(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 757 508**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0789 (2010.01)
A61K 38/28 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2014 E 14172624 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2816107**

(54) Título: **Método para expandir células madre hematopoyéticas**

(30) Prioridad:

17.06.2013 US 201313919241

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2020

(73) Titular/es:

GAO, HONG (50.0%)
48 Maplewood Avenue
Newton, MA 02459, US y
ZHU, ZHENGLUN (50.0%)

(72) Inventor/es:

GAO, HONG y
ZHU, ZHENGLUN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Método para expandir células madre hematopoyéticas

Antecedentes de la invención

La hematopoyesis implica la proliferación de células madre hematopoyéticas (HSCs) y su diferenciación hasta los progenitores (p.ej., células eritroprogenitoras). Las HSCs dan lugar a células maduras de todos los linajes de los sistemas sanguíneo e inmunitario.

A lo largo del transcurso de varias décadas, se ha demostrado que múltiples factores transcripcionales específicos de linaje, tales como GATA-1 y EKLF, desempeñan papeles cruciales en la hematopoyesis/eritropoyesis. Aun así, los factores intrínsecos celulares que permiten la expansión de la hematopoyesis y la eritropoyesis siguen sin entenderse completamente. Se ha demostrado que la sobreexpresión de varios factores intrínsecos celulares, tales como WNT3a, beta-catenina, y HOXB4, conduce a una expansión significativa de HSCs en ratones. Sin embargo, su efecto sobre la expansión de HSCs humanas es limitado.

La dificultad en la expansión de HSCs humanas *ex vivo* representa un desafío importante en las aplicaciones terapéuticas basadas en HSCs humanas, p.ej., la reconstitución del sistema hematopoyético. Existe la necesidad de desarrollar un método para expandir de manera eficaz HSCs humanas.

La solicitud de patente internacional WO2012/071513 describe un método para expandir HSCs, que comprende poner en contacto tales células con algunos agentes de iARN que inhiben la expresión o la actividad de un polipéptido VentX. Gao *et al*, 2012, Journal of Biological Chemistry, 287(35):29979-29987 describe la inactivación de VentX por medio de un shARN que estimula la expansión de células CD34+ humanas *in vivo*.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el resultado inesperado de que la inhibición de VentX mediante el uso de morfolino oligonucleótidos condujo a la expansión de células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas, que son CD34+, *in vivo*.

Un aspecto de la invención se refiere a un método *ex vivo* para expandir células madre o progenitoras hematopoyéticas. El método descrito en la presente memoria incluye dos etapas: (1) aislar células madre o progenitoras hematopoyéticas de un sujeto (p.ej., un ser humano y un mamífero no humano), y (2) poner en contacto las células aisladas con un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido VentX, por lo que se incrementa la expansión de las células. La etapa de aislamiento se puede llevar a cabo obteniendo del sujeto una muestra biológica que contiene células madre o progenitoras hematopoyéticas (p.ej., médula ósea, sangre periférica, y sangre de cordón umbilical) y recogiendo las células de la muestra biológica.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para expandir células madre o progenitoras hematopoyéticas en un sujeto administrando un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido VentX al sujeto, por lo que se expanden las células madre o progenitoras hematopoyéticas en el sujeto.

El agente es un agente de ARN de interferencia (iARN) que selecciona como objetivo un mARN transcrito a partir del gen, que incluye su área sin traducir de 5'.

Según la presente invención, el agente es un agente de iARN que es un morfolino oligonucleótido que tiene una secuencia SEQ ID Nº:68 o SEQ ID Nº:69.

El agente de iARN puede contener además una segunda cadena que tiene una segunda secuencia de nucleótidos complementaria a la primera secuencia.

En otro aspecto, se describe además un método para tratar un síndrome de insuficiencia de médula ósea primario o secundario. El método incluye tres etapas: (1) aislar células madre o progenitoras hematopoyéticas de un sujeto que tiene un síndrome de insuficiencia de médula ósea primario o secundario, (2) poner en contacto las células madre o progenitoras hematopoyéticas aisladas con un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido VentX, por lo que se incrementa la expansión de las células madre o progenitoras hematopoyéticas, y (3) administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células madre o progenitoras hematopoyéticas que se han sometido a expansión. La etapa de aislamiento se puede llevar a cabo obteniendo una muestra biológica que contiene células madre o progenitoras hematopoyéticas del sujeto y recogiendo las células de la muestra biológica. El síndrome de insuficiencia de médula ósea primario o secundario puede ser anemia, síndrome mielodisplásico, o una complicación de la quimioterapia o la radioterapia.

Más en particular, un objetivo de la invención es un morfolino oligonucleótido que inhibe la expresión de un polipéptido VentX, para el uso en el tratamiento del síndrome de insuficiencia de médula ósea primario o secundario en un sujeto, en el que el morfolino oligonucleótido tiene una secuencia SEQ ID Nº:68 o SEQ ID Nº:69.

Los detalles de uno o más ejemplos de la invención se exponen en la descripción siguiente. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

VentX, un factor transcripcional homeobox humano, es un antagonista nuevo de la señalización de Wnt canónica. VentX tiene las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de SEQ ID Nº: 1 y 4 (mostradas a continuación), respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de VentX (SEQ ID Nº: 1):

mrlssspprg pqqlssfgsv dwlsqsscsg pthtprpadf slgslpgpgq tsgareppqa
vsikeaagss nlpapertma glskepntlr aprvrtaftm eqvrtlegvf qhhqylsple
rkrlaremql sevqiktwfq nrrmkhkrqm qdpqlhspfs gslhappafy stssglangl
qllcpwapls gpqalmlppg sfwglcqvaq ealasagasc cgqplashpp tpgrpslgpa
lstgprglca mpqtgdaf (Subrayado: aa. 91-151/homeodominio, SEQ ID Nº: 3)

La secuencia de nucleótidos de VentX (SEQ ID Nº: 4):

acctggccgc c atgcgcctc tcctcctccc cacctcgtgg cccgcagcag ctctccagct
ttggctccgt ggactggctc tcccagagca gctgctcagg gccgacccac acccccaggc
ctgccgactt ctccctgggg agcctccctg gcccaggcca gacatccggc gcccgggagc
cccctcaggc cgtcagcatc aaggaggccg ccgggtcctc aaatctgcct gcgccggaga
ggaccatggc cgggttgagt aaggagccaa ataccttgcg ggcccccccgt gtccgcacag
ccttcaccat ggagcaggtc cgcaccttgg agggcgtctt ccagcaccac cagtacctga
gccctctgga gcggaagagg ctggccaggg agatgcagct ctcagaggtc cagataaaaa
cctggtttca gaatcgccgc atgaaacaca aacggcaaat gcaggacccc cagctgcaca
gccccttctc ggggtctctc catgcgcccc cagctttcta ctcaacgtct tctggccttg
ccaatggcct gcagctgctg tgcccttggg cacccctgtc cgggccccag gctctgatgc
tgccccctgg ctccttctgg ggtctctgcc aagtggcaca agaggccctg gcatctgcgg
gagcttcctg ctgcgggcag cctctggcgt cccacccccc taccccaggc cggccttcgc
tgggaccagc cctgtccacg gggccccggg gcctgtgtgc tatgccacag acgggggatg
cattttgagg aggcacctct gactcccaca ctcgcggtct tgctgatcgc acctggctcc
tacctggagg actcagttgt tctgtttaca tcctggtggc acctctcacc ctgacccaca
caaaggttct ggagattact ggagaatata tataaatata tatatgtacg tatatatgta
aatacacata tacgtatata taaatatata tatacatatg tgtgtgtata tatatatata
ttttttttt ttttttttt tttgagacgg agtgttgctc tgtcacccag gctggagtgc
aatgacgcaa tctcggctca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcga ttctccagcc
tcagcctccc gagtagctgg gattacagac acccgccacc acgcccggct aattttttct
atttttagta gaaatggggt ttcaccatgt tagccaggct ggtctcaaac tcctgaccct
gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcatgagc cactgcaccc
ggccctgaga atatatttat taaagccacc tcttcactga aagttaccga aagagtcggt
ttaggaagga aacgaagggt cagtgaacag agtcaaatgc agaagtgggc ttgtcatggg
tagggctttc ggcgtacgat aaaaggatca tttgtttttt aaaaggggtt ggaaaaactg
gttttccagt tggaaacagt aaaggttgta agctttgtgt gtacaaaaga aaacagggaa

