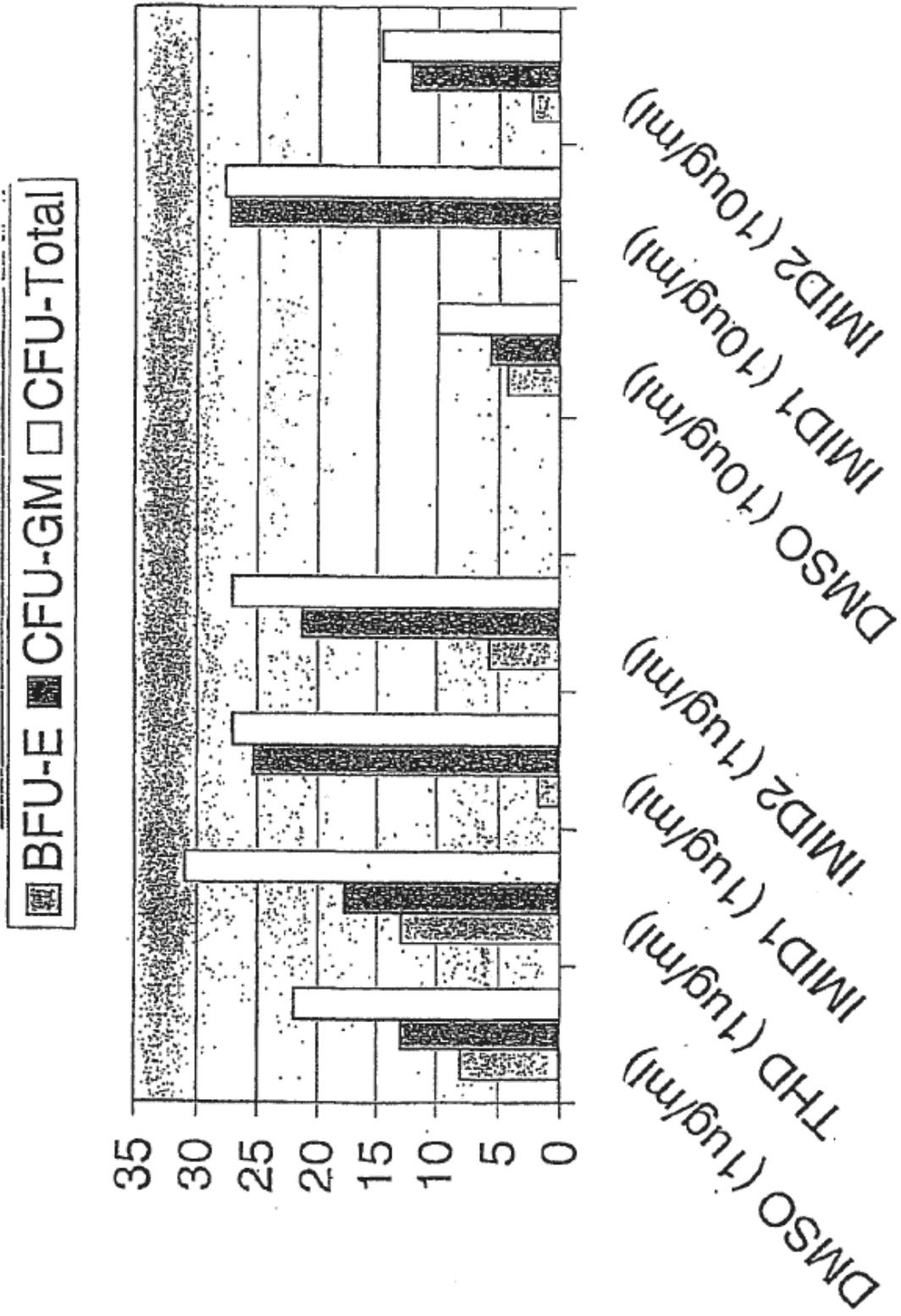


FIG. 1

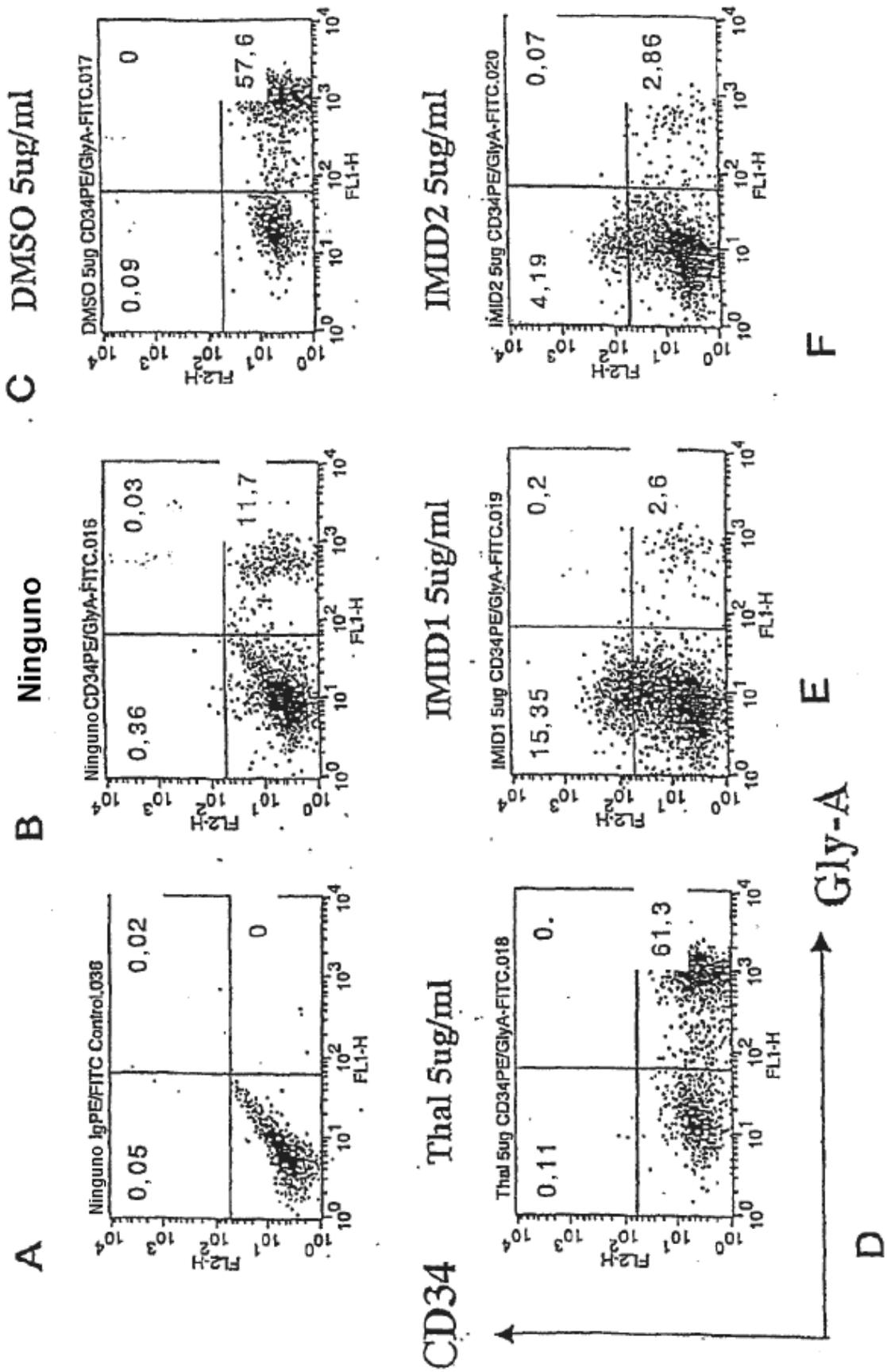


FIG. 2

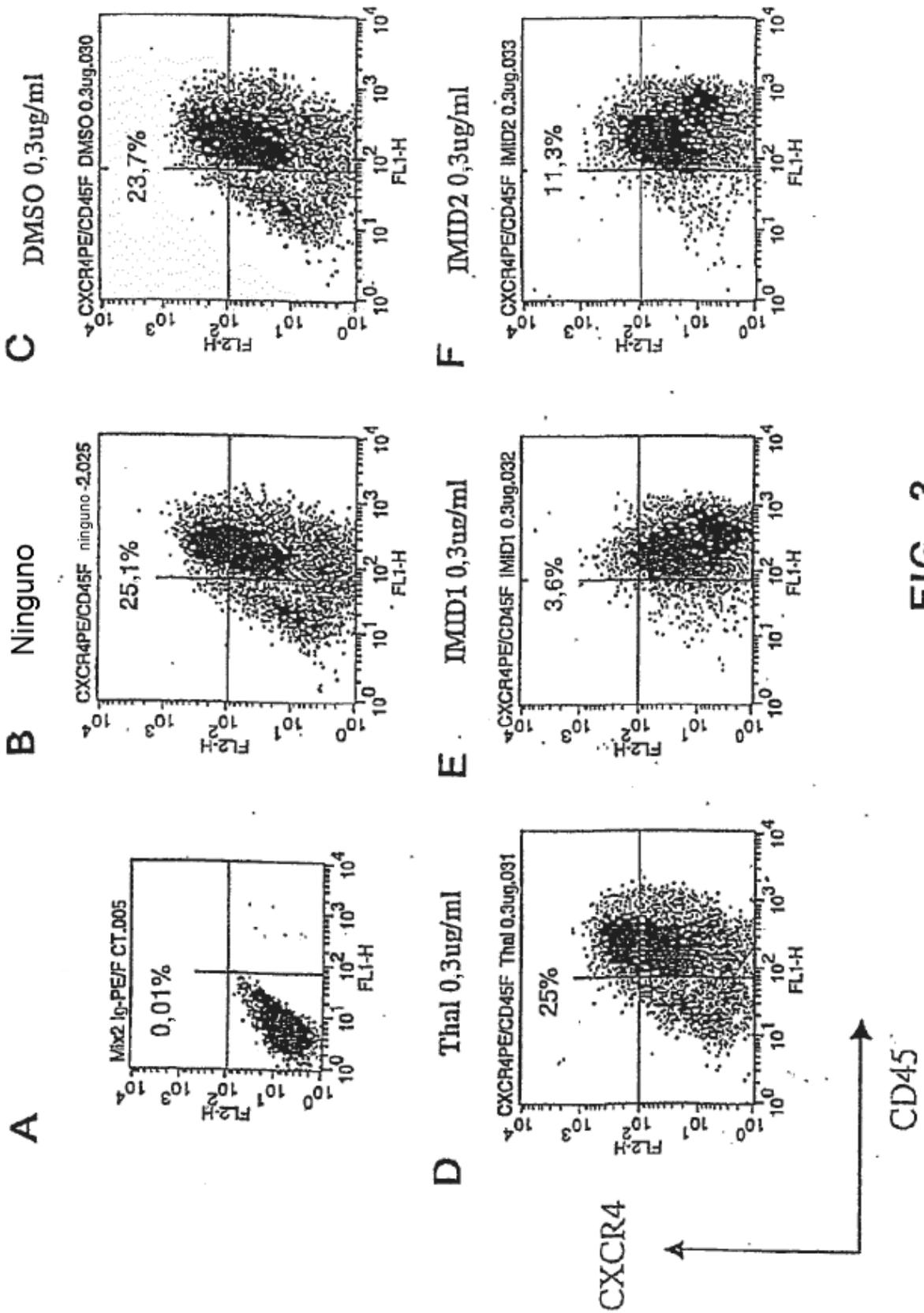


FIG. 3

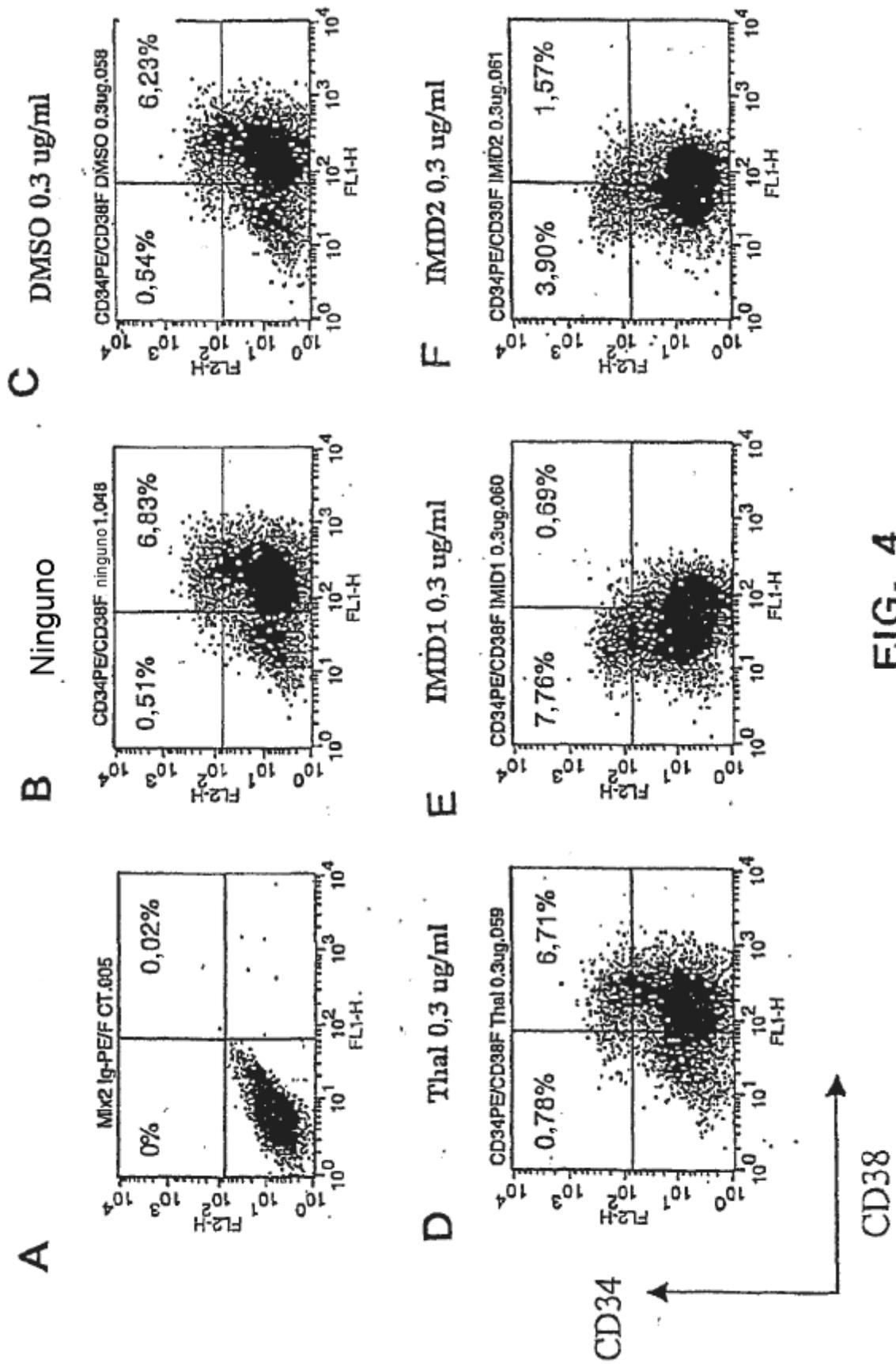


FIG. 4

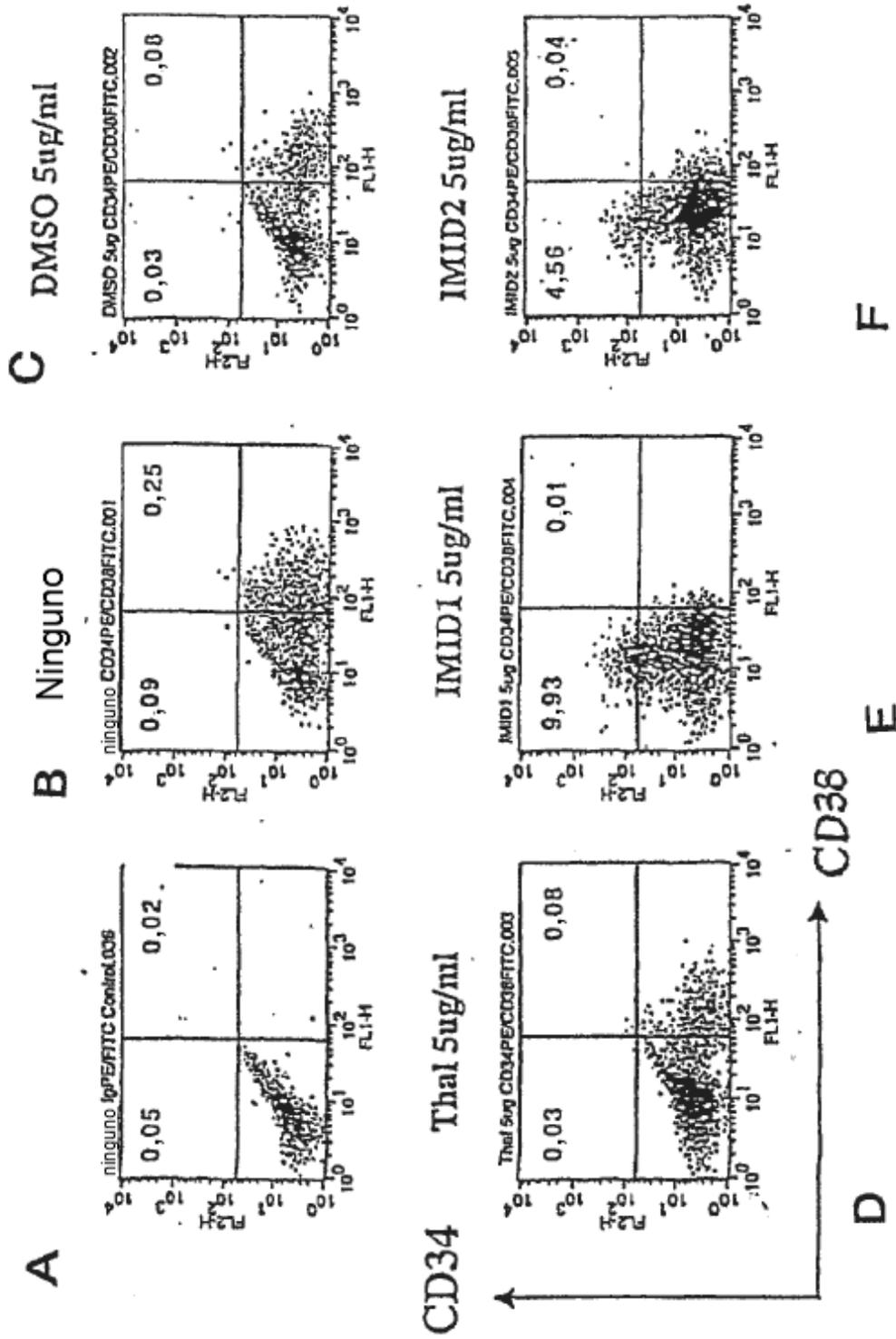


