



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 358 146**

② Número de solicitud: 200930890

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 5/0775** (2000.01)  
**A61K 35/28** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **22.10.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**06.05.2011**

⑦ Solicitante/s: **FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA  
PARA LA GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN  
SALUD EN SEVILLA**  
Avda. Manuel Siurot, s/n  
HHUUVR-Edf. Laboratorios - 6ª Planta  
41013 Sevilla, ES  
Simón Méndez Ferrer

⑧ Inventor/es: **Méndez Ferrer, Simón**

⑩ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑮ Título: **Uso de células mesenquimales Nestina positivas para el mantenimiento de la hematopoyesis.**

⑯ Resumen:

Uso de células mesenquimales Nestina positivas para el mantenimiento de la hematopoyesis.

La presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial aislada para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* donde preferiblemente dicha célula madre multipotencial es una célula madre mesenquimal o más preferiblemente dicha célula madre mesenquimal es una célula mesenquimal capaz de expresar la proteína Nestina. Si la célula madre multipotencial procede de un embrión humano, ésta se obtiene sin destruir dicho embrión. La presente invención también se refiere al uso de cualquiera de las células madre descritas anteriormente para la fabricación de un medicamento para el mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero, o para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad asociada con una disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero. Asimismo, la presente invención también se refiere a un método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* o a un método para evaluar la capacidad hematopoyética de un mamífero.

ES 2 358 146 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de células mesenquimales Nestina positivas para el mantenimiento de la hematopoyesis.

5 La presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial aislada para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* donde preferiblemente dicha célula madre multipotencial es una célula madre mesenquimal o más preferiblemente dicha célula madre mesenquimal es una célula mesenquimal capaz de expresar la proteína Nestina. La presente invención también se refiere al uso de cualquiera de las células madre descritas anteriormente para la fabricación de un medicamento para el mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero, o para la prevención  
10 y/o el tratamiento de al menos una enfermedad asociada con una disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero. Asimismo, la presente invención también se refiere a un método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* o a un método para evaluar la capacidad hematopoyética de un mamífero.

## Estado de la técnica anterior

15 Se ha sugerido que las células madre hematopoyéticas (HSCs) están preferentemente localizadas en regiones perivasculares de la médula ósea (MO) (Kiel *et al.*, 2005. Cell 121: 1109-1121), cerca de células reticulares con expresión elevada de la quemoquina CXCL12/SDF-1 (Sugiyama *et al.*, 2006. Immunity 25: 977-988). No obstante, no se conoce la identidad y función de estas células. En la MO humana, CD146 se expresa en células perivasculares que tienen  
20 capacidad osteoprogenitora y que pueden autorrenovarse y reconstituir la hematopoyesis (Sacchetti *et al.*, 2007. Cell 131: 324-336). Sin embargo, no está claro si las células CD45<sup>-</sup> CD146<sup>+</sup> forman parte del nicho hematopoyético (NH), y esta combinación de marcadores está presente también en las células endoteliales vasculares.

25 La migración de las HSCs ofrece un paradigma útil para estudiar los elementos celulares que forman el NH, ya que la atracción de las HSCs está directamente controlada por el microambiente de la MO. Estudios previos han revelado que la movilización de las HSCs inducida por el factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) está regulada por el sistema nervioso simpático (SNS) (Katayama *et al.*, 2006. Cell, 124: 407-421). En homeostasis, un bajo número de HSCs abandona la MO para pasar al torrente circulatorio (Abkowitz *et al.*, 2003. Blood, 102: 1249-1253; Wright *et al.*, 2001. Science, 294: 1933-1936). Su liberación en la sangre está regulada por el reloj molecular y dirigida  
30 por el SNS, el cual libera cíclicamente noradrenalina en la MO, activando los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  e induciendo en consecuencia oscilaciones rítmicas en la expresión de *Cxcl12* (Mendez-Ferrer *et al.*, 2008. Nature, 452: 442-447).

35 Por otro lado, estudios previos han demostrado que las células perivasculares CD45<sup>-</sup> CD146<sup>+</sup> de la MO y de otros tejidos contienen osteoprogenitores (Sacchetti *et al.*, 2007. Cell 131: 324-336) o MSCs (Crisan *et al.*, 2008. Cell Stem Cell, 3: 301-313), y datos recientes sugieren que células capaces de osificación endocondral son necesarias para la formación del NH en la MO fetal (Chan *et al.*, 2008. Nature, 457[7228]: 490-4).

40 La proteína Nestina es una proteína del filamento intermedio. Las proteínas de los filamentos son expresadas en su mayoría en células nerviosas donde están implicadas en el crecimiento axonal.