tgcaggtgtg tttatagcgt tgtggttcaa gtccctctta acaagaactc caaagctgga
aagcaggagg gaacaaaggt gaacatgaag gcgaggatgc tggggccctg cagtgcgctc
taggctgtgc gtgagccggg actgtaccca cagcttgctg agggctgctc ttcttgggcc
agggaaagca gggcagccgg gacctgcggc tgtgcctgga ctgaagctgt cccgcaggtc
cccaccctcc aacacgtgct cacctgtccc cctcctcgca gcagcctcgg gacaaaacaa
tgactcaagg acagcacttc tcgcagaagg tctggaagtg cccagaatgg gaggcacgga
agcccctccc ggggaggact cccgcgttga tggaccgttc ttggtgcaga ctcctgactg
cgtgcatgaa acctgagaca agtgcaattc cttccatgtc gccccagagt gcccaggagg
caggcagtgc ggggtgccca ggcagacggg ttcagcctgc agaactggag gcgacctgtg
aaacccaccc gggcacccca acaggaacag aagcgtggtc ctgcggctgc gtccccagcg
agtttcactt tccccttgct cgtttctccc ttgttgtaag tgtttacaac tggcatgtgc
ttttaaacgt caggtaagag gggaacagct gctgtacatc gtcctggcga gtgacaatgt
gacagaagcc tgggcgaggc cctcggaggg cagcagctgg acaggggcta ctgggtttgg
cctggacagc actgatttgt ggatgtggat gggggcacgt tgtccgtgat aaaagtacaa
gtgcccctca caaaaaaaaa aaaaaaaa (Subrayado: secuencia codificante nt 12 a 788, SEQ ID Nº: 2)

VentX es un homólogo humano de la proteína homeobox Xom de vertebrados Xenopus de la ruta de señalización de BMP4. Es un nuevo represor de Wnt asociado a LEF/TCF y un supuesto inhibidor tumoral. Además, controla la expresión de genes cruciales implicados en la proliferación y la diferenciación celular, tales como p53/p16 y c-myc.

VentX se expresa con regulación en todos los linajes de células hematopoyéticas, y su expresión se correlaciona inesperadamente de manera inversa con la clonogenicidad y la expansión de células madre o progenitoras hematopoyéticas.

Así, en la presente memoria se describe un método para incrementar la expansión de células madre o progenitoras hematopoyéticas que incluye una etapa de inhibir de manera transitoria VentX en las células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas *ex vivo*.

Los inhibidores de VentX incluyen un agente de iARN, un ARN inverso (asARN), una ribozima, y un anticuerpo.

Un agente de iARN, p.ej., un ARN de interferencia corto bicatenario (siARN), un ARN de horquilla corto (shARN), o un micro-ARN monocatenario (miARN), provoca una degradación catalítica de mARNs específicos. Se puede usar para reducir o inhibir la expresión de un gen. Tiene una complementariedad de secuencias hacia un ARN objetivo suficiente para inducir la degradación del ARN objetivo por medio de la interferencia con el ARN (ARNi), un proceso específico o selectivo de secuencia mediante el que se inhibe una molécula objetivo (p.ej., un gen, proteína o ARN objetivo). Un agente de iARN también puede ser un ADN transcribible hasta un ARN.

También se pueden usar otras moléculas similares que funcionan por medio de los mecanismos asociados al ARNi, que incluyen los siARNs modificados químicamente (p.ej., morfolino oligonucleótidos o morfolino oligonucleótidos inversos) y la expresión controlada mediante vectores de ARN en horquilla que se escinden después hasta siARN.

Las moléculas o construcciones de ácido nucleico que son útiles como se describen en la presente memoria incluyen moléculas de dsARN (p.ej., siARN) que comprenden 16-30 nucleótidos en cada cadena, en las que una de las cadenas es sustancialmente idéntica, p.ej., al menos un 80% (o más, p.ej., un 85%, 90%, 95%, o 100%) idéntica, p.ej., que tiene 3, 2, 1, o 0 nucleótido(s) emparejado(s) de manera incorrecta, a una región objetivo del mARN de VentX, que tiene una secuencia de ADN complementaria de SEQ ID Nº:4, y la otra cadena es complementaria a la primera cadena. Las moléculas de dsARN se pueden sintetizar químicamente, se pueden transcribir *in vitro* a partir de un molde de ADN, o se pueden transcribir *in vivo*, p.ej., a partir de shARN.

Los ácidos nucleicos inversos son útiles para inhibir VentX. Tales moléculas de ácido nucleico inverso son moléculas de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos es complementaria a la totalidad o parte de un mARN que codifica un VentX. Una molécula de ácido nucleico inverso puede ser inversa a la totalidad o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se describe en la presente memoria. Las regiones no codificantes ("regiones sin traducir de 5' y 3'") son las secuencias de 5' y 3' que flanquean la región codificante, y no se traducen hasta aminoácidos.

Los agentes descritos anteriormente para inhibir VentX incluyen los morfolino oligonucleótidos. Los morfolino oligonucleótidos tienen bases con anillos de morfolina en vez de restos de carbohidratos de ribosa o desoxirribosa, y uniones fosforodiamidato no iónicas en vez de los fosfatos aniónicos de ADN y ARN. Los morfolino oligonucleótidos se pueden sintetizar con métodos conocidos en la técnica, u obtenerlos comercialmente, p.ej., de Gene Tools, LLC.

Las expresiones "ARN" o "molécula de ARN" o "molécula de ácido ribonucleico" se refieren a un polímero de ribonucleótidos. Las expresiones "ADN" o "molécula de ADN" o "molécula de ácido desoxirribonucleico" se refieren a

un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y ARN se pueden sintetizar de manera natural (p.ej., mediante replicación del ADN o transcripción del ADN, respectivamente). El ARN se puede modificar de manera postranscripcional. El ADN y ARN también se pueden sintetizar químicamente o modificar químicamente. El ADN y ARN puede ser monocatenario (es decir, ssARN y ssADN, respectivamente) o multicatenario (p.ej., bicatenario, es decir, dsARN y dsADN, respectivamente).

El polinucleótido se puede administrar mediante inyección directa de una molécula de ácido nucleico "desnuda" (patente de EE.UU. 5.679.647) o una molécula de ácido nucleico formulada en una composición con otro u otros agentes que facilitan la absorción de la molécula de ácido nucleico por parte de la célula, tales como saponinas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.739.118) o poliaminas catiónicas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.837.533); mediante bombardeo con micropartículas (por ejemplo, por medio del uso de una "pistola de genes"; Biolistic, Dupont); revistiendo la molécula de ácido nucleico con lípidos, receptores de la superficie celular o agentes de transfección; mediante encapsulación de la molécula de ácido nucleico en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; mediante la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un péptido que se sabe que entra en el núcleo; o mediante la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor, que se puede usar para seleccionar como objetivo tipos de células que expresan de manera específica los receptores. De manera alternativa, se puede preparar un conjugado molecular compuesto de un vector plasmídico o de otro tipo unido a poli-L-lisina mediante fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que se puede unir a un receptor de las células objetivo (Cristiano, *et al*., 1995, J. Mol. Med. 73:479).

Se puede formar un complejo ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar endosomas, que posibilita que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica; o la molécula de ácido nucleico se puede destinar a la absorción específica en células y la expresión *in vivo* seleccionando como objetivo un receptor específico. Además, se describe un método eficaz para la introducción, expresión y acumulación de oligonucleótidos inversos en el núcleo de la célula en la patente de EE.UU. 6.265.167, que posibilita que el oligonucleótido inverso se hibride con el mARN codificante en el núcleo, y de ese modo impide que el oligonucleótido inverso se procese o transporte al citoplasma. La presente descripción contempla también la introducción intracelular de la molécula de ácido nucleico y la incorporación posterior dentro del ADN de la célula hospedadora para la expresión mediante recombinación homóloga conocida en la técnica.