FIG. 5

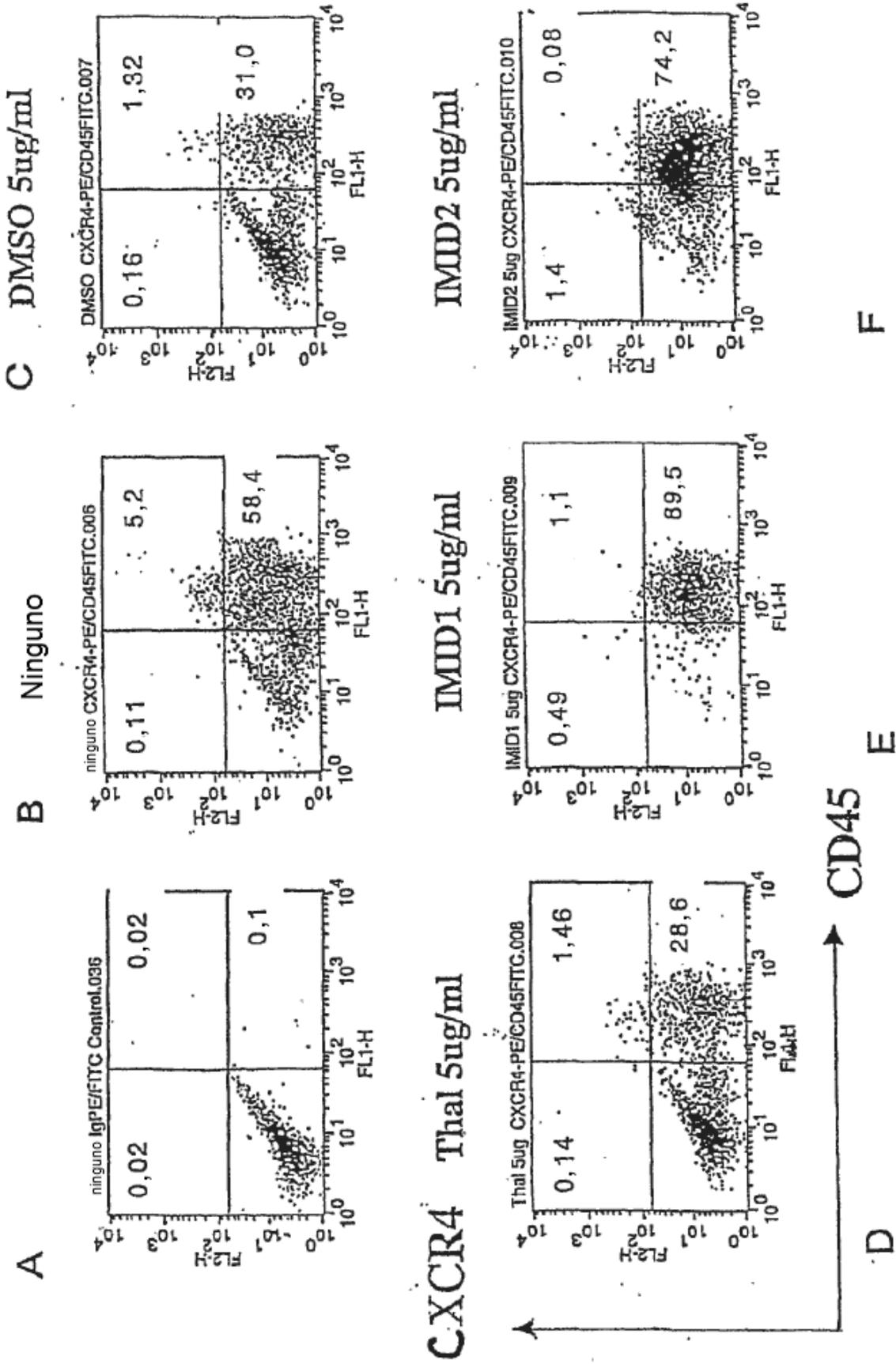


FIG. 6

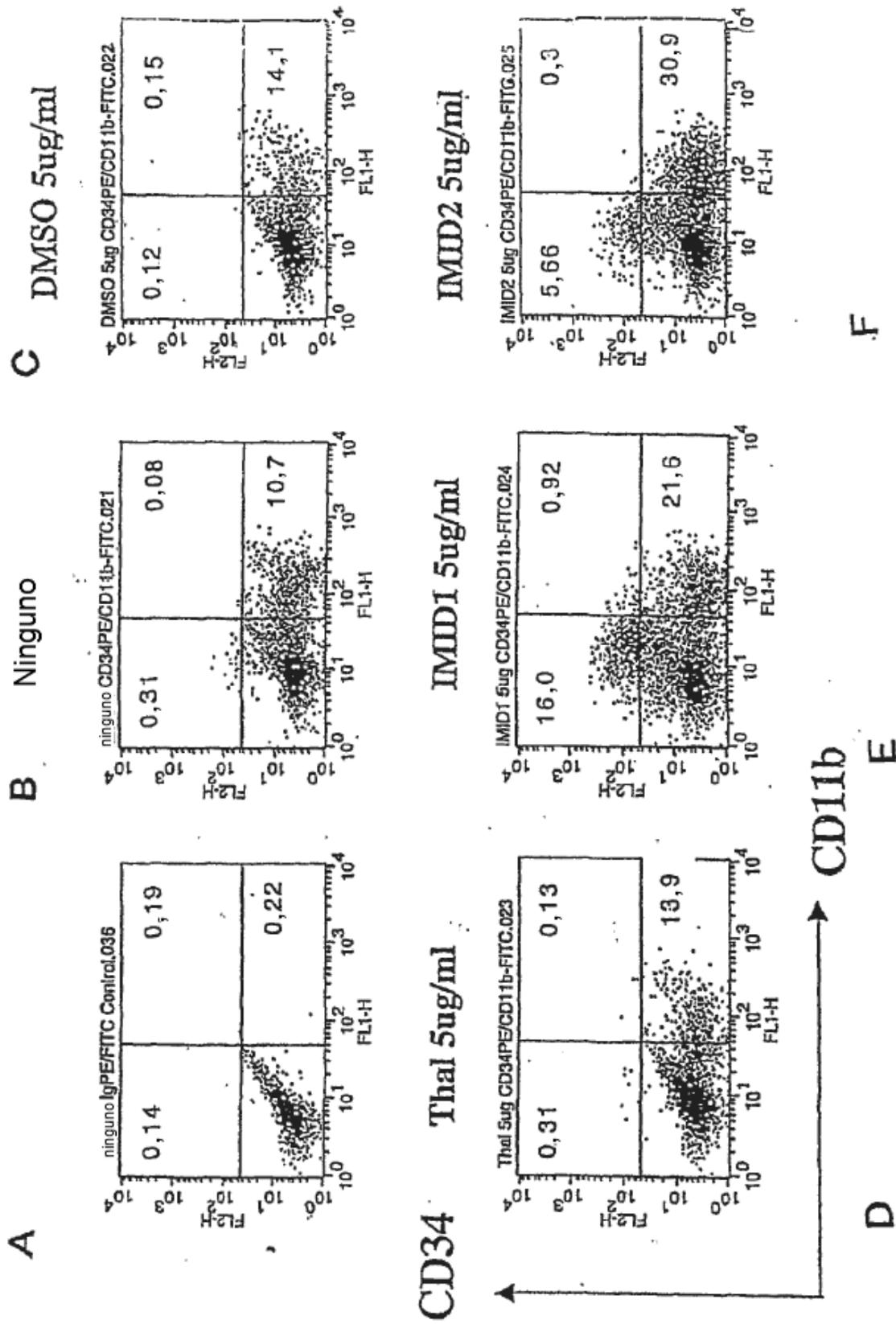


FIG. 7

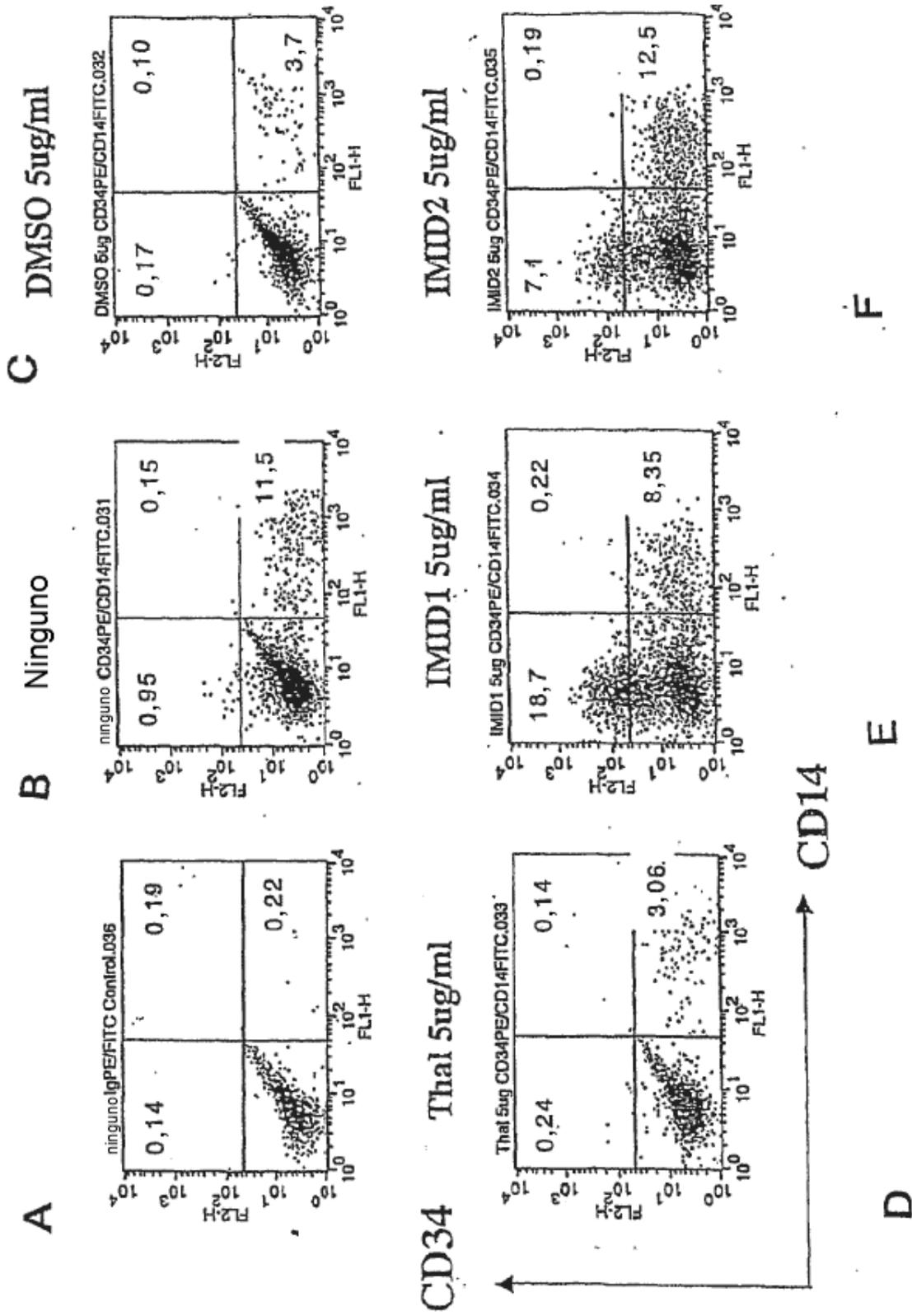


FIG. 8

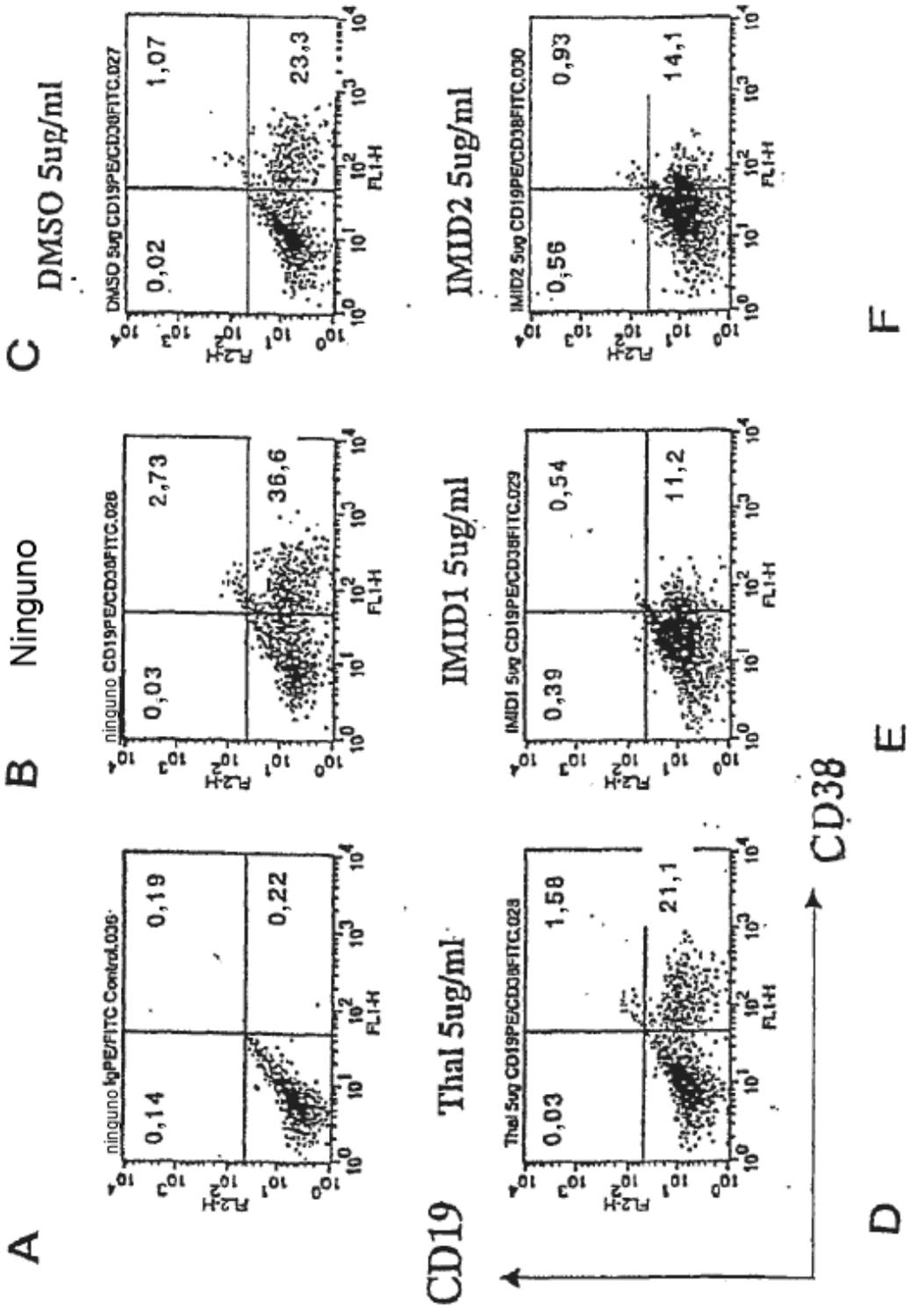


FIG. 9

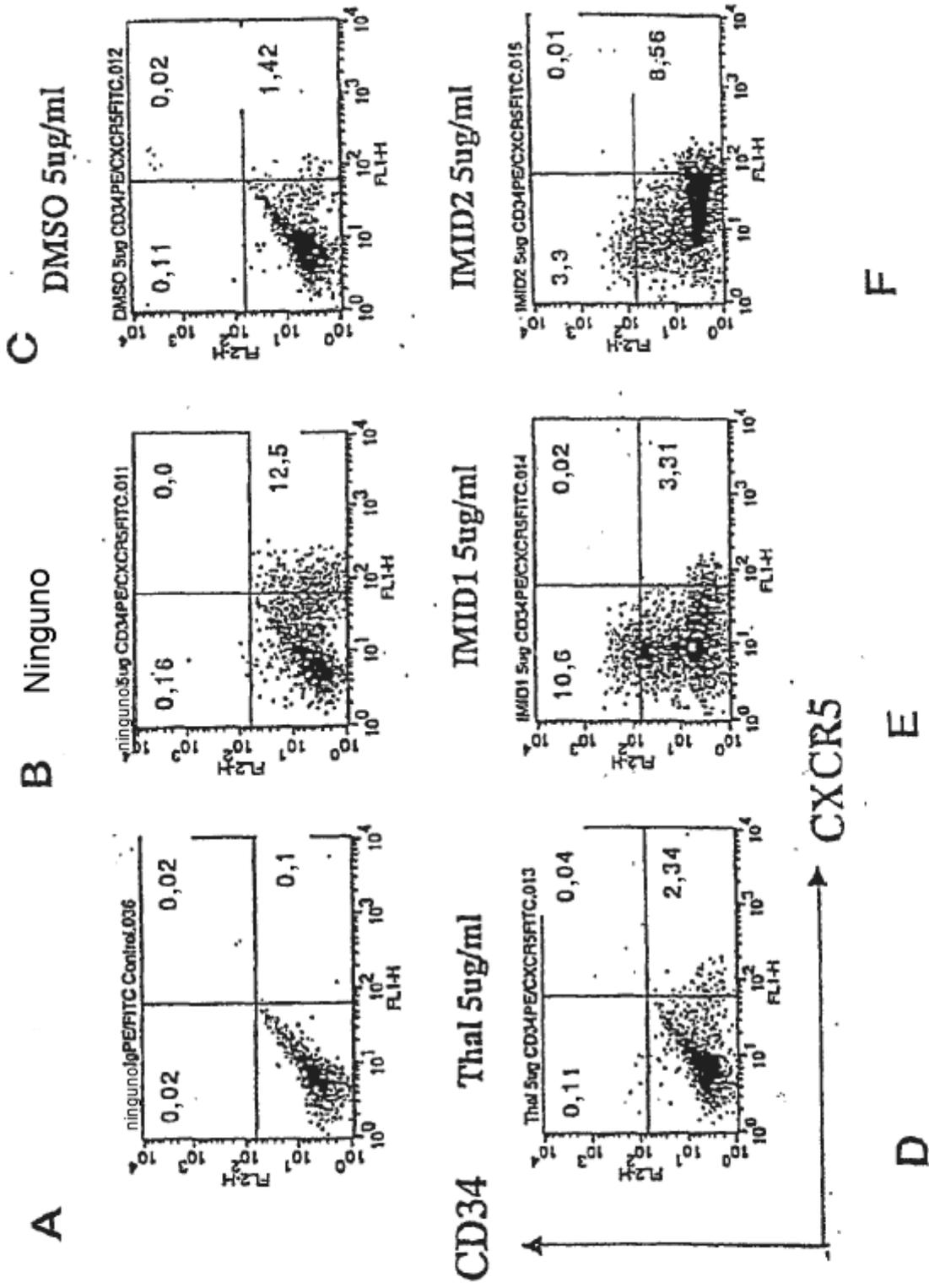