45 Asimismo, también se ha indicado una función para la proteína Nestina ya que es conocido que dicha proteína constituye un marcador de células progenitoras multilínea y su presencia en estas células indica la multipotencialidad de las células y su capacidad regenerativa (Wiese *et al.*, 2004. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 61: 2510-2522). En este sentido, es conocido que las células Nestina<sup>+</sup> de la región del bulbo del folículo capilar, tienen propiedades de células madre, son multipotentes (células madre mesenquimales) y pueden generar células del linaje neural *in vitro* e *in vivo* (Mignone *et al.*, 2007. Cell Cycle, 6 (17): 2161-2170). En la discusión de Mignone *et al.*, 2007, se mencionan los tipos celulares a los que pueden diferenciarse las células Nestina<sup>+</sup>, por ejemplo, células madre neuronales y células neuro-  
50 nales, células ovales del hígado, células satélite del músculo, células madre del páncreas, células Leydig progenitoras, células de músculo liso, células de la glándula sebácea, melanocitos o keratinocitos.

A la vista de los resultados publicados en este sentido, la dificultad de mantener la producción de células sanguíneas derivadas de células madre hematopoyéticas (*in vivo* y/o *in vitro*) es un problema técnico todavía por resolver.

## Explicación de la invención

55 La presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial aislada para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* donde preferiblemente dicha célula madre multipotencial es una célula madre mesenquimal o, más preferiblemente dicha célula madre mesenquimal es una célula mesenquimal capaz de expresar la proteína Nestina. La presente invención también se refiere al uso de cualquiera de las células madre descritas anteriormente para la fabricación de un medicamento para el mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero, o para la prevención  
60 y/o el tratamiento de al menos una enfermedad asociada con una disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero. Preferiblemente dicha enfermedad que cursa con una deficiencia en la mielopoyesis o en la linfopoyesis. Asimismo, la presente invención también se refiere a un método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* o a un método para evaluar la capacidad hematopoyética de un mamífero.

65 En la presente invención se demuestra que las células Nestina positivas son células madre mesenquimales y por tanto, multipotentes, capaces de diferenciarse a linajes celulares como por ejemplo linajes osteoblásticos, chondrocíticos o adipocíticos.

Dichas células Nestina positivas expresan altos niveles de moléculas implicadas en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas, es decir, en la hematopoyesis, como por ejemplo, angiopoyetina-1, osteopontina, N-cadherina. Por otra parte, la expresión de *Cxcl12*, una quemoquina implicada, por ejemplo, en la migración de células hematopoyéticas del hígado del feto hasta la médula ósea, es alrededor de 50 veces mayor en las células Nestina positivas que en el resto de las células del estroma. La expresión de otros genes encargados de regular el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas como por ejemplo *Kitl*, *Il7*, *Vcam1* o *Cdh2* es de 140 a 800 veces mayor en las células Nestina positivas que en el resto de las células del estroma.

En este sentido, los ratones en los que se ha practicado la depleción de las células Nestina positivas tienen una reducción de un 45% de la celularidad de la médula ósea respecto de los ratones control. Por tanto, la puesta en contacto de estas células madre junto con células madre hematopoyéticas, produce el mantenimiento de la hematopoyesis. Este uso tiene una aplicación industrial clara, por ejemplo, en el campo del tratamiento de enfermedades asociadas con una disfunción en el mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero o en el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* con el objeto de permitir la generación de células derivadas de las células madre hematopoyéticas, como por ejemplo, células sanguíneas.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial aislada para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro*.

Las células madre (o células troncales) son células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse sin perder sus propiedades y llegar a producir tanto células diferenciadas como células no diferenciadas. Según el origen de las células madre se puede diferenciar entre células madre embrionarias y células madre adultas. En la presente invención se hace referencia a una célula madre adulta o embrionaria. Si la célula madre procede de un embrión humano, dicha célula se obtiene sin destruir o afectar a la viabilidad de dicho embrión.

La célula madre multipotencial de la presente invención es capaz de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (Weissman *et al.*, 2001. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 387-403) y como consecuencia, a cualquier tejido adulto derivado.

El término “aislada” se refiere a que las células madre permanecen fuera del cuerpo humano o animal.

Tal como se entiende en la presente invención, el término “mantenimiento de la hematopoyesis” hace referencia a la preservación del proceso de hematopoyesis, es decir la preservación de la generación, regulación y producción de las células derivadas de las células madre hematopoyéticas así como de la división de dichas células madre hematopoyéticas. En adelante se podrá emplear el término hematopoyesis como sinónimo del término hematopoyesis.