El polinucleótido también se puede incorporar en un vector de expresión adecuado. Se conocen en la técnica varios vectores adecuados para las aplicaciones de terapia génica (véase, por ejemplo, Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy, Eaton Publishing Co. (2000)).

El vector de expresión puede ser un vector plasmídico. Los métodos para generar y purificar ADN plasmídico son rápidos y sencillos. Además, el ADN plasmídico en general no se integra en el genoma de la célula hospedadora, sino que se mantiene en una localización episómica en forma de una entidad discreta, lo que elimina los problemas de genotoxicidad que puede generar la integración cromosómica. Una diversidad de plásmidos están fácilmente disponibles comercialmente en la actualidad, e incluyen los derivados de Escherichia coli y Bacillus subtilis, y muchos están diseñados especialmente para el uso en los sistemas mamíferos. Los ejemplos de plásmidos que se pueden usar en la presente descripción incluyen, pero sin limitación, los vectores de expresión eucarióticos pRc/CMV (Invitrogen), pCR2.1 (Invitrogen), pAd/CMV y pAd/TR5/GFPq (Massie *et al*., 1998 Cytotechnology 28:53-64). En una realización ejemplar, el plásmido es pRc/CMV, pRc/CMV2 (Invitrogen), pAdCMV5 (IRB-NRC), pcDNA3 (Invitrogen), pAdMLP5 (IRB-NRC), o PVAX Invitrogen).

El vector de expresión puede ser un vector viral. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero sin limitación, los derivados de retrovirus deficientes de replicación, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociado. Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adeno-asociado son actualmente el sistema de administración de genes recombinantes de elección para la transferencia de oligonucleótidos exógenos o genes *in vivo*, especialmente a seres humanos. Estos vectores proporcionan una administración eficaz de genes en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del hospedador. Un prerrequisito importante para el uso de retrovirus es asegurar la seguridad de su uso, en particular con respecto a la posibilidad de la diseminación de un virus de tipo natural en la población celular. Los retrovirus, a partir de los cuales pueden derivar los vectores retrovirales, incluyen, pero sin limitación, el virus de la leucemia murina de Moloney, virus de la necrosis esplénica, virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia del mono gibón, virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus de sarcoma mieloproliferativo, y virus de tumor mamario. Los retrovirus específicos incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son muy conocidos para los expertos en la técnica.

Las moléculas de siARN, miARN, y asARN se pueden diseñar mediante métodos muy conocidos en la técnica. Estas moléculas de ARN con homología suficiente para proporcionar una especificidad de secuencia requerida para degradar exclusivamente cualquier ARN se pueden diseñar mediante el uso de un programa conocido en la técnica, que incluye los mantenidos en páginas de Internet de Ambion, Inc. y Dharmacon, Inc (véase, siDESIGN CENTER) y "The siRNA User Guide", disponible en Internet en mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html.

Los morfolino oligonucleótidos también se pueden administrar a un sujeto por medio de inyección intravenosa, intraperitoneal, o localizada mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, p.ej., Vivo-Morpholinos (Gene Tools, LLC).

El nivel de un polipéptido o un ácido nucleico de VentX en una muestra de ensayo se puede determinar obteniendo una muestra de ensayo de un sujeto de ensayo y poniendo en contacto la muestra de ensayo con un compuesto o un agente capaz de detectar un polipéptido o un ácido nucleico de VentX (p.ej., sonda de mARN o ADN genómico). La "muestra de ensayo" incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. El nivel de expresión del gen VentX se puede medir de varias maneras, que incluyen medir el mARN codificado por el gen VentX; medir la cantidad de polipéptido codificado por el gen VentX; o medir la actividad del polipéptido codificado por el gen VentX.

El nivel del mARN que corresponde al gen VentX en una célula se puede determinar mediante formatos *in situ* e *in vitro*. El mARN aislado de una muestra de ensayo se puede usar en ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen análisis de Southern o Northern, análisis de PCR, y matrices de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de los niveles de mARN implica poner en contacto el mARN aislado con una sonda de ácido nucleico que puede hibridar al mARN codificado por el gen VentX. La sonda puede ser un ácido nucleico de VentX de longitud completa, tal como el ácido nucleico de SEQ ID Nº: 4 o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 10 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar de manera específica en condiciones rigurosas al mARN de VentX o al ADN genómico.

En un formato, se inmoviliza el mARN (o el cADN preparado a partir de él) sobre una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, haciendo pasar el mARN aislado por un gel de agarosa y transfiriendo el mARN del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En otro formato, las sondas se inmovilizan en una superficie y el mARN (o cADN) se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, en una matriz de un chip de genes. Un técnico experto puede adaptar los métodos de detección de mARN conocidos para el uso en la detección del nivel de mARN codificado por el gen VentX.

El nivel de mARN (o cADN preparado a partir de él) en una muestra codificado por el gen VentX se puede determinar con la amplificación del ácido nucleico, p.ej., mediante PCR estándar (patente de EE.UU. nº 4.683.202), RT-PCR (Bustin S. J Mol Endocrinol. 25:169-93, 2000), PCR cuantitativa (Ong Y. *et al.*, Hematology. 7:59-67, 2002), PCR en tiempo real (Ginzinger D. Exp Hematol. 30:503-12, 2002), y PCR *in situ* (Thaker V. Methods Mol Biol. 115:379-402, 1999), o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Tal como se usa en la presente memoria, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar con las regiones de 5' o 3' de un gen (cadenas más y menos, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta en medio. En condiciones adecuadas y con reactivos adecuados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para los métodos *in situ*, se puede preparar una muestra celular o tisular e inmovilizarla en un soporte, tal como un portaobjetos de vidrio, y después ponerla en contacto con una sonda que puede hibridar al ADN genómico en los cromosomas o al mARN que codifica el polipéptido VentX.

Se puede usar una diversidad de métodos para determinar el nivel de un polipéptido VentX. En general, estos métodos incluyen poner en contacto un agente que se une selectivamente al polipéptido, tal como un anticuerpo, para determinar el nivel del polipéptido en una muestra. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o, más preferiblemente, monoclonales. También se puede usar un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (p.ej., Fab o $F(ab')_2$). En una realización preferida, el anticuerpo alberga un marcador detectable. El término "marcado", con respecto a la sonda o al anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o del anticuerpo uniendo físicamente una sustancia detectable a la sonda o al anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o del anticuerpo mediante la reactividad con una sustancia detectable. Por ejemplo, un anticuerpo con una región Fc de conejo se puede marcar indirectamente mediante el uso de un segundo anticuerpo dirigido contra la región Fc de conejo, en el que el segundo anticuerpo se acopla con una sustancia detectable. En la presente memoria se proporcionan ejemplos de sustancias detectables. La sustancia o marcadores detectables adecuados incluyen radioisótopos (p.ej., ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{3}H, o ^{32}P), enzimas (p.ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, luciferasa, o β-galactosidasa), restos fluorescentes o proteínas (p.ej., fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP, o BFP), o restos luminiscentes (p.ej., nanopartículas Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA).

Los métodos de detección se pueden usar para detectar un polipéptido VentX en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un polipéptido VentX incluyen ELISAs, inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, EIA, RIA, y análisis de transferencia de Western. Las técnicas *in vivo* para la detección de un polipéptido VentX incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-VentX marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con una sustancia detectable como se describió anteriormente. La presencia y la posición de la sustancia detectable en un sujeto se puede detectar mediante técnicas habituales de imagenología.

Un "sujeto" se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de animales no humanos, de los que se pueden obtener las HSCs anteriormente mencionadas, incluyen, pero sin limitación, primate, perro, roedor, conejillo de Indias, gato, caballo, vaca, oveja, y cerdo. De hecho, se contemplan las mascotas, animales de granja, animales experimentales, y animales de modelos de enfermedades. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o un animal de modelo de enfermedad.