FIG. 10

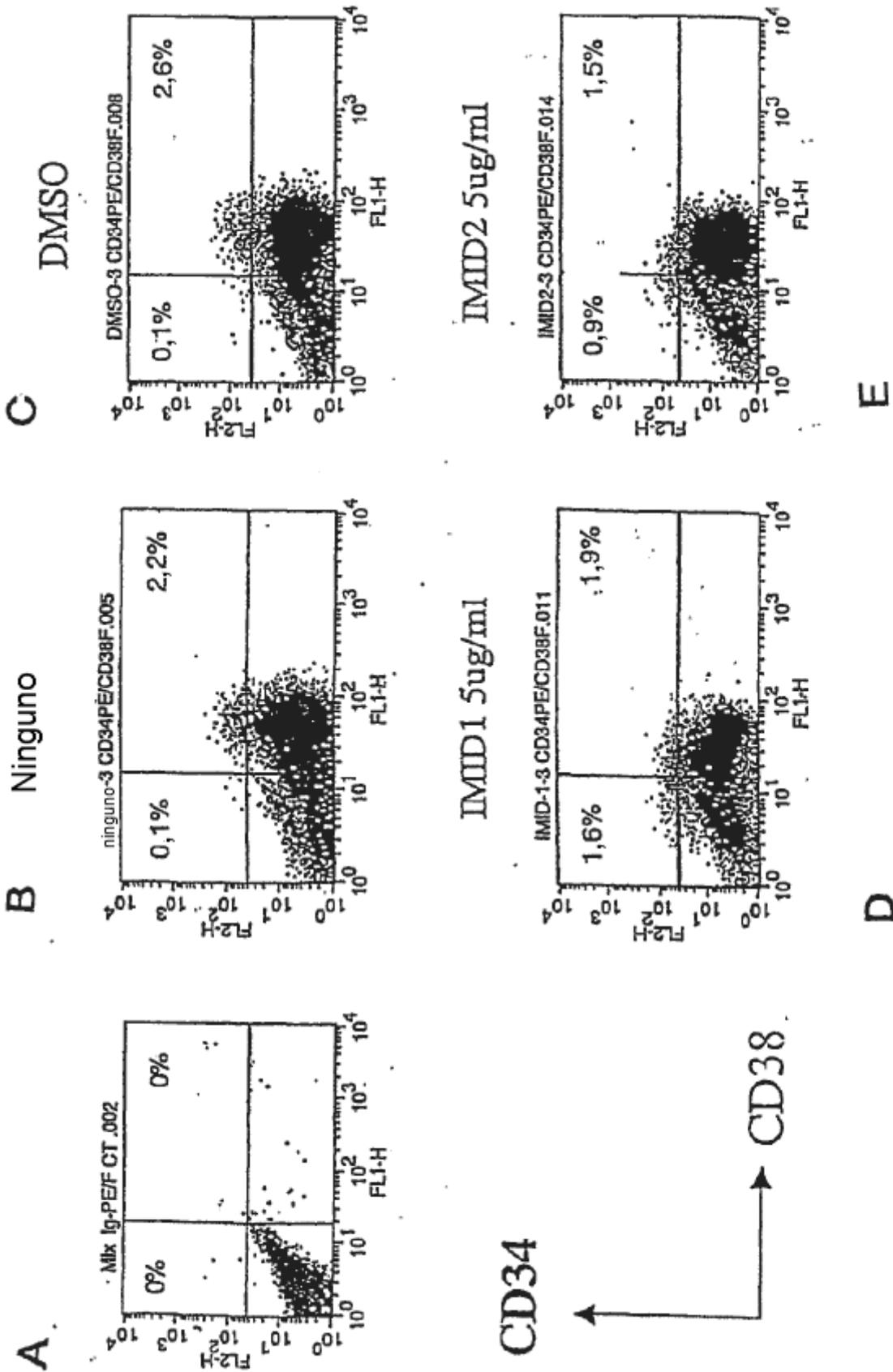


FIG. 11

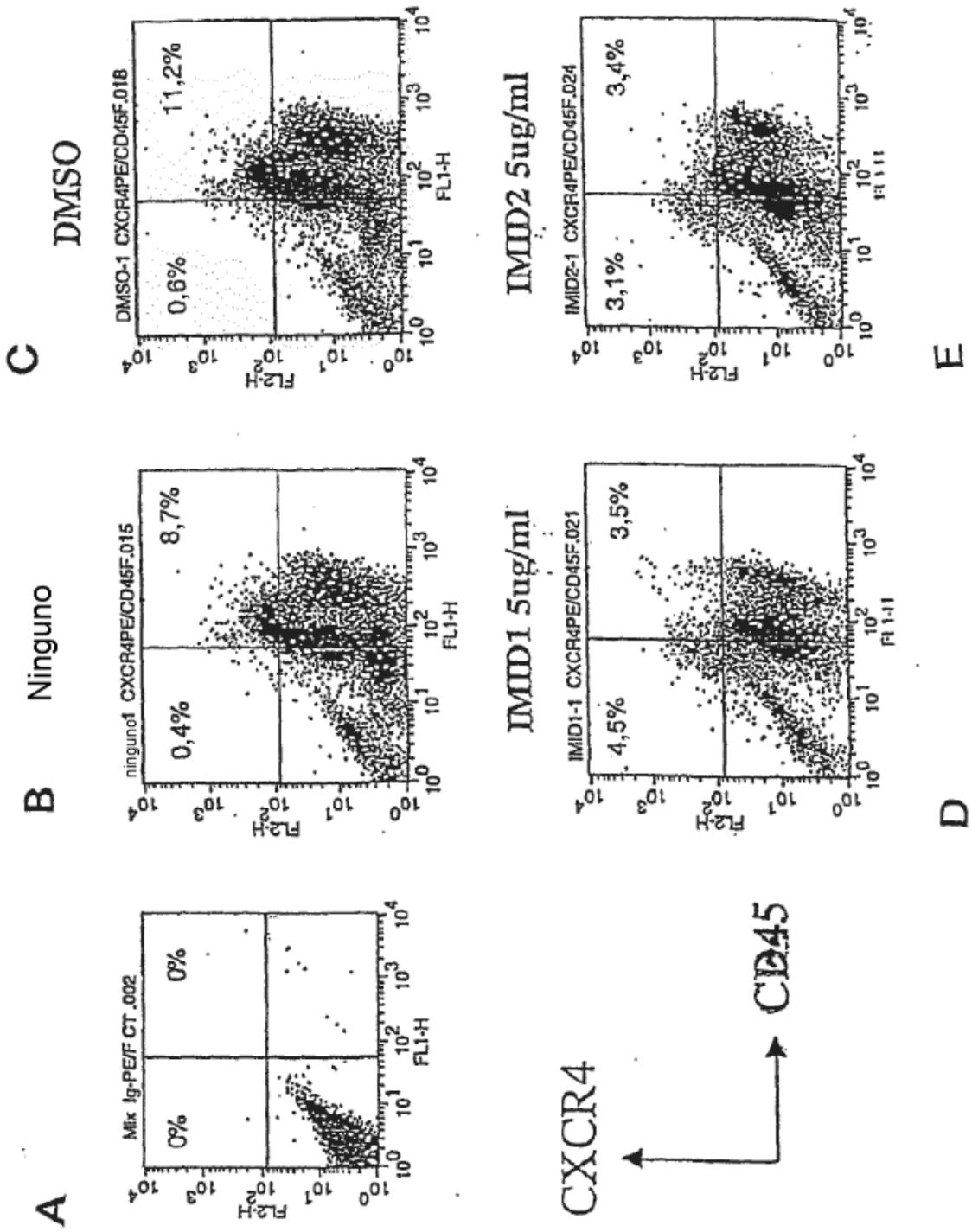


FIG. 12

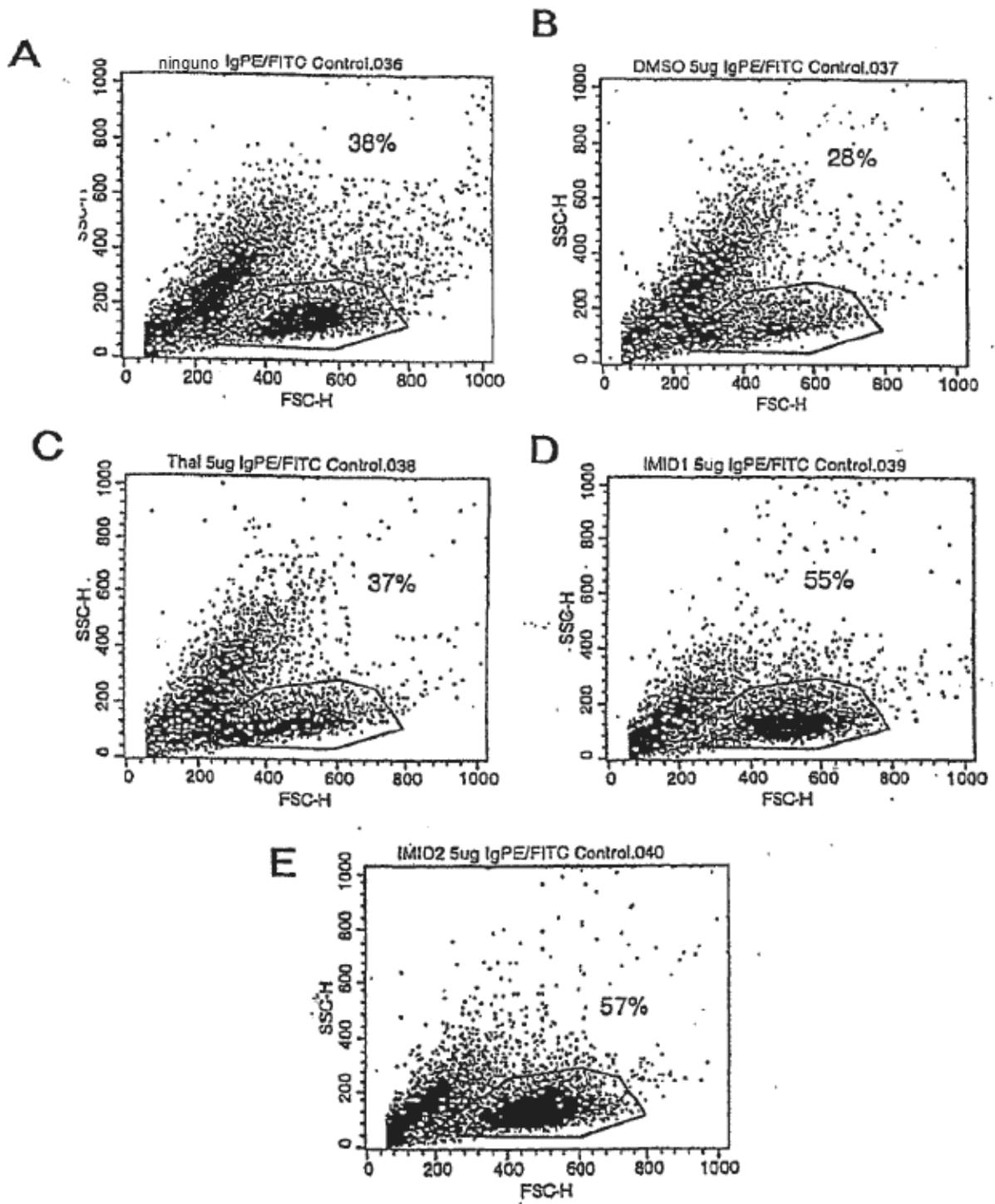


FIG. 13

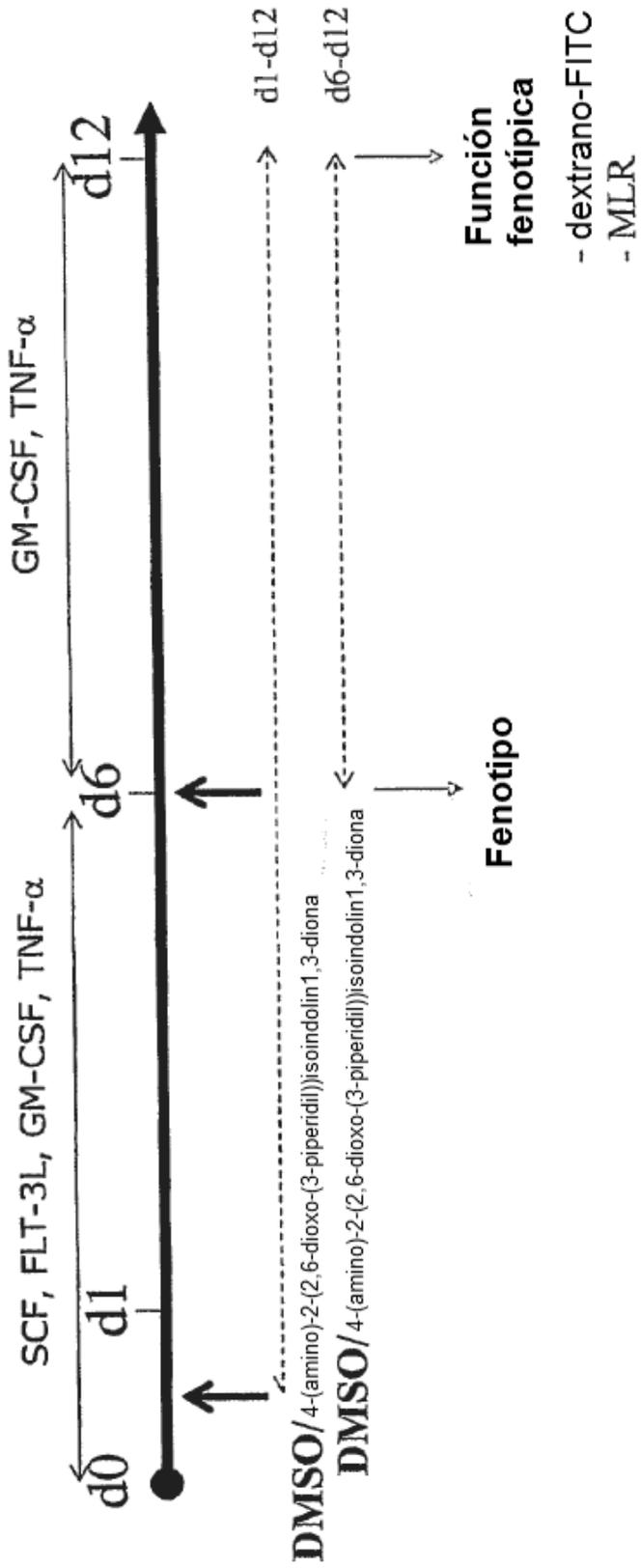


FIG. 14