La descripción se caracteriza además por un método para tratar afecciones asociadas con un nivel anormalmente elevado de un polipéptido VentX en las células madre o progenitoras hematopoyéticas con una cantidad eficaz de células madre o progenitoras hematopoyéticas expandidas preparadas de la manera descrita anteriormente o con una cantidad eficaz de un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido VentX. Estas afecciones incluyen BMSF primario o secundario, anemia (p.ej., anemia resistente al tratamiento), síndrome mielodisplásico (p.ej., síndrome mielodisplásico hipocelular), neoplasias malignas del sistema hematopoyético (p.ej., leucemia y linfoma), y lesiones de la médula ósea provocadas biológicamente (p.ej., por virus), físicamente (p.ej. por radiación), químicamente (p.ej., por toxinas y agentes quimioterápicos antineoplásicos), o ambientalmente (p.ej., mediante contaminación).

"Tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de una composición que contiene un agente (que inhibe la expresión o la actividad de VentX) o una composición que contiene células madre o progenitoras hematopoyéticas pretratadas con el agente a un sujeto, que tiene una afección (p.ej., anemia y síndrome mielodisplásico), con el fin de curar, aliviar, mitigar, remediar, retrasar el inicio de, o mejorar el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado de la enfermedad secundaria al trastorno, o la predisposición hacia el trastorno.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable, p.ej., como se describió anteriormente, en un sujeto tratado. El método de tratamiento se puede llevar a cabo *in vivo* o *ex vivo*, solo o junto con otros fármacos o terapia. Las cantidades eficaces exactas de fármaco pueden variar según el fármaco específico o la combinación del mismo a utilizar, la composición particular formulada, el modo de administración, y la edad, peso, estado del paciente, y la gravedad de los síntomas o afección a tratar. Alguien de experiencia habitual en la técnica puede determinar las dosis para un paciente particular mediante el uso de consideraciones convencionales (p.ej., por medio de un protocolo farmacológico adecuado y convencional).

Se puede administrar una o más de las composiciones descritas anteriormente a un animal (p.ej., un ser humano) para modular la expresión o la actividad de VentX o su homólogo. Un médico puede prescribir, por ejemplo, una dosis relativamente baja al principio, y posteriormente incrementar la dosis hasta que se obtiene una respuesta adecuada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá de una diversidad de factores que incluirán la actividad del agente específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, cualquier combinación de fármacos, y el grado de expresión o actividad a modular.

La eficacia del tratamiento se puede monitorizar midiendo la cantidad del mARN del gen objetivo (p.ej. mediante el uso de PCR en tiempo real) o la cantidad del polipéptido codificado por el mARN del gen objetivo (análisis de transferencia de Western). Como se conoce bien en la técnica, la dosis para un paciente depende de diversos factores, como se describió anteriormente. Las dosis variarán, pero una dosis preferida para la administración de un polinucleótido es de alrededor de 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de polinucleótido. Esta dosis se puede administrar repetidamente según sea necesario.

El polinucleótido se puede preparar en cualquier vehículo o disolución acuosa para proporcionar una composición que sea farmacéuticamente adecuada para la administración *in vivo*. Los métodos para preparar disoluciones acuosas son muy conocidos para alguien de experiencia habitual en la técnica. Preferiblemente, las disoluciones acuosas son en agua, disoluciones acuosas fisiológicamente aceptables que contienen sales y/o tampones, tales como disolución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otra disolución acuosa/tensioactivo aceptable para la administración a un animal o ser humano. Tales disoluciones son muy conocidas para una persona experta en la técnica e incluyen, pero sin limitación, agua destilada, agua desionizada, agua pura o ultrapura, disolución salina, PBS, y disoluciones que contienen tampones habituales que son compatibles con los ácidos nucleicos. La composición puede contener además cloruro sódico y glucosa o manitol para hacer que la disolución sea isotónica. La composición puede contener componentes auxiliares adecuados, tales como agentes de ajuste del pH, la osmolaridad, y la tonicidad.

El polinucleótido se puede administrar mediante el uso de dispositivos de administración poliméricos, micropartículas biodegradables, o microcápsulas conocidas en la técnica. Otra manera de llevar a cabo la absorción del polinucleótido es usar liposomas, preparados mediante métodos habituales. El polinucleótido se puede incorporar solo en estos vehículos de administración o co-incorporarlo con anticuerpos específicos del tejido. Además, la selección específica del tejido se puede llevar a cabo mediante el uso de elementos reguladores transcripcionales específicos del tejido que se conocen en la técnica.

El polinucleótido se puede administrar de manera parenteral. El término "parenteral", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a inyecciones, tales como inyecciones intravenosas, intraarteriales, intramedulares, intraóseas, e

intratecales, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

Las células madre o progenitoras hematopoyéticas expandidas se pueden formular para la administración a un paciente, por ejemplo, disociando las células (p.ej., mediante disociación mecánica) y mezclando íntimamente las células con un vehículo farmacéuticamente aceptable (p.ej., disolución salina tamponada con fosfato). Se pueden administrar a los individuos por medio de inyección o infusión.

Se pueden usar células madre o progenitoras hematopoyéticas tanto heterólogas como autólogas. En el primer caso, se debería llevar a cabo un análisis de coincidencia del HLA para evitar o minimizar las reacciones del hospedador. En el segundo caso, las células autólogas se enriquecen y se purifican de un sujeto y se almacenan para el uso posterior. Las células se pueden cultivar en presencia de células T del hospedador o injertadas *ex vivo* y se reintroducen en el hospedador. Esto puede tener la ventaja de que el hospedador reconozca las células como propias, y proporcionar mejor una reducción de la actividad de las células T.

La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un agente (que inhibe la expresión o la actividad de VentX) o una composición que contiene células madre o progenitoras hematopoyéticas pretratadas con el agente. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mezclando una cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes activos o las células madre hematopoyéticas/progenitoras y opcionalmente otros agentes activos con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede tener formas diferentes, dependiendo de la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas se pueden preparar mediante el uso de excipientes farmacéuticos y métodos de preparación convencionales. Todos los excipientes se pueden mezclar con agentes disgregantes, disolventes, agentes de granulación, humectantes, y aglutinantes.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de tales composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen en general reacciones indeseadas al administrarlos a un ser humano. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que ha sido aprobado por parte de una agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal, o que se ha listado de la farmacopea de los EE.UU., o en otra farmacopea reconocida en general para el uso en mamíferos, y más en particular en seres humanos. Las sales, ésteres, amidas, y profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a las sales (p.ej., sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos), ésteres, amidas, y profármacos que, dentro del alcance del juicio médico razonable, son adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de pacientes sin una toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica, y similares, correspondientes con una proporción razonable beneficio/riesgo, y eficaces para su uso establecido.

Un vehículo, aplicado a las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, se refiere a un diluyente, excipiente, o vehículo con el que se administra un compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. Se emplea preferiblemente agua o una disolución acuosa, disoluciones salinas, y dextrosa acuosa, y disoluciones de glicerol como vehículos, en particular para las disoluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, 18ª edición.

La dosis y la frecuencia de administración dependerá de los signos clínicos, que confirman el mantenimiento de la fase de remisión, con la reducción o ausencia de al menos uno o más, preferiblemente más de un signo clínico de la fase aguda conocido para la persona experta en la técnica. Más en general, la dosis y la frecuencia dependerán en parte de la regresión de los signos patológicos y clínicos y de los síntomas subclínicos de una afección patológica o trastorno contemplado para el tratamiento con la composición anteriormente descrita. Las dosis y el régimen de administración se pueden ajustar dependiendo de la edad, el sexo, el estado físico del paciente, así como del beneficio del conjugado y los efectos secundarios en el paciente o sujeto mamífero a tratar y el juicio del médico, como aprecian los expertos en la técnica.

Finalmente, la descripción se caracteriza por un método para administrar un gen para tratar enfermedades inmunitarias o metabólicas mediante terapia génica. Las células madre o progenitoras hematopoyéticas descritas en la presente memoria se pueden usar para expresar un polipéptido exógeno recombinante. Así, en la presente memoria se describen tales células madre o progenitoras hematopoyéticas, que contienen un ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico recombinante puede codificar un polipéptido, y las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden contener un mARN que codifica el polipéptido.

Por lo tanto, la descripción se caracteriza por un método para introducir un ácido nucleico heterólogo en un sujeto. El método incluye las etapas de expandir y transfectar células madre o progenitoras hematopoyéticas, en el que al menos una de las células madre o progenitoras hematopoyéticas incluye un ácido nucleico heterólogo, y administrar la célula a un sujeto que lo necesita. El ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido de interés.

El término "heterólogo" es un término relativo, que cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se hallan en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico que se produce de manera recombinante tiene en general dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos de manera sintética para producir un nuevo ácido nucleico

funcional, p.ej., un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. Los dos ácidos nucleicos, por tanto, son heterólogos entre sí en este contexto. Cuando se añaden a una célula, los ácidos nucleicos recombinantes también serían heterólogos respecto de los genes endógenos de la célula. Así, en un cromosoma, un ácido nucleico heterólogo incluiría un ácido nucleico que no es nativo (no se da de manera natural) que se ha integrado en el cromosoma, o un ácido nucleico extracromosómico que no es nativo (no se da de manera natural). En contraste, un fragmento translocado de manera natural de un cromosoma no se consideraría heterólogo en el contexto de esta solicitud de patente, ya que comprende una secuencia de ácido nucleico endógena que es nativa respecto de la célula mutada. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se hallan en la misma relación entre sí en la naturaleza (p.ej., una "proteína de fusión", en la que las dos subsecuencias están codificadas mediante una única secuencia de ácido nucleico). Tal proteína se puede generar mediante técnicas recombinantes.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia, p.ej., a una célula, ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se hallan en la forma nativa (que se da de manera natural) de la célula, o expresan una segunda copia de un gen nativo que se expresa por otra parte normalmente o anormalmente, se infra-expresa o no se expresa en absoluto.

Las células madre o progenitoras hematopoyéticas y los métodos anteriormente descritos se pueden usar en diversos métodos de terapia génica conocidos en la técnica. La terapia génica incluye técnicas tanto *ex vivo* como *in vivo*. De manera específica, las células madre o progenitoras hematopoyéticas anteriormente descritas se pueden modificar genéticamente *ex vivo* con un modulador oligonucleotídico o una molécula de ácido nucleico que codifica el modulador, y las células modificadas se proporcionan después a un paciente a tratar. Los cultivos celulares se pueden formular para la administración a un paciente, por ejemplo, disociando las células (p.ej., mediante disociación mecánica) y mezclando íntimamente las células con un vehículo farmacéuticamente aceptable (p.ej., disolución salina tamponada con fosfato). Las células modificadas en general son autólogas para evitar el rechazo xenogénico o alotípico. Tales métodos *ex vivo* son muy conocidos en la técnica.

Las células se pueden modificar mediante la administración del polinucleótido con el uso de técnicas como las descritas anteriormente.

Se cree que un experto en la técnica, basándose en la descripción anterior, puede utilizar la presente invención sin elaboración adicional en su grado más completo. Las siguientes realizaciones específicas, por lo tanto, se deben considerar simplemente ilustrativas, y no limitantes del resto de la descripción de ninguna manera en absoluto.

Ejemplo de Referencia 1: La expresión de VentX se regula durante la hematopoyesis y la eritropoyesis

Se obtuvieron muestras de médula ósea (M.O.) de tejido descartado de cabeza femoral tras cirugía de sustitución de cadera del Brigham and Women's Hospital, con aprobación del IRB institucional. Tras la separación con Ficoll de las células mononucleares, se enriquecieron las células CD34+ mediante el uso de un kit para progenitores $CD34^+$ con clasificación de células activada magnéticamente (Miltenyi Biotec). La pureza de las células CD34+ de M.O. fue mayor del 95%, como se determinó mediante citometría de flujo como se describe en Rizo *et al.*, 2008.

El ARN total se aisló mediante el método TRIzol, y se usó la misma cantidad de ARN para la síntesis de primera cadena de cADN con el Sistema de Síntesis de Primera Cadena SuperSript (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Para determinar el nivel de mARN de VentX, el cADN se usó después para la PCR en tiempo real de VentX con los cebadores: 5'-CCGTCAGCATCAAGGAGG-3' (SEQ ID Nº: 19) y 5'-CTGGACCTCTGAGAGCTGC-3' (SEQ ID Nº: 20). La PCR en tiempo real se llevó a cabo además con SYBR Green en un sistema LightCycler® 480 (Sistema de PCR en Tiempo Real 480; Roche).

Los resultados muestran que la expresión de VentX se elevó durante la maduración de eritrocitos. De manera más específica, la expresión de VentX fue insignificante en las células CD34+CD38-, se estimuló significativamente en las células CD34+CD38+, y se elevó adicionalmente en las células progenitoras de linaje mieloide, p.ej., progenitores megacariocíticos-eritroides (MEPs), progenitores de granulocitos-macrófagos (GMs), y progenitores mieloides comunes (CMPs). El patrón de expresión elevada de VentX durante la eritropoyesis fue el mismo que durante otros procesos hematopoyéticos, tal como durante la linfopoyesis. No hubo una diferencia significativa de expresión de VentX entre los tres subgrupos diferentes mencionados anteriormente de linaje mieloide, es decir, MEP, GM, y CMP.

Ejemplo de referencia 2: VentX regula la expansión de células CD34+ humanas *ex vivo*

Las células CD34+ de M.O. humana se obtuvieron como se describió en el Ejemplo 1. La expresión de VentX en estas células se inactivó con una aproximación de shARN basada en lentivirus.

Brevemente, se usó el vector lentiviral pHAGE-CMV-eGFPW que expresa un shARN que selecciona como objetivo VentX (pHAGE-shVentX) para la transducción de células CD34+ de médula ósea. Este vector lentiviral contiene un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) que permite la expresión simultánea de GFP para monitorizar la tasa de

transducción o para la clasificación de células. La secuencia de ADN correspondiente de shARN de VentX es SEQ ID Nº: 12 o 14.

Se usó una secuencia ineficaz de selección como objetivo de GFP (pHAGE-shGFP) como control. El empaquetamiento lentiviral se llevó a cabo en la Instalación Principal de Vectores del Centro Oncológico Dana-Farber/Harvard, y los sobrenadantes virales se almacenaron a -70 °C en alícuotas hasta su uso. Las células CD34+ se cultivaron primero en medio IMDM que contenía un 10% de FBS, factor de células madre (SCF, 100 ng/mL), ligando Flt3 (100 ng/mL), trombopoyetina (TPO, 100 ng/mL), interleucina-3 (IL-3, 10 ng/mL), e IL-6 (10 ng/mL) (PeproTech) durante 2 días, y después se transdujo con una Multiplicidad de Infección (MOI) de 5 en presencia de 4 µg/ml de polibreno. Las células positivas para GFP se clasificaron mediante un clasificador de alta velocidad FACSAria (BD Bioscience) 24 h tras la transducción (Instalación Principal de Citometría de Flujo del Instituto Oncológico Dana-Farber).

Los ensayos de células formadoras de colonias (CFCs) *in vitro* se llevaron a cabo colocando en placas células CD34+ positivas para GFP clasificadas (1×10^4 por placa) por triplicado en medio de metilcelulosa completo (Methocult GF, H4434; Stem Cell Technologies), que contiene una mezcla de citocinas humanas recombinantes (SCF, IL-3, GM-CSF, y eritropoyetina). Las colonias se contaron tras 14 días de incubación a 37 °C y se clasificaron según los criterios habituales.