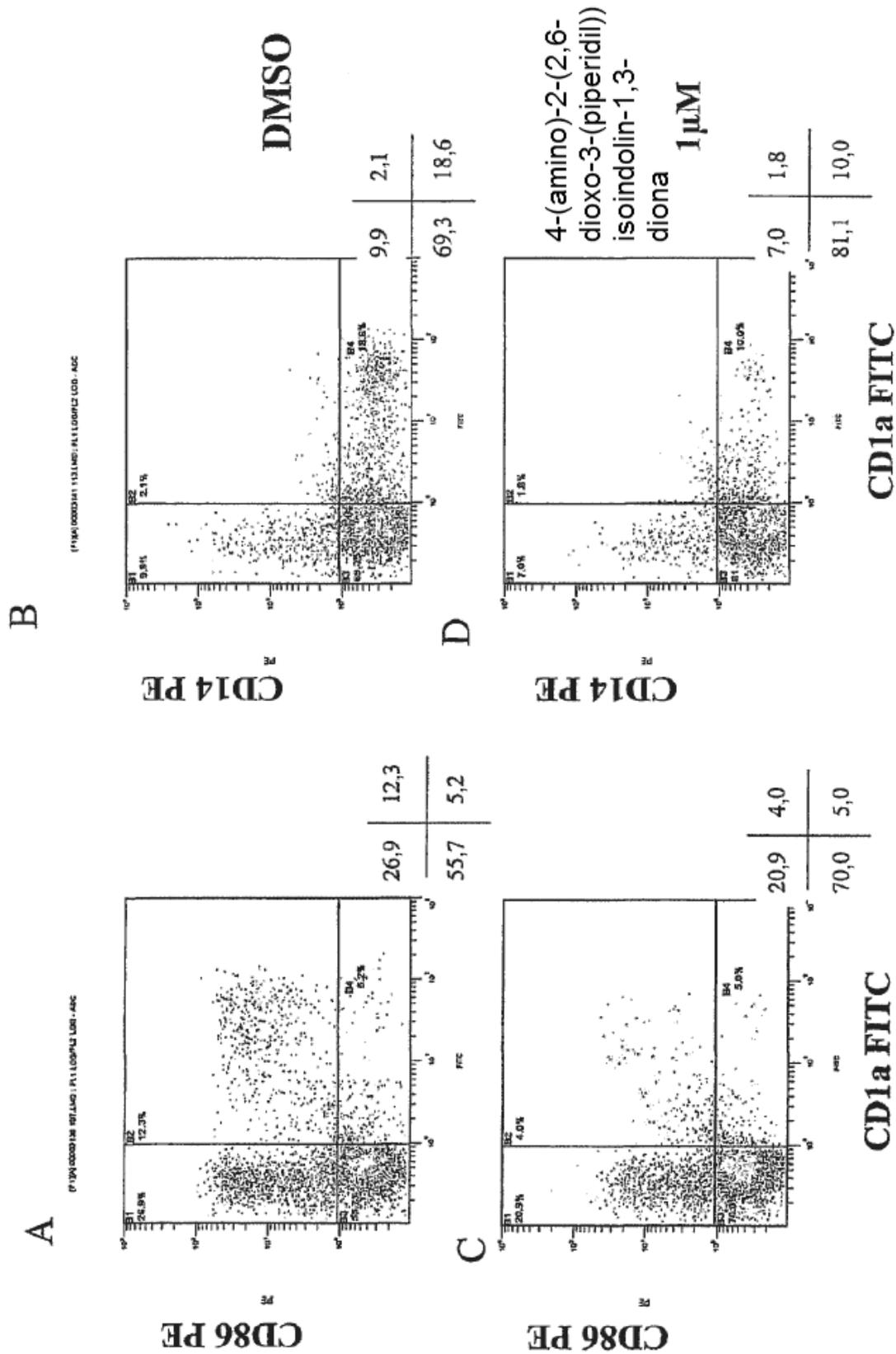


FIG. 15

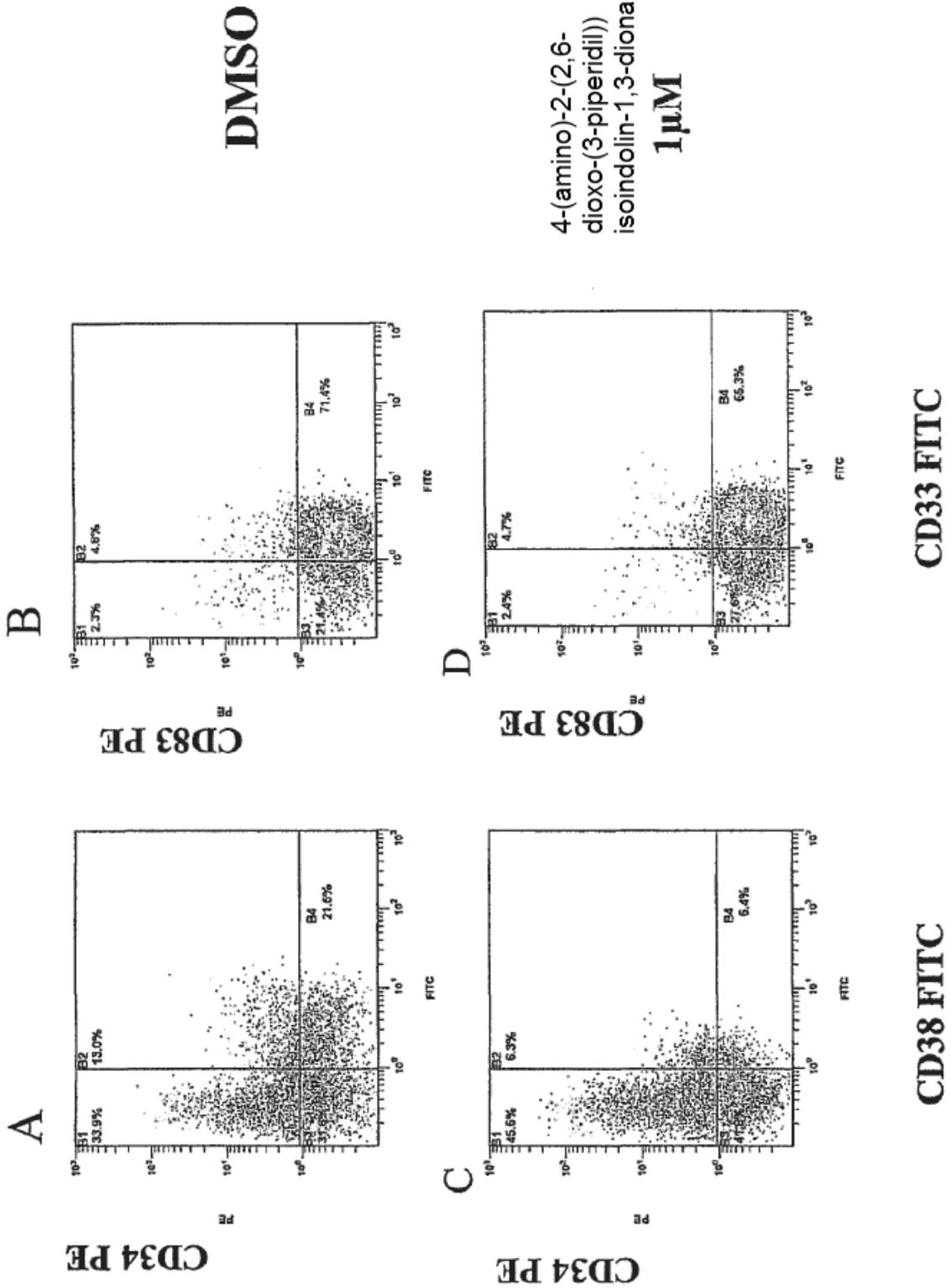


FIG. 16

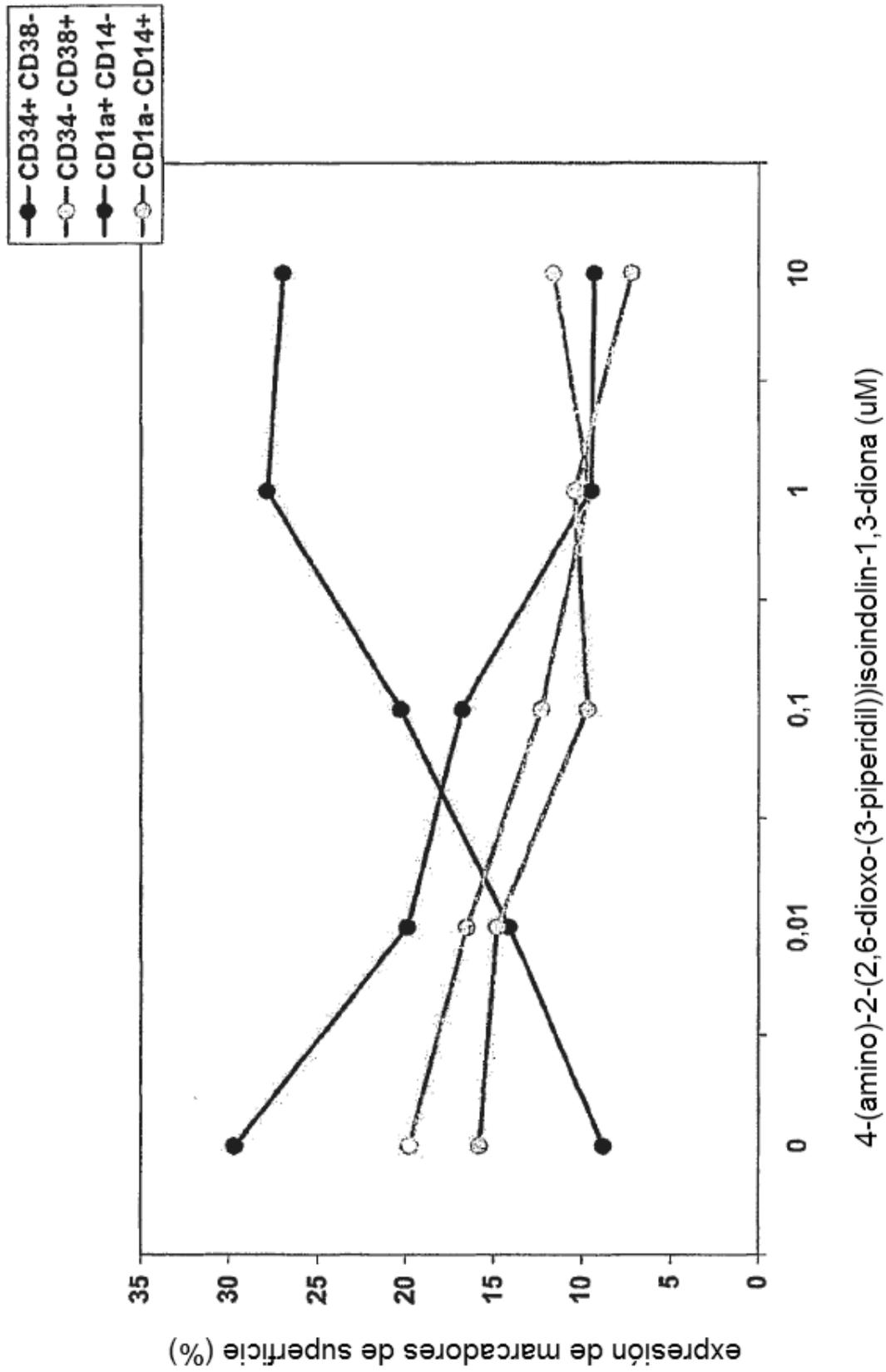


FIG. 17

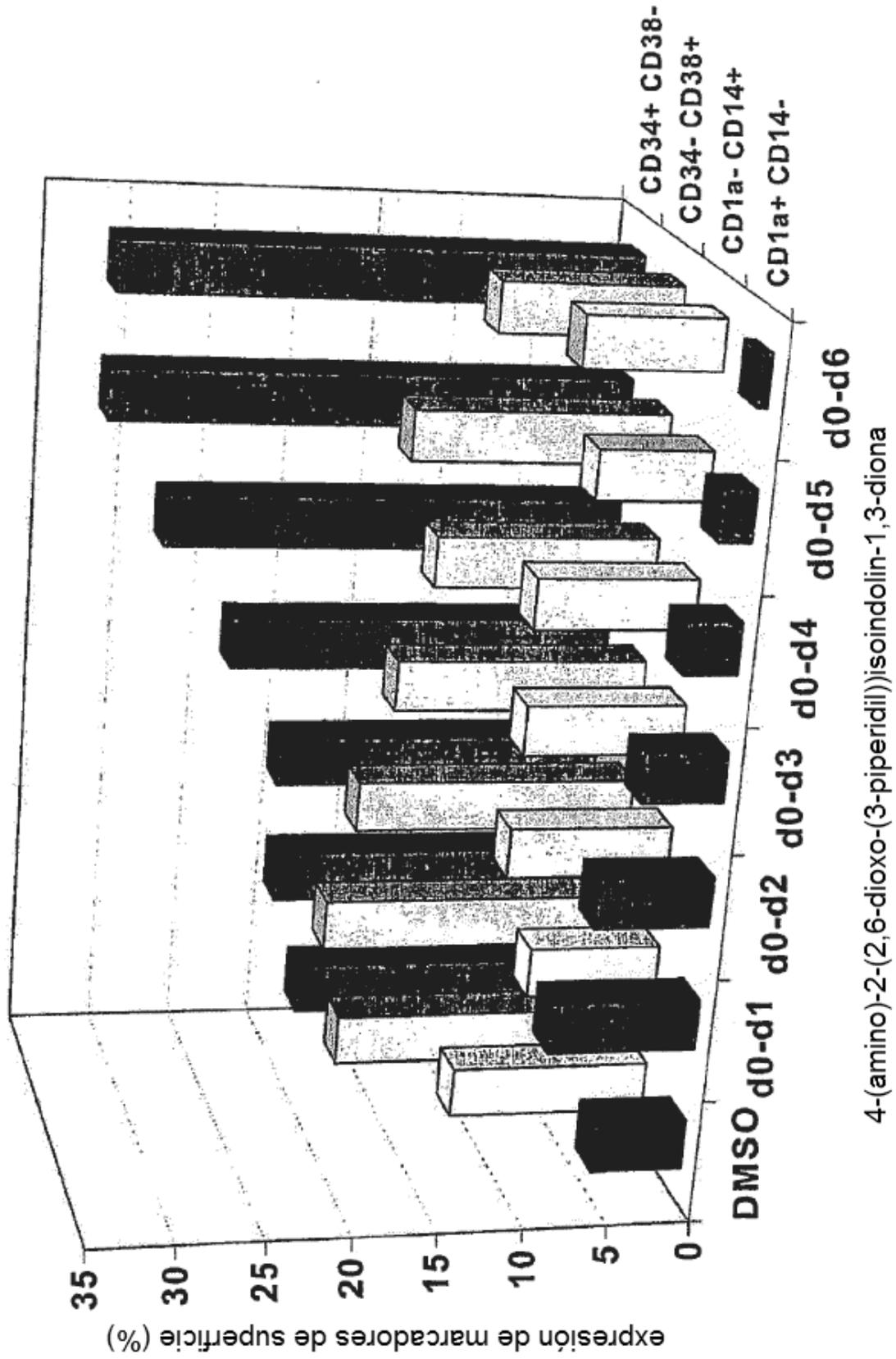


FIG. 18

4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona

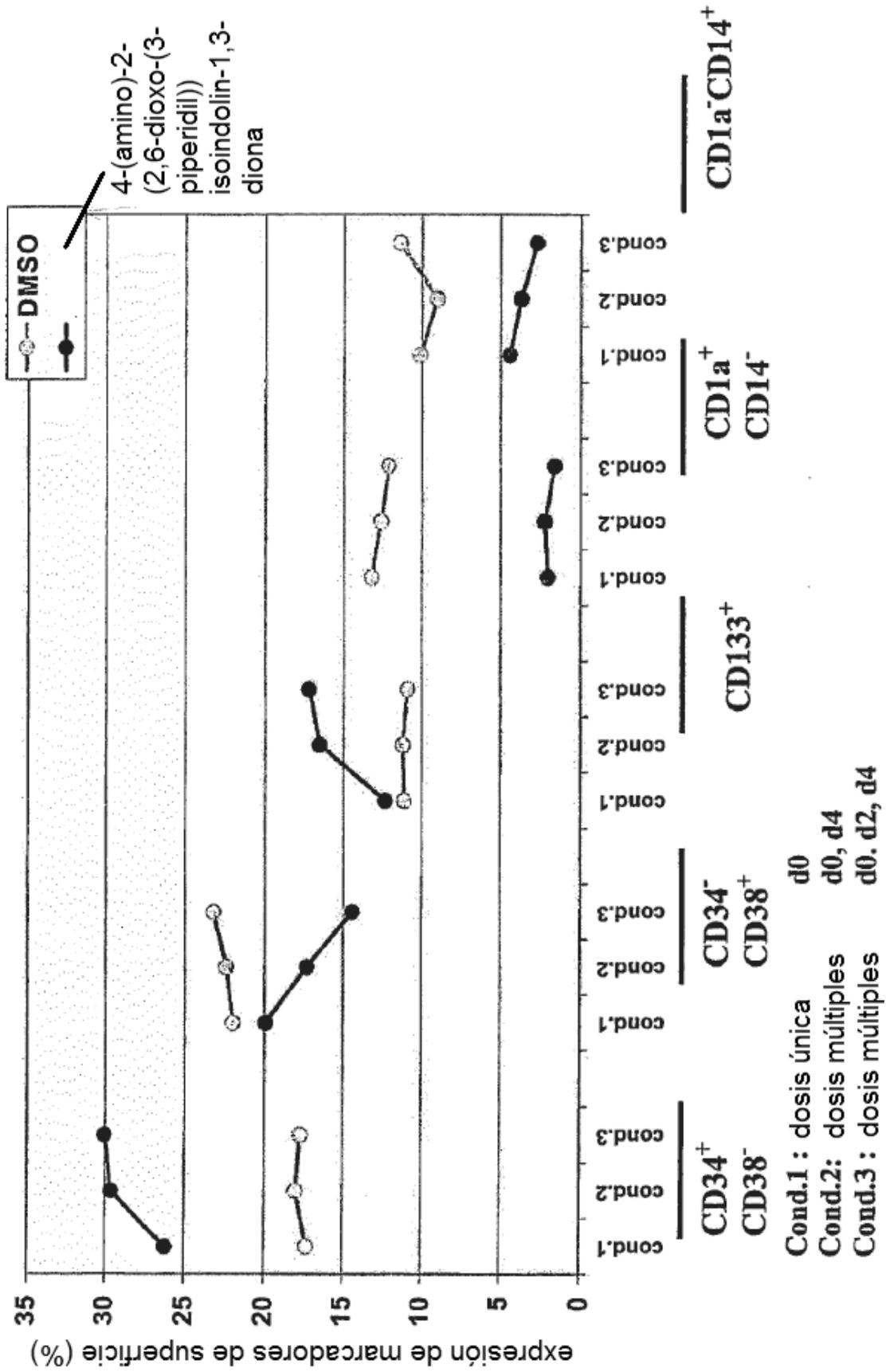


FIG. 19A

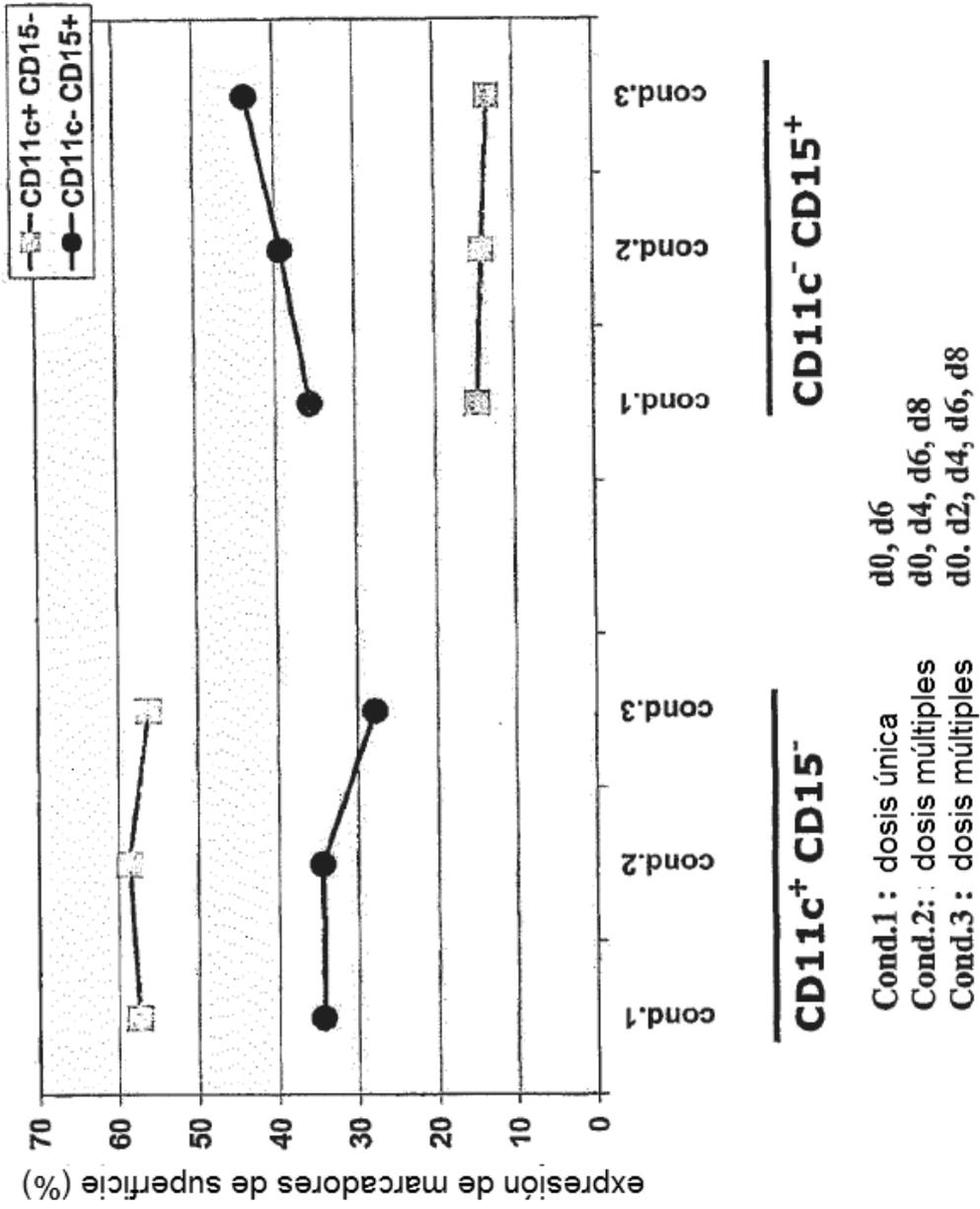


FIG. 19B

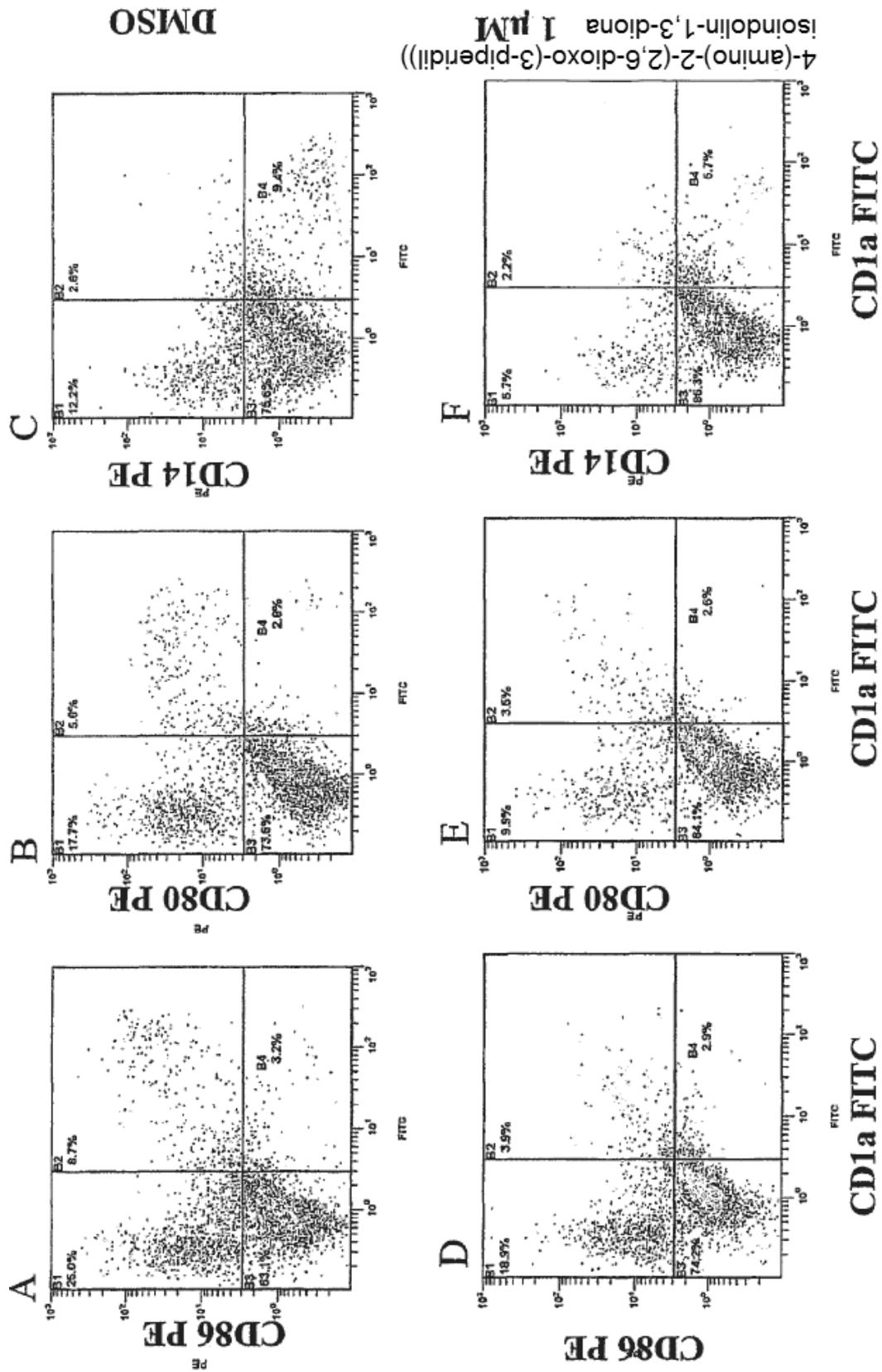


FIG. 20

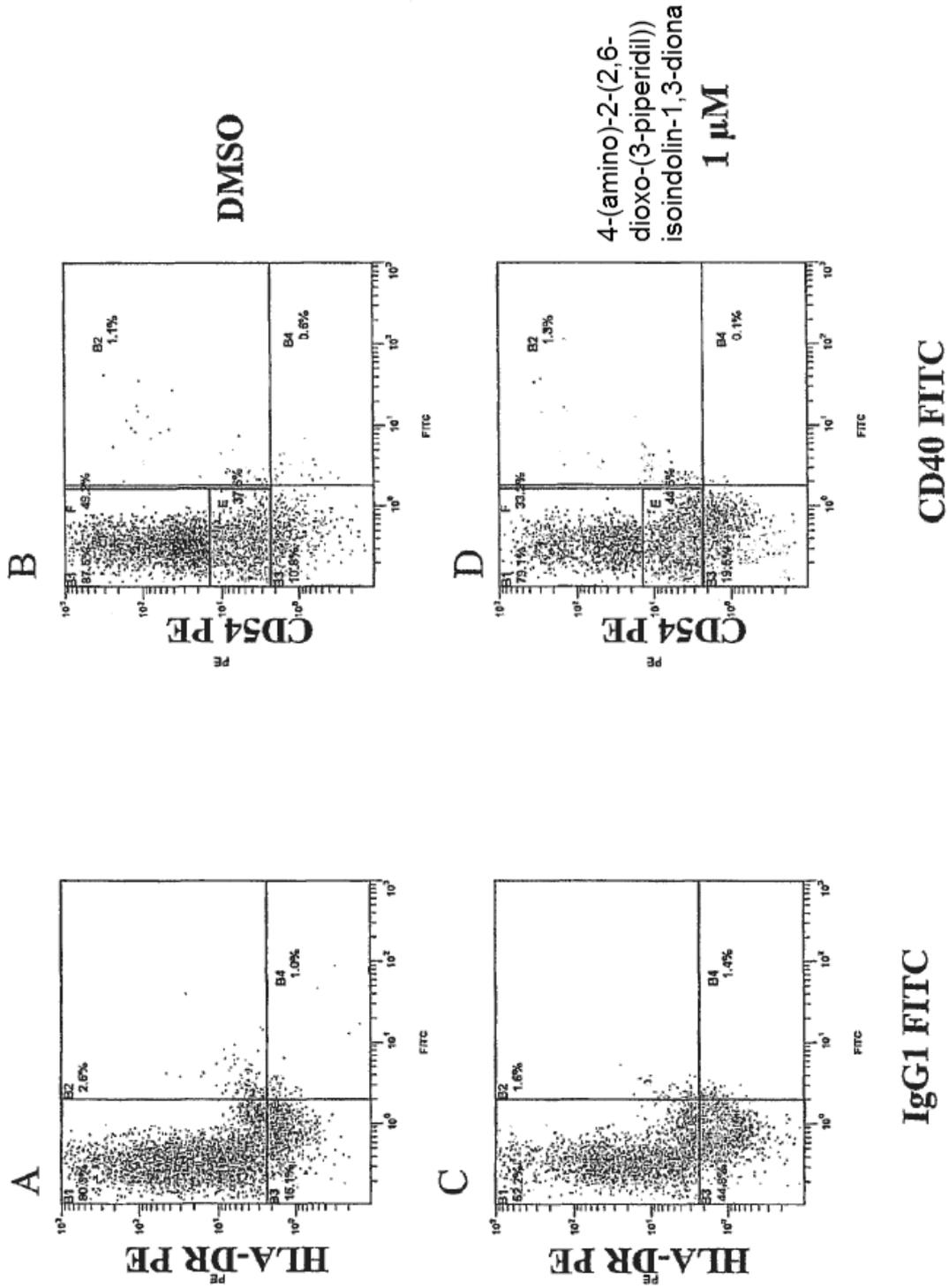


FIG. 21

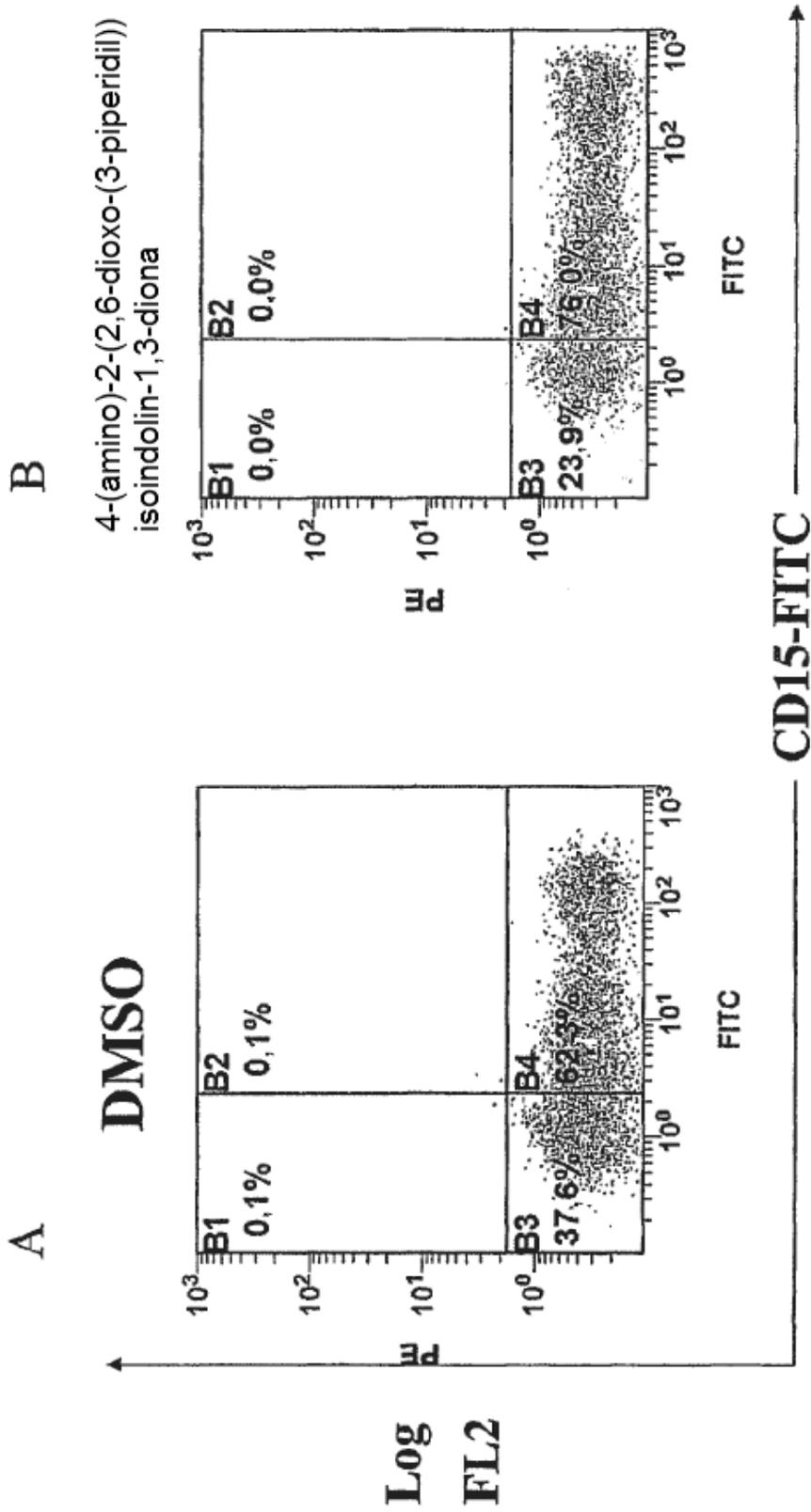