Para el ensayo de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC), las células positivas para GFP transducidas se clasificaron en células de fibroblastos murinos M2-10B4 en diluciones limitantes de 30 a 900 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Los cultivos se alimentaron semanalmente con un medio nuevo. Después de 5 semanas de cultivo, se transfirieron todas las células de los pocillos a placas Petri de 35 mm en el medio de metilcelulosa completo mencionado anteriormente. Después de 2 semanas adicionales de cultivo, los pocillos se puntuaron como positivos o negativos para proporcionar la frecuencia de LTC-IC.

Los resultados muestran que las tasas de transducción de pHAGE-shVentX y pHAGE-shGFP fueron de alrededor del 20%. Mediante el uso de la aproximación de PCR cuantitativa, se determinó que la eficacia de la inactivación de VentX en las células CD34+ transducidas con pHAGE-shVentX fue de alrededor del 30%. Las células transducidas positivamente se colocaron en placas en cultivos líquidos sin estroma complementados con citocinas, y se contó el número de células semanalmente hasta 4 semanas. La representación de los recuentos semanales de células de los cultivos semi-despoblados muestra que la inactivación de la expresión de VentX en las células CD34+ condujo a un incremento de ~5 veces en el número total de células en comparación con las células de control de tres experimentos independientes después de cultivar las células durante 4 semanas.

Como se determinó mediante el ensayo de células formadoras de colonias (CFC), la inactivación de VentX dio como resultado un incremento de ~2 veces en la formación de colonias BFU-E/CFU-E, CFU-GM y CFU-G/CFU-M. El número total de células de la progenie se incrementó alrededor de ~3 veces basándose en el ensayo de CFC. Esta inactivación estimuló la expansión de todos los linajes de células hematopoyéticas, especialmente la formación de colonias de linaje eritroide. De manera sistemática, la frecuencia de LTC-IC se incrementó ~3 veces en las células CD34+ transducidas con shVentX. Además, esta inactivación condujo a un incremento del 30% sobre el porcentaje de células CD34+ en el cultivo líquido *ex vivo*.

Un análisis FACS a lo largo del tiempo reveló que la inactivación de VentX ayudó a conservar la población de células CD34+ hasta 4 semanas. Además, incrementó la población de las células CD34+CD38- más primitivas. En resumen, la inactivación de VentX ayudó a mantener las mezclas de células CD34+ y a estimular la expansión de las células CD34+.

Ejemplo de referencia 3: La inactivación transitoria de VentX mediante un ARN de interferencia corto (siARN) estimula la expansión de las células CD34+

Las células CD34+ de M.O. humana se obtuvieron como se describió en el Ejemplo 1. La expresión de VentX en estas células se inactivó mediante el uso de una aproximación de siARN. De manera más específica, los oligonucleótidos cortos que seleccionan como objetivo VentX, siVentX, se transfectaron en las células CD34+ de M.O. anteriormente mencionadas por medio de electroporación mediante el uso del kit Nucleofector para células CD34+ humanas (Lonza) según las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se dispersaron 1×10^6 células CD34+ en 100 µl de disolución Nucleofector con 0,5 nmol de siARN de VentX (SEQ ID Nº: 5) o siARN de GFP ineficaz. La electroporación de estas células se llevó a cabo mediante el uso del dispositivo Nucleofector II (Lonza). Las células sometidas a electroporación se incubaron durante la noche con 1 ml de medio IMDM precalentado que contenía un 10% de FBS y las citocinas anteriormente mencionadas.

Los resultados, basados en la RT-PCR cuantitativa, muestran un ~70% de inactivación de VentX en las células CD34+ mediante la transfección de siARN. De manera coherente con la aproximación mediada por lentivirus anteriormente mencionada, la inactivación transitoria de VentX en las células CD34+ además condujo a una expansión de ~2 veces de HSCs en comparación con las células transfectadas con siGFP durante un cultivo de 2 semanas. De forma similar, las células transfectadas con siVentX mostraron un incremento en el porcentaje de células CD34+. El ensayo de CFC muestra además que la inactivación transitoria de VentX dio como resultado un

incremento de ~2 veces en la formación de colonias BFU-E/CFU-E y de colonias CFU-GM, y en el número total de células de la progenie. En resumen, esta aproximación de siARN fue tan eficaz como la aproximación de shARN basada en lentivirus anteriormente mencionada.

Ejemplo de Referencia 4: La sobreexpresión de VentX bloquea la expansión de células CD34+.

Las células CD34+ de M.O. humana se obtuvieron como se describió en el Ejemplo 1. Estas células se transfectaron con plásmido pCS2-GFP o pCS2-GFPVentX mediante el uso del kit Nucleofector para células CD34+ humanas (Lonza) como se describió anteriormente. Las células positivas para GFP se clasificaron mediante un clasificador de alta velocidad FACSAria después de transfectarlas durante 24 horas.

Los resultados muestran que la formación de colonias de células CD34+ se eliminó en gran medida mediante la expresión forzada de VentX. Además, la expansión mediada por StemRegenin 1 (SR1) de células CD34+ humanas se bloquea mediante la sobreexpresión de VentX.

Obsérvese que StemRegenin 1 (SRI) es un antagonista de receptores de hidrocarburos de arilo. Los resultados muestran además que SR1 inhibió la expresión de VentX en las células CD34+, y la expansión incrementada de estas células CD34+. Así, la inhibición de VentX es necesaria para la expansión de las células CD34+.

Ejemplo 5: VentX regula la expansión de células CD34+ *in vivo.*

Para determinar si VentX estimula la expansión de células CD34+ *in vivo*, se adquirieron ratones NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ de ocho semanas de edad (habitualmente conocidos como NOD scid gamma; NSG) de Jackson Laboratory y se mantuvieron en condiciones exentas de patógenos específicos. Antes de los trasplantes, se irradió a los ratones de manera subletal con 100 Rads. Se transdujeron alrededor de 1×10^6 células CD34+ con lentivirus con shARN hacia VentX o GFP. A las 24 h tras la transducción, se inyectaron todas las células (1×10^6, con ~20% de células positivas para GFP) o las células transducidas positivamente (2×10^4, todas positivas para GFP) en los ratones receptores. Las células CD45+ humanas se analizaron con FACS de la médula ósea de los ratones receptores. Para el trasplante secundario, la médula ósea de los ratones receptores primarios quiméricos se inyectó en ratones NSG receptores secundarios sin purificación adicional de células humanas.

Los resultados muestran que la tasa de injerto de células humanas se incrementó alrededor de 1,5~2 veces en las células CD34+ transducidas con shVentX en comparación con las células CD34+ transducidas con shGFP. En particular, la inactivación de VentX permitió el desarrollo de todos los linajes de células hematopoyéticas. El desarrollo del linaje mieloide (células CD14+) pareció estar ligeramente alterado en comparación con los otros linajes.

Dado que la tasa de transducción lentiviral de las células CD34+ fue solamente de alrededor del 20%, para explorar adicionalmente el efecto de la inactivación de VentX sobre la expansión de HSCs, las células CD34+ transducidas positivamente se purificaron y después se trasplantaron en ratones NSG. Trece semanas tras el trasplante, se determinó el porcentaje de células $CD45^+$ humanas mediante análisis FACS. Sorprendentemente, el porcentaje de células $CD45^+$ humanas se incrementó hasta 20 veces en las células CD34+ transducidas con shVentX en comparación con las células CD34+ transducidas con shGFP.

Para examinar el efecto de VentX sobre el injerto a largo plazo de células CD34+ humanas, se llevaron a cabo experimentos de trasplante secundario. Mientras ningún ratón con las células CD34+ transducidas con shGFP de control muestra un injerto secundario detectable, dos ratones con células CD34+ transducidas con shVentX muestran un injerto de células humanas positivas (0,25% y 0,28%, respectivamente).

Un morfolino oligonucleótido anti-VentX, es decir, 5'-TACTCAACCCTGACATAGAGGGTAA-3' (VentX MO; SEQ ID Nº:68) o 5'-GAGCCCGGTTTGCATACACGGCTAA-3' (VentX MO-2; SEQ ID Nº:69), y un morfolino oligonucleótido de control se sometieron a electroporación en células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano como se describió anteriormente. Las células se inyectaron después en ratones NSG, también como se describió anteriormente. Los ratones se sacrificaron a las 8 semanas tras la inyección, y el porcentaje de células $CD45^+$ humanas se analizó mediante FACS como se describió anteriormente. Sorprendentemente, el morfolino oligonucleótido anti-VentX condujo a un incremento del 50% del porcentaje de células $CD45^+$ humanas en comparación con el oligonucleótido de control.

Ejemplo de referencia 6: VentX selecciona como objetivo los reguladores del ciclo celular en las células CD34+

VentX es un regulador de la ruta de señalización de Wnt y de varios componentes de la maquinaria del ciclo celular, tales como Ciclina D1, p21 y $p16^{ink4a}$. Se determinaron los niveles de p21, $p16^{ink4}$, C-myc, y Ciclina D1 mediante el uso de PCR cuantitativa con los siguientes cebadores:

p21: 5'-AAACTTTGGAGTCCCCTCAC-3' (SEQ ID Nº: 21) y 5'-AAAGGCTCAACACTGAGACG-3' (SEQ ID Nº: 22);

p16: 5'-CTTCCCCCACTACCGTAAAT-3' (SEQ ID Nº: 23) y 5'-TGCTCACTCCAGAAAACTCC-3' (SEQ ID Nº: 24);

C-myc: 5'-CAGCTGCTTAGACGCTGGATT-3' (SEQ ID Nº: 25) y 5'-GTAGAAATACGGCTGCACCGA-3'; (SEQ ID Nº: 26) y

Ciclina D1: 5'-GTTCGTGGCCTCTAAGATG-3' (SEQ ID Nº: 27) y 5'-TTGTTCACCAGGAGCAGC-3' (SEQ ID Nº: 28).

Los resultados muestran que la sobreexpresión de VentX incrementó la expresión de p21 y $p16^{ink4a}$, pero inhibió la expresión de Ciclina D1 y C-myc en las células CD34+. Los resultados se confirmaron adicionalmente mediante una aproximación de pérdida de la función, en la que la inactivación de VentX disminuyó la expresión de p21, pero incrementó la expresión de Ciclina D1 y C-myc. También basándose en un análisis FACS, la inactivación de VentX elevó el nivel de la proteína Ciclina D1.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Gao, Hong Zhu, Zhenglun

<120> Método para expandir células madre hematopoyéticas

<130> B1819EP

<140> 13919241
<141> 17-06-2013

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Arg Leu Ser Ser Ser Pro Pro Arg Gly Pro Gln Gln Leu Ser Ser
1               5                  10                  15

Phe Gly Ser Val Asp Trp Leu Ser Gln Ser Ser Cys Ser Gly Pro Thr
            20                  25                  30

His Thr Pro Arg Pro Ala Asp Phe Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gly Pro
        35                  40                  45

Gly Gln Thr Ser Gly Ala Arg Glu Pro Pro Gln Ala Val Ser Ile Lys
    50                  55                  60

Glu Ala Ala Gly Ser Ser Asn Leu Pro Ala Pro Glu Arg Thr Met Ala
65                  70                  75                  80

Gly Leu Ser Lys Glu Pro Asn Thr Leu Arg Ala Pro Arg Val Arg Thr
                85                  90                  95

Ala Phe Thr Met Glu Gln Val Arg Thr Leu Glu Gly Val Phe Gln His
            100                 105                 110

His Gln Tyr Leu Ser Pro Leu Glu Arg Lys Arg Leu Ala Arg Glu Met
        115                 120                 125

Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met
    130                 135                 140

Lys His Lys Arg Gln Met Gln Asp Pro Gln Leu His Ser Pro Phe Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Ser Leu His Ala Pro Pro Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Gly Leu
                165                 170                 175

Ala Asn Gly Leu Gln Leu Leu Cys Pro Trp Ala Pro Leu Ser Gly Pro
            180                 185                 190

Gln Ala Leu Met Leu Pro Pro Gly Ser Phe Trp Gly Leu Cys Gln Val
        195                 200                 205

Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Cys Cys Gly Gln Pro
    210                 215                 220

Leu Ala Ser His Pro Pro Thr Pro Gly Arg Pro Ser Leu Gly Pro Ala
225                 230                 235                 240

Leu Ser Thr Gly Pro Arg Gly Leu Cys Ala Met Pro Gln Thr Gly Asp
                245                 250                 255

Ala Phe
```

<210> 2
<211> 777
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
<400> 2

```
atgcgcctct cctcctcccc acctcgtggc ccgcagcagc tctccagctt tggctccgtg       60

gactggctct cccagagcag ctgctcaggg ccgacccaca cccccaggcc tgccgacttc      120

tccctgggga gcctccctgg cccaggccag acatccggcg cccgggagcc ccctcaggcc      180

gtcagcatca aggaggccgc cgggtcctca aatctgcctg cgccggagag gaccatggcc      240

gggttgagta aggagccaaa taccttgcgg gccccccgtg tccgcacagc cttcaccatg      300

gagcaggtcc gcaccttgga gggcgtcttc cagcaccacc agtacctgag ccctctggag      360

cggaagaggc tggccaggga gatgcagctc tcagaggtcc agataaaaac ctggtttcag      420

aatcgccgca tgaaacacaa acggcaaatg caggaccccc agctgcacag ccccttctcg      480

gggtctctcc atgcgccccc agctttctac tcaacgtctt ctggccttgc caatggcctg      540

cagctgctgt gcccttgggc acccctgtcc gggccccagg ctctgatgct gccccctggc      600

tccttctggg gtctctgcca agtggcacaa gaggccctgg catctgcggg agcttcctgc      660

tgcgggcagc ctctggcgtc ccacccccct accccaggcc ggccttcgct gggaccagcc      720

ctgtccacgg ggccccgggg cctgtgtgct atgccacaga cgggggatgc attttga         777
```

<210> 3
<211> 61
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 3

```
Ala Pro Arg Val Arg Thr Ala Phe Thr Met Glu Gln Val Arg Thr Leu
1               5                   10                  15

Glu Gly Val Phe Gln His His Gln Tyr Leu Ser Pro Leu Glu Arg Lys
            20                  25                  30

Arg Leu Ala Arg Glu Met Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp
        35                  40                  45

Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys His Lys Arg Gln Met Gln
    50                  55                  60
```

<210> 4
<211> 2428
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
acctggccgc catgcgcctc tcctcctccc cacctcgtgg cccgcagcag ctctccagct       60

ttggctccgt ggactggctc tcccagagca gctgctcagg gccgacccac acccccaggc      120

ctgccgactt ctccctgggg agcctccctg gcccaggcca gacatccggc gcccgggagc      180

cccctcaggc cgtcagcatc aaggaggccg ccgggtcctc aaatctgcct gcgccggaga      240

ggaccatggc cgggttgagt aaggagccaa ataccttgcg ggccccccgt gtccgcacag      300

ccttcaccat ggagcaggtc cgcaccttgg agggcgtctt ccagcaccac cagtacctga      360

gccctctgga gcggaagagg ctggccaggg agatgcagct ctcagaggtc cagataaaaa      420

cctggtttca gaatcgccgc atgaaacaca aacggcaaat gcaggacccc cagctgcaca      480

gccccttctc ggggtctctc catgcgcccc cagctttcta ctcaacgtct tctggccttg      540

ccaatggcct gcagctgctg tgcccttggg cacccctgtc cgggccccag gctctgatgc      600

tgccccctgg ctccttctgg ggtctctgcc aagtggcaca agaggccctg gcatctgcgg      660

gagcttcctg ctgcgggcag cctctggcgt cccacccccc taccccaggc cggccttcgc      720

tgggaccagc cctgtccacg gggccccggg gcctgtgtgc tatgccacag acgggggatg      780

cattttgagg aggcacctct gactcccaca ctcgcggtct tgctgatcgc acctggctcc      840

tacctggagg actcagttgt tctgtttaca tcctggtggc acctctcacc ctgacccaca      900
```