FIG. 22

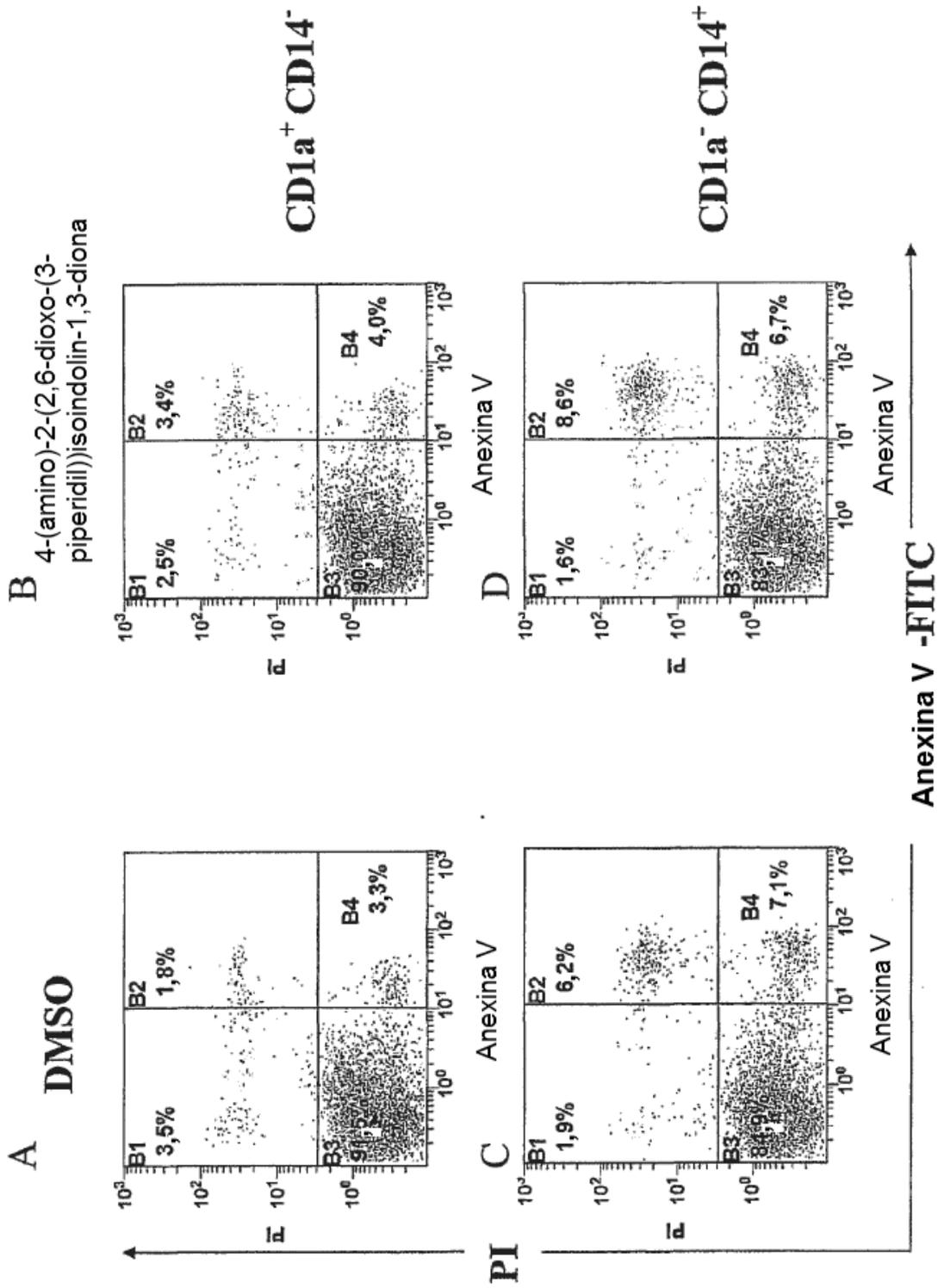


FIG. 23

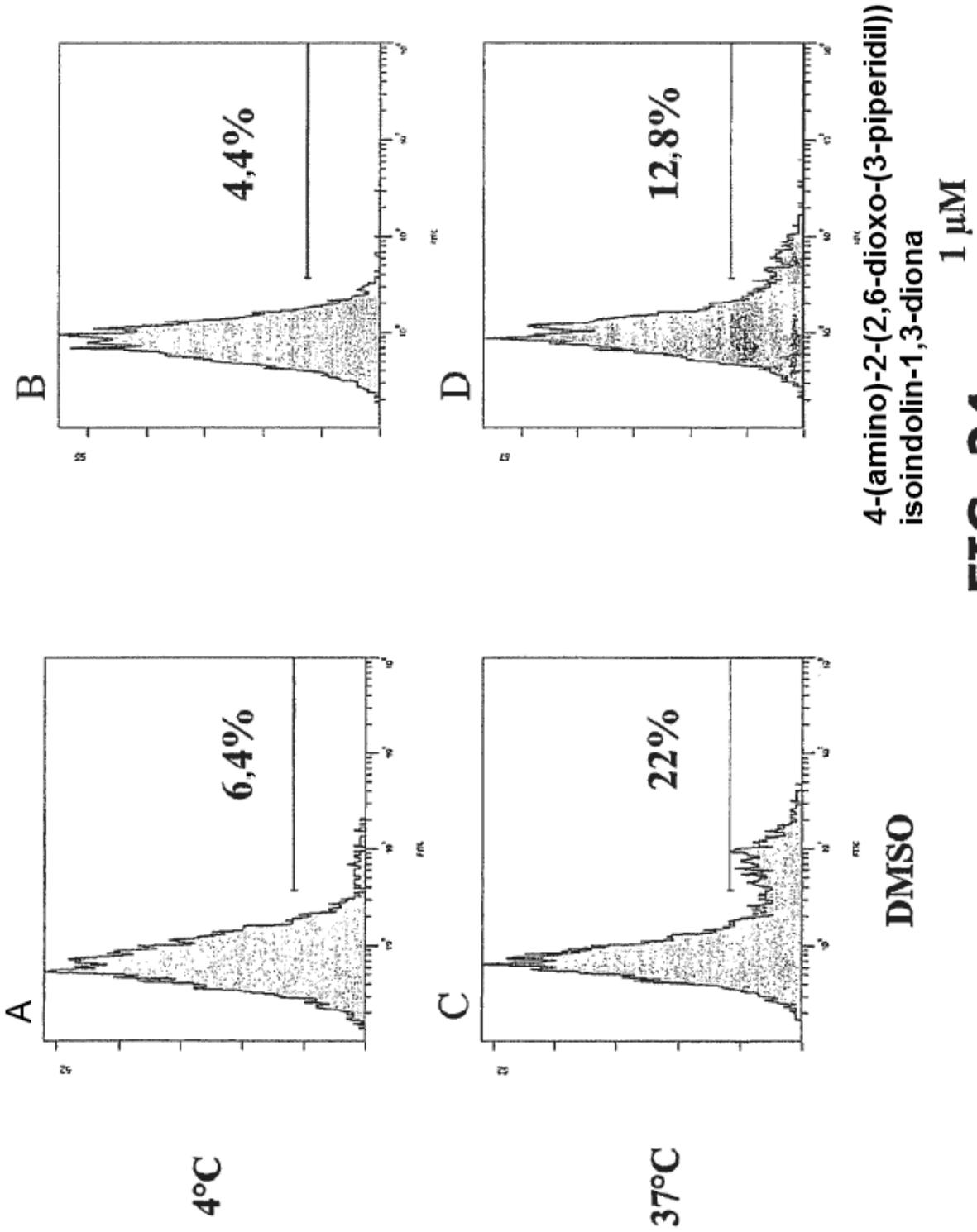
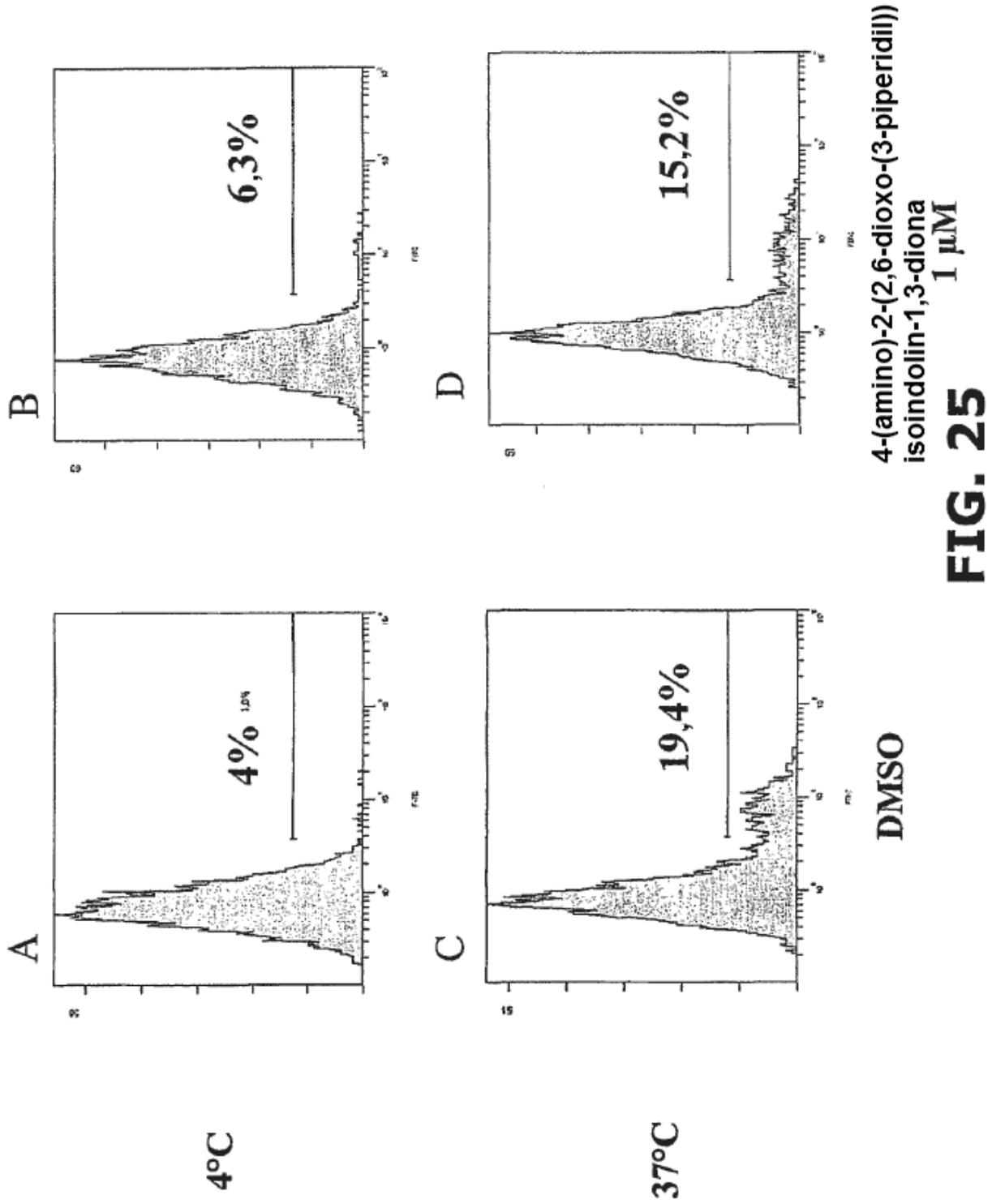


FIG. 24



Alorreactividad de DC generadas a partir de progenitores BM CD34+ con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona

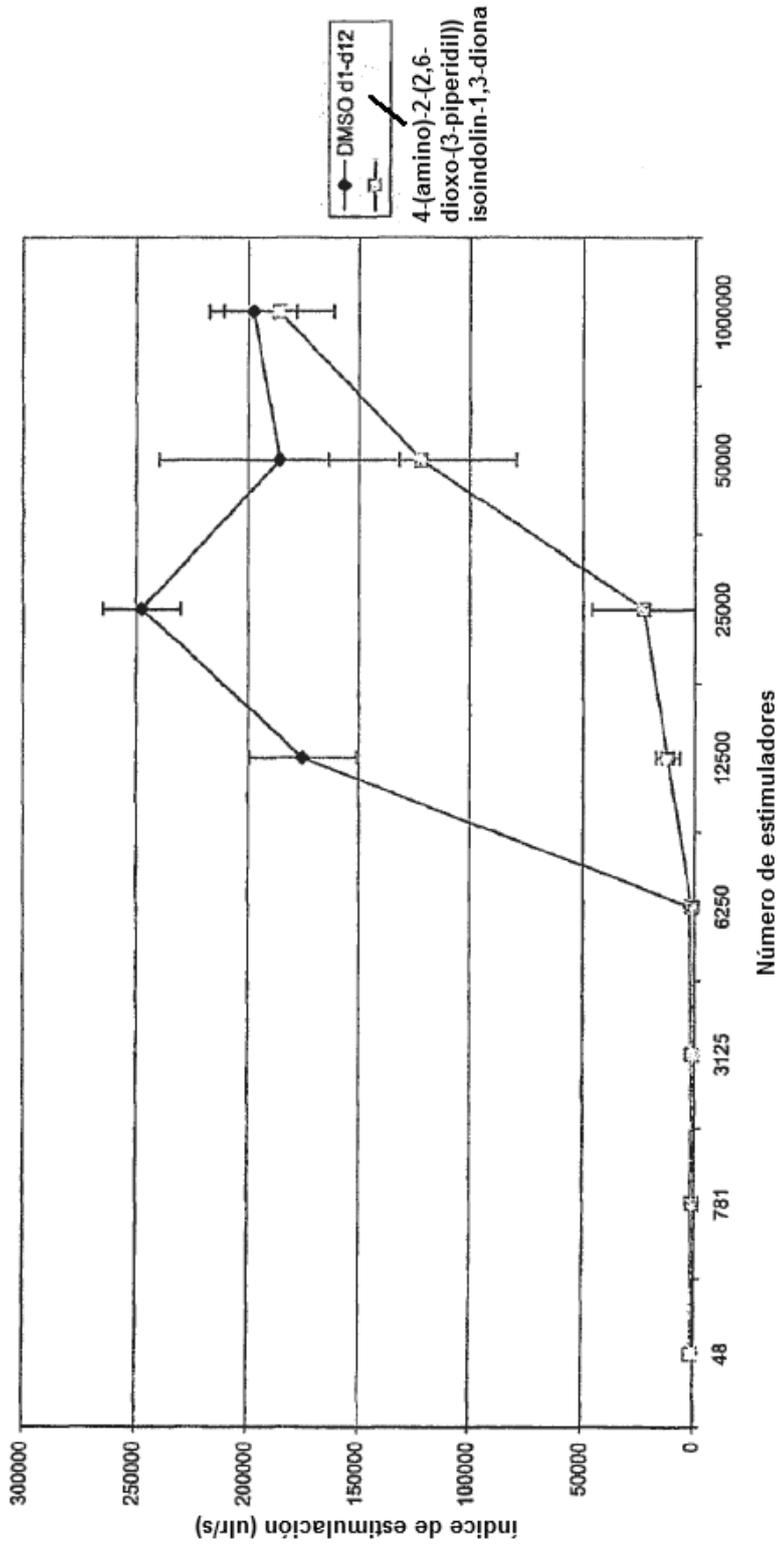


FIG. 26

Alorreactividad de DC generadas a partir de progentores BM CD34+ con o sin 4-(amino)-2-(2,6-dioxo-(3-piperidil))isoindolin-1,3-diona