caaaggttct ggagattact ggagaatata tataaatata tatatgtacg tatatatgta 960

aatacacata tacgtatata taaatatata tatacatatg tgtgtgtata tatatatata 1020

ttttttttttt ttttttttttt tttgagacgg agtgttgctc tgtcacccag gctggagtgc 1080

aatgacgcaa tctcggctca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcga ttctccagcc 1140

tcagcctccc gagtagctgg gattacagac acccgccacc acgcccggct aatttttttct 1200

atttttagta gaaatggggt ttcaccatgt tagccaggct ggtctcaaac tcctgaccct 1260

gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcatgagc cactgcaccc 1320

ggccctgaga atatatttat taaagccacc tcttcactga aagttaccga aagagtcggt 1380

ttaggaagga aacgaagggt cagtgaacag agtcaaatgc agaagtgggc ttgtcatggg 1440

tagggctttc ggcgtacgat aaaaggatca tttgtttttt aaaaggggtt ggaaaaactg 1500

gttttccagt tggaaacagt aaaggttgta agctttgtgt gtacaaaaga aaacagggaa 1560

tgcaggtgtg tttatagcgt tgtggttcaa gtccctctta acaagaactc caaagctgga 1620

aagcaggagg gaacaaaggt gaacatgaag gcgaggatgc tggggccctg cagtgcgctc 1680

taggctgtgc gtgagccggg actgtaccca cagcttgctg agggctgctc ttcttgggcc 1740

agggaaagca gggcagccgg gacctgcggc tgtgcctgga ctgaagctgt cccgcaggtc 1800

cccaccctcc aacacgtgct cacctgtccc cctcctcgca gcagcctcgg gacaaaacaa 1860

tgactcaagg acagcacttc tcgcagaagg tctggaagtg cccagaatgg gaggcacgga 1920

agcccctccc ggggaggact cccgcgttga tggaccgttc ttggtgcaga ctcctgactg 1980

cgtgcatgaa acctgagaca agtgcaattc cttccatgtc gccccagagt gcccaggagg 2040

caggcagtgc ggggtgccca ggcagacggg ttcagcctgc agaactggag gcgacctgtg 2100

aaacccaccc gggcacccca acaggaacag aagcgtggtc ctgcggctgc gtccccagcg 2160

agtttcactt tccccttgct cgtttctccc ttgttgtaag tgtttacaac tggcatgtgc 2220

ttttaaacgt caggtaagag gggaacagct gctgtacatc gtcctggcga gtgacaatgt 2280

gacagaagcc tgggcgaggc cctcggaggg cagcagctgg acaggggcta ctgggtttgg 2340

cctggacagc actgatttgt ggatgtggat gggggcacgt tgtccgtgat aaaagtacaa 2400

gtgcccctca caaaaaaaaa aaaaaaaa 2428

<210> 5
<211> 29
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 5
uucagaaucg ccgcaugaaa cacaaacgg 29

<210> 6
<211> 29
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 6
ucuacucaac gucuucuggc cuugccaau 29

<210> 7
<211> 29
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
caaaucugcc ugcgccggag aggaccaug 29

<210> 8
<211> 29
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
gguugaguaa ggagccaaau accuugcgg 29

<210> 9
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 9
cggguugagu aaggagccaa aua 23

<210> 10
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 10
ccgcaugaaa cacaaacggc aaa 23

<210> 11
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
ccccagcuuu cuacucaacg ucu 23

<210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
ttcagaatcg ccgcatgaaa cacaaacgg 29

<210> 13
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 13
tctactcaac gtcttctggc cttgccaat 29

<210> 14
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
caaatctgcc tgcgccggag aggaccatg 29

<210> 15
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 15
ggttgagtaa ggagccaaat accttgcgg 29

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
cgggttgagt aaggagccaa ata 23

<210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 17
ccgcatgaaa cacaaacggc aaa 23

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 18
ccccagcttt ctactcaacg tct 23

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 19
ccgtcagcat caaggagg 18

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 20
ctggacctct gagagctgc 19

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 21
aaactttgga gtcccctcac 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 22
aaaggctcaa cactgagacg 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
cttcccccac taccgtaaat 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 24
tgctcactcc agaaaactcc 20

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 25
cagctgctta gacgctggat t 21

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 26
gtagaaatac ggctgcaccg a 21

<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 27
gttcgtggcc tctaagatg 19

<210> 28
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 28
ttgttcacca ggagcagc 18

<210> 29
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 29
ggguugagua aggagccaa 19

<210> 30
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 30
gguugaguaa ggagccaaa 19

<210> 31
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 31
gcucucagag guccagaua 19

<210> 32
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 32
gguuucagaa ucgccgcau 19

<210> 33
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 33
ucagaaucgc cgcaugaaa 19

<210> 34
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 34
ucgccgcaug aaacacaaa 19

<210> 35
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 35
gccgcaugaa acacaaacg 19

<210> 36
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36
gcaugaaaca caaacggca 19

<210> 37
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 37
gcuuucuacu caacgucuu 19

<210> 38
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 38
ucucugccaa guggcacaa 19

<210> 39
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 39
ggacucaguu guucuguuu 19

<210> 40
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 40
cccggcccug agaauauau 19

<210> 41
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 41
ccggcccuga gaauauauu 19

<210> 42
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 42
ggucagugaa cagagucaa 19

<210> 43
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 43
gcagaagugg gcuugucau 19

<210> 44
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 44
gcaggugugu uuauagcgu 19

<210> 45
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 45
ggaaagcagg agggaacaa 19

<210> 46
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 46
gcguugaugg accguucuu 19

<210> 47
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 47
ccugacugcg ugcaugaaa 19

<210> 48
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 48
gccuggacag cacugauuu 19

<210> 49
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
gggttgagta aggagccaa 19

<210> 50
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 50
ggttgagtaa ggagccaaa 19

<210> 51
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 51
gctctcagag gtccagata 19

<210> 52
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 52
ggtttcagaa tcgccgcat 19

<210> 53
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53
tcagaatcgc cgcatgaaa 19

<210> 54
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 54
tcgccgcatg aaacacaaa 19

<210> 55
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 55
gccgcatgaa acacaaacg 19

<210> 56
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 56
gcatgaaaca caaacggca 19

<210> 57
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 57
gctttctact caacgtctt 19

<210> 58
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 58
tctctgccaa gtggcacaa 19

<210> 59
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 59
ggactcagtt gttctgttt 19

<210> 60
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 60
cccggccctg agaatatat 19

<210> 61
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 61
ccggccctga gaatatatt 19

<210> 62
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 62
ggtcagtgaa cagagtcaa 19

<210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 63
gcagaagtgg gcttgtcat 19

<210> 64
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 64
gcaggtgtgt ttatagcgt 19

<210> 65
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 65
gcgttgatgg accgttctt 19

<210> 66
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 66
cctgactgcg tgcatgaaa 19

<210> 67
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 67
gcctggacag cactgattt 19

<210> 68
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 68
tactcaaccc tgacatagag ggtaa 25

<210> 69
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 69
gagcccggtt tgcatacacg gctaa 25

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* para expandir células madre o progenitoras hematopoyéticas, y el método comprende

poner en contacto células madre o células progenitoras hematopoyéticas aisladas de un sujeto, con un morfolino oligonucleótido que inhibe la expresión de un polipéptido VentX, por lo que se incrementa la expansión de las células madre o progenitoras hematopoyéticas,

en el que el oligonucleótido tiene una secuencia SEQ ID Nº: 68 o SEQ ID Nº:69.

2. El método de la reivindicación 1, en el que las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han aislado de médula ósea, sangre periférica, o sangre de cordón umbilical del sujeto.

3. Un morfolino oligonucleótido que inhibe la expresión de un polipéptido VentX, para el uso en el tratamiento de un síndrome de insuficiencia de médula ósea primario o secundario en un sujeto, en el que el oligonucleótido tiene una secuencia SEQ ID Nº: 68 o SEQ ID Nº:69.