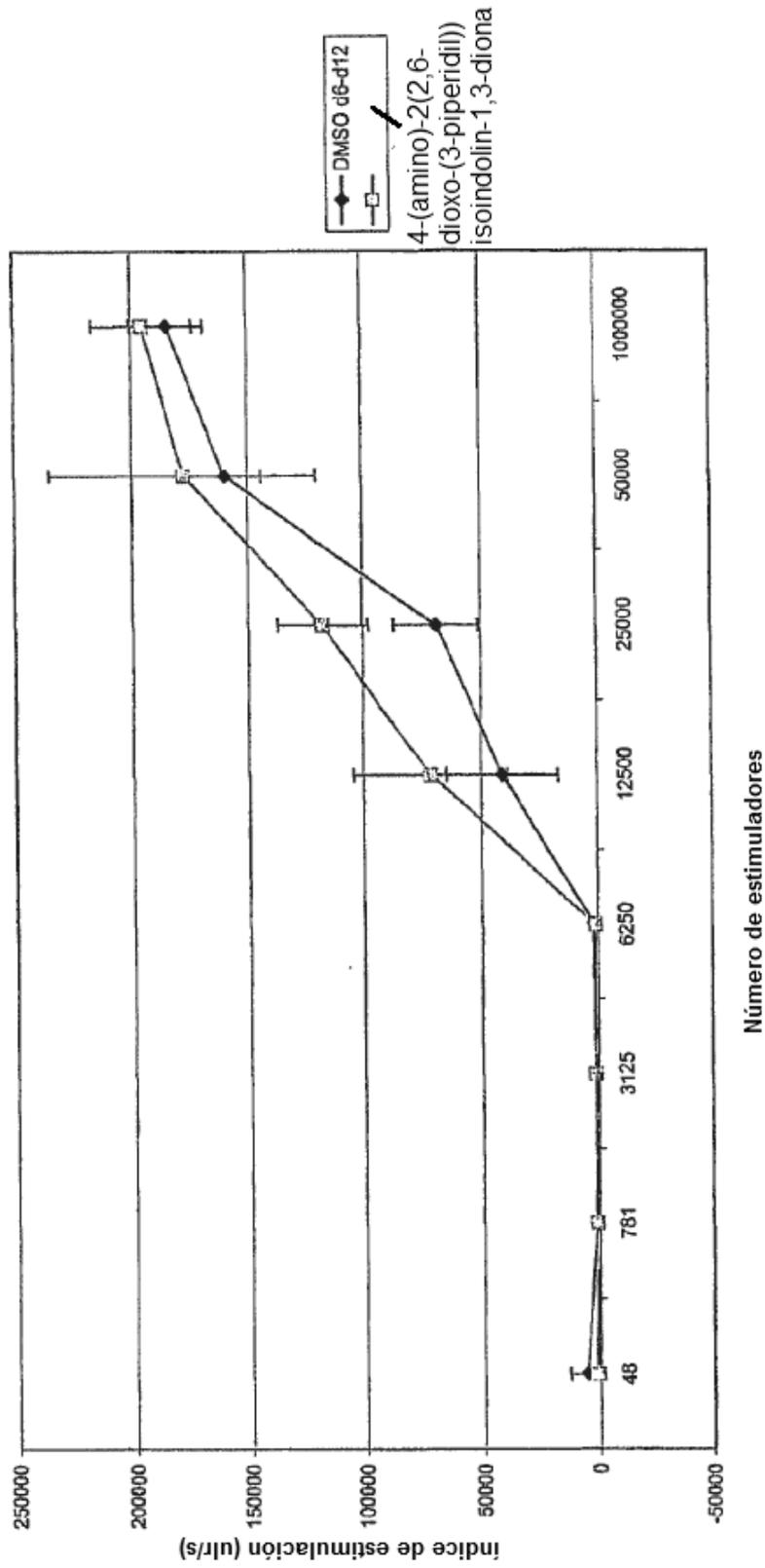


FIG. 27

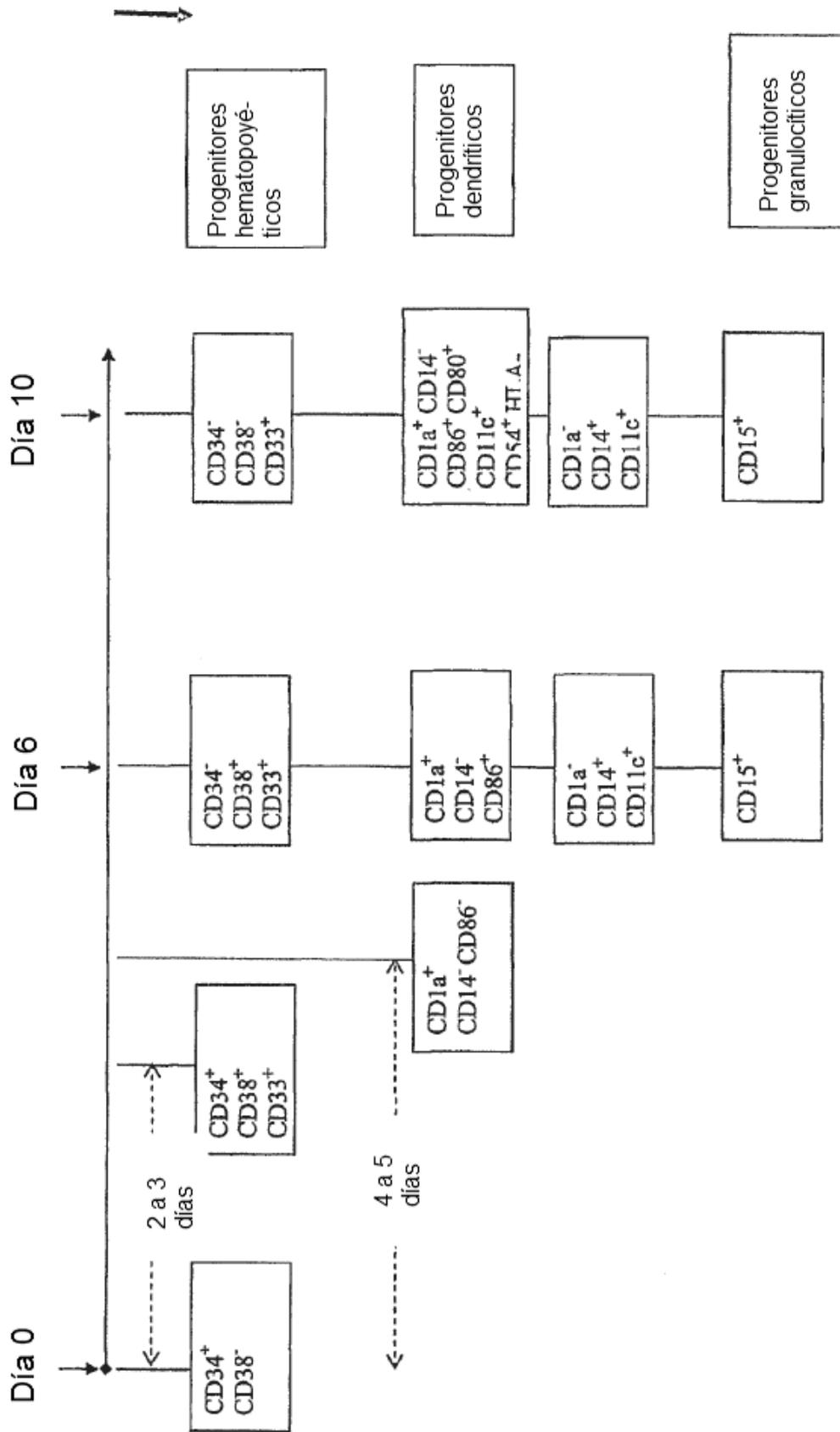


FIG. 28

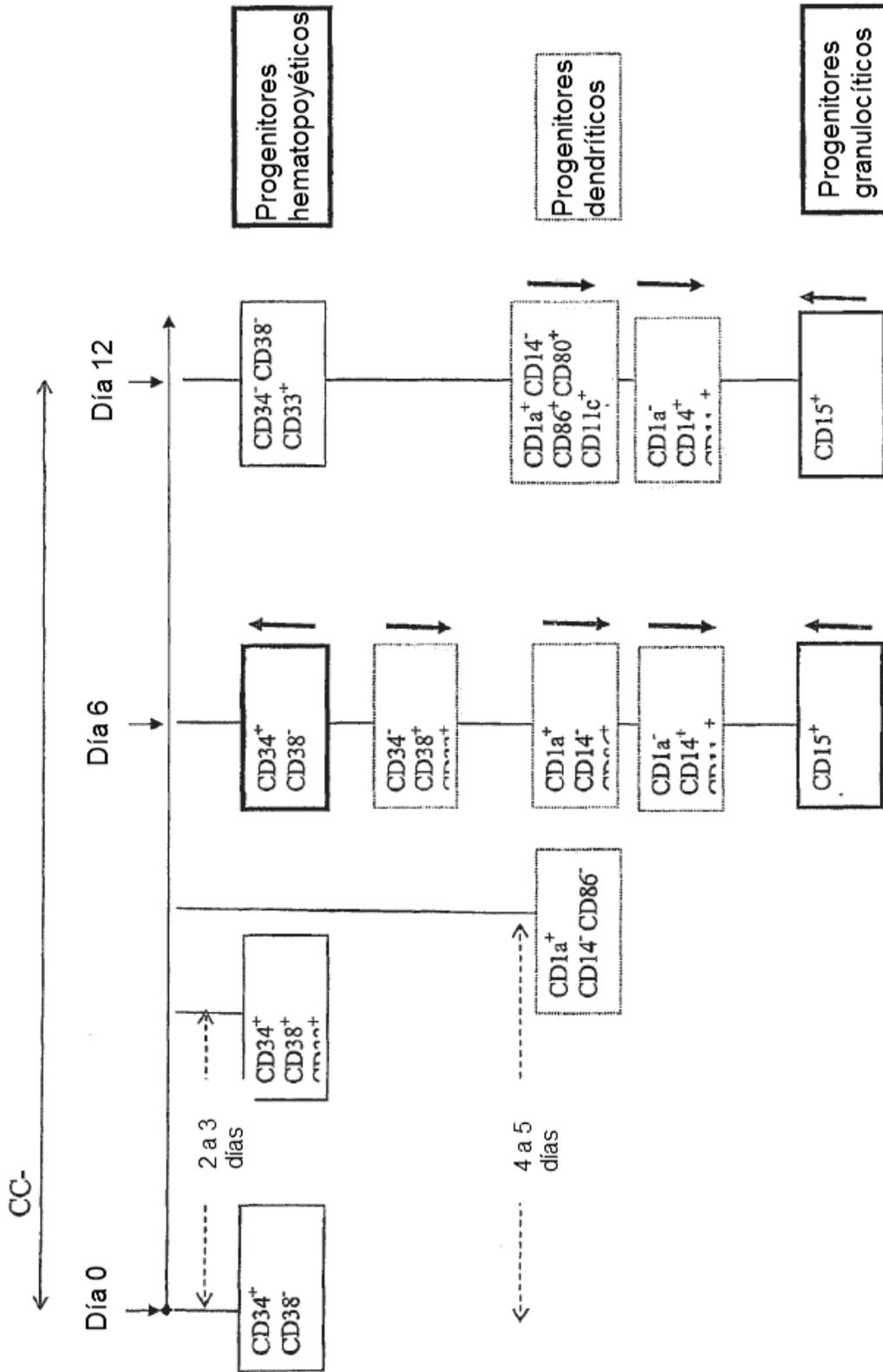


FIG. 29

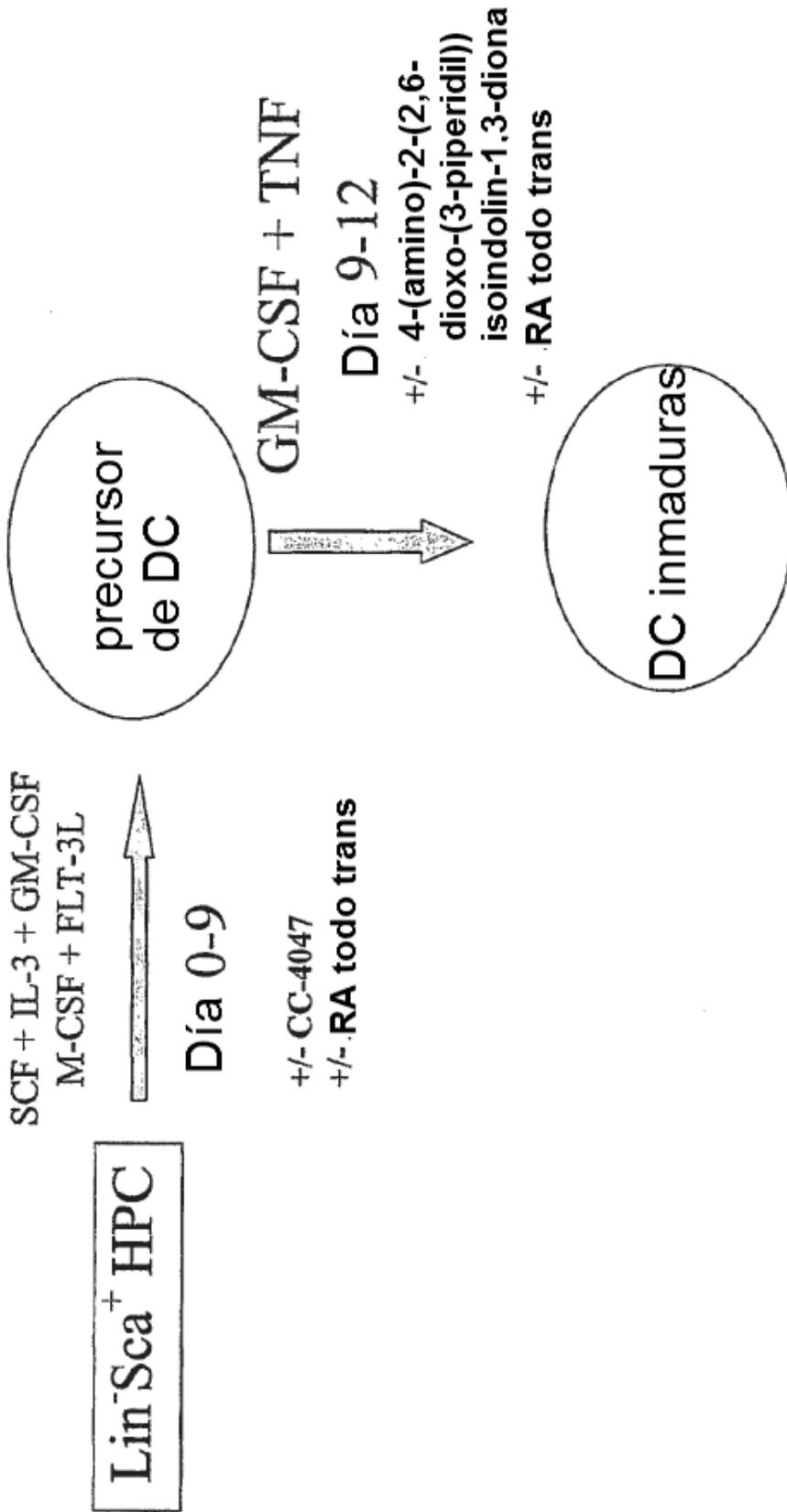


FIG. 30

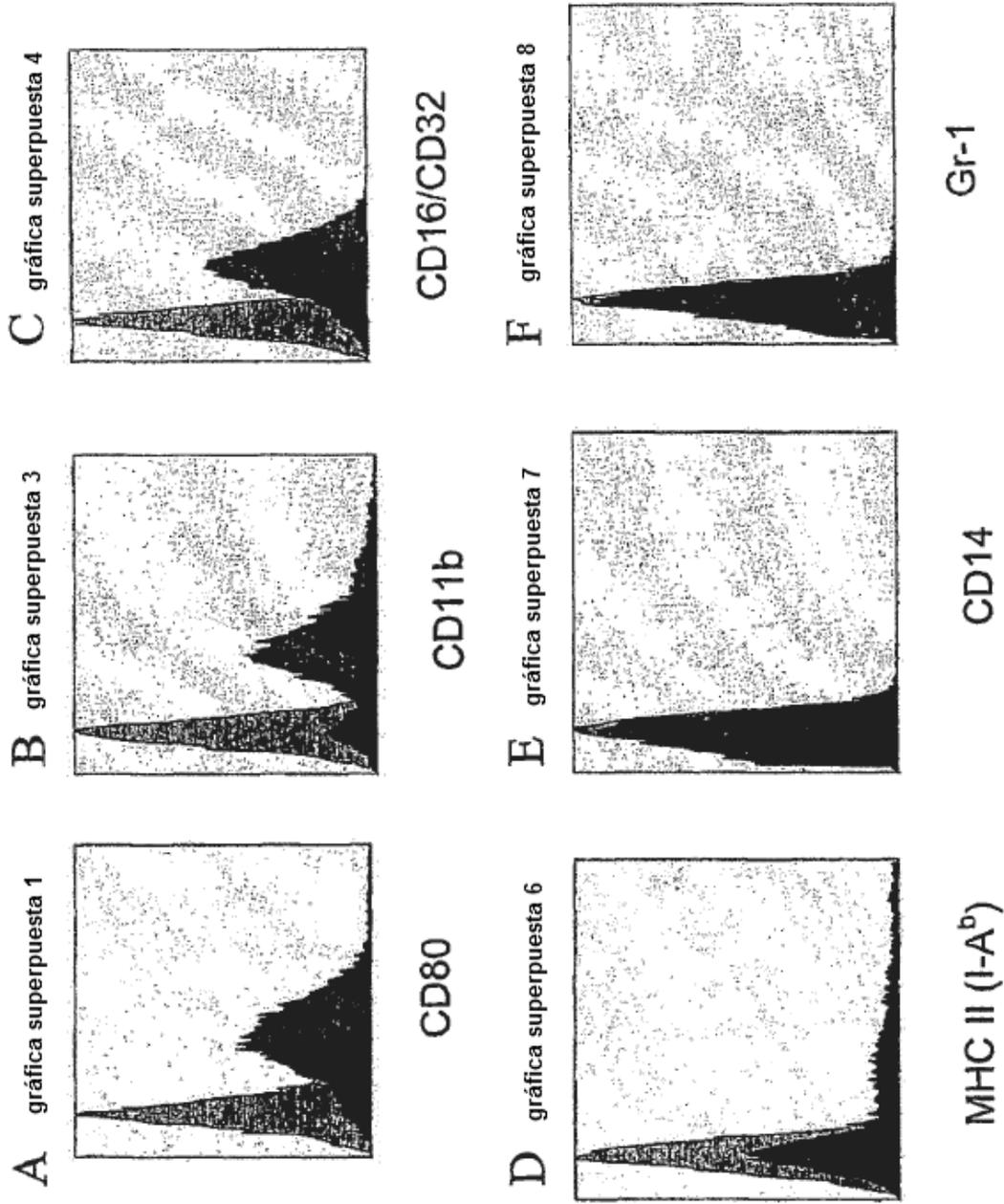


FIG. 31

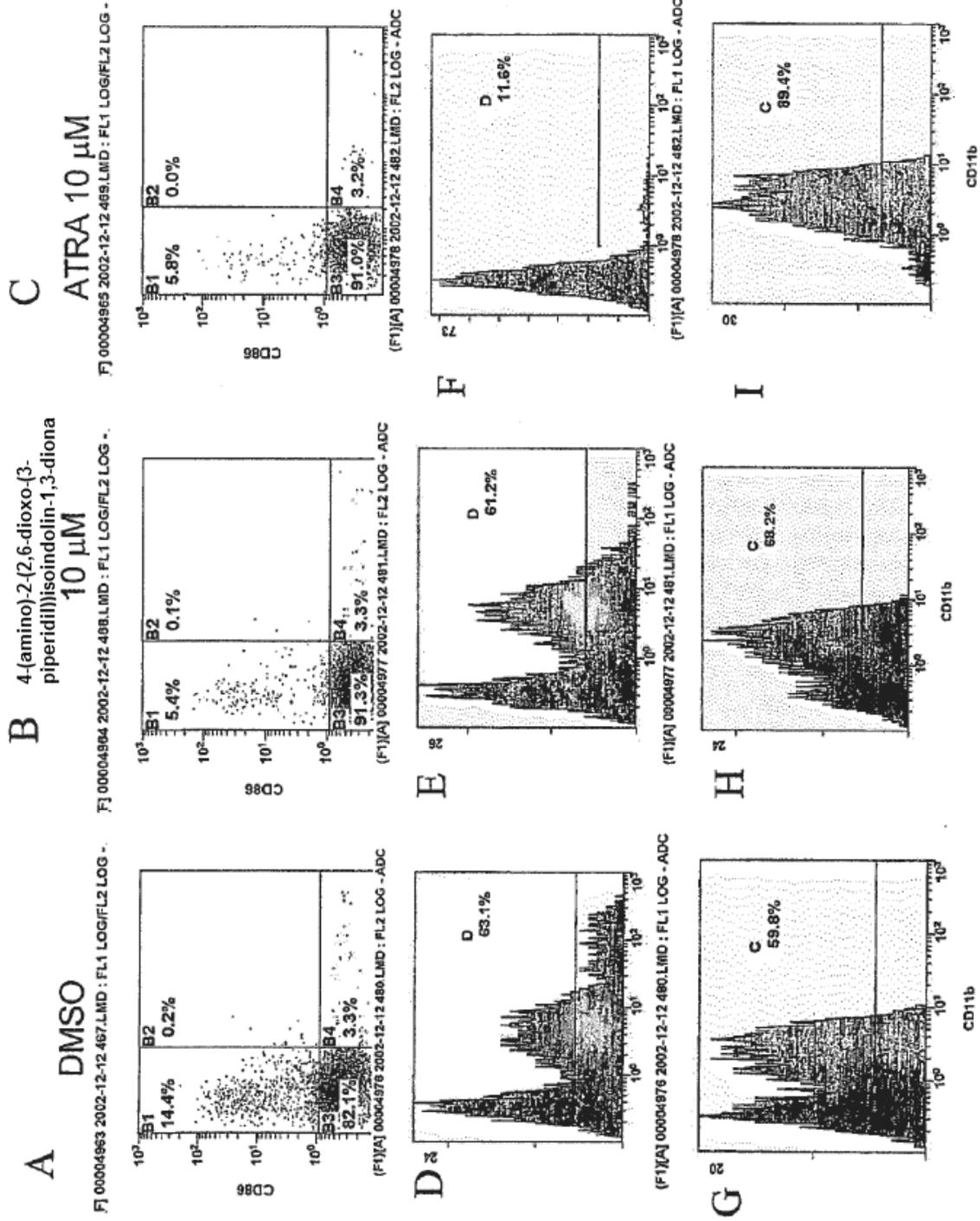


FIG. 32