Las células madre hematopoyéticas pueden ser, pero sin limitarse, “células madre hematopoyéticas de largo plazo” (*long-term hematopoietic stem cells*, LT-HSC) o “células madre hematopoyéticas de corto plazo” (*short-term hematopoietic stem cells*, ST-HSC).

Las células derivadas de las células madre hematopoyéticas pueden ser, pero sin limitarse, progenitores hematopoyéticos comprometidos capaces de diferenciarse a una línea celular mielocítica o linfopoyética, eritrocitos, plaquetas, granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), monocitos o linfocitos. Asimismo las células derivadas de las células madre hematopoyéticas pueden cualquiera de los precursores de los eritrocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos o linfocitos.

En condiciones *in vivo*, la hematopoyesis se produce en diversos órganos o tejidos dependiendo del estado de desarrollo del individuo o incluso del desarrollo de estados patológicos. Así pues, durante el transcurso de la segunda y tercera semanas aproximadamente de desarrollo embrionario se produce hematopoyesis en el saco vitelino. Aproximadamente a partir de la sexta semana aparece tejido hematopoyético en el hígado. A partir del tercer mes de desarrollo embrionario se empieza a desarrollar el tejido mielóide de la médula ósea, que es donde se produce principalmente el proceso de hematopoyesis. A partir del octavo mes de desarrollo embrionario aparece tejido hematopoyético en el bazo. En el individuo adulto la actividad hematopoyética se mantiene en la médula ósea, sin embargo, en el transcurso de determinados estados patológicos pueden apreciarse focos hematopoyéticos en algunos de los órganos mencionados anteriormente, en este caso la hematopoyesis es extramedular.

El mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* de la presente invención puede llevarse a cabo en las células aisladas procedentes del tejido hematopoyético de cualquiera de los órganos que poseen dicho tejido como por ejemplo, pero sin limitarse, cualquiera de los órganos citados en el párrafo anterior en cualquier estado de desarrollo del individuo.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso donde la célula madre multipotencial es una célula mesenquimal.

La célula mesenquimal procede de cualquier tejido mesenquimal. El tejido mesenquimal es aquel que procede de la capa embrionaria llamada mesodermo. El tejido mesenquimal del que procede la célula mesenquimal de la presente invención se selecciona de la lista que comprende tejido conectivo laxo, tejido conectivo denso, tejido adiposo, tejido cartilaginoso, tejido óseo, tejido hematopoyético, tejido sanguíneo o tejido muscular. Preferiblemente la célula mesenquimal de la presente invención procede de tejido hematopoyético. Más preferiblemente la célula mesenquimal

## ES 2 358 146 A1

procede de médula ósea. La médula ósea es un tejido que se encuentra, por ejemplo, pero sin limitarse, en el interior de los huesos largos, vértebras, costillas, esternón, huesos del cráneo, cintura escapular o pelvis. Preferiblemente la médula ósea es médula ósea roja, que ocupa el tejido esponjoso de los huesos planos, como por ejemplo, pero sin limitarse, el esternón, las vértebras, la pelvis o las costillas. Este tipo de médula ósea es la que tiene la función hematopoyética. Además, las células mesenquimales de la presente invención pueden proceder de cordón umbilical.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso donde la célula madre mesenquimal es una célula Nestina positiva.

La proteína Nestina es un tipo de filamento intermedio tipo IV. Esta proteína se expresa en células no diferenciadas durante estadios tempranos del desarrollo del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico así como en órganos como el páncreas o en el tejido muscular. La proteína Nestina está considerada como un marcador de células madre. Las células que expresan dicha proteína son células que se comportan como células mesenquimales teniendo en cuenta su capacidad de diferenciación. Por tanto, la célula mesenquimal Nestina positiva de la presente invención se refiere a una célula mesenquimal capaz de expresar la proteína Nestina. Las células mesenquimales Nestina positivas pueden expresar dicha proteína en una cantidad variable dependiendo de condiciones multifactoriales como por ejemplo el tipo de tejido en el que se encuentre la célula mesenquimal así como el estadio de desarrollo del tejido al que pertenece, etc. En los ejemplos de la presente invención se demuestra cómo la reducción drástica de las células mesenquimales Nestina positivas en un ratón, produce una reducción del 45% en la celularidad de la médula ósea debido a la reducción de citocinas y factores de crecimiento que sostienen la producción de células progenitoras hematopoyéticas.

Según otra realización preferida, la célula madre constituye una población celular aislada. La población celular está constituida por, o comprende, cualquiera de las células madre multipotentes, células madre mesenquimales o células mesenquimales Nestin positivas. Dicha población celular puede consistir en cualquier combinación de células madre multipotentes, células madre mesenquimales o células mesenquimales Nestin positivas o puede comprender cualquier combinación de las células anteriores.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial para la fabricación de un medicamento para el mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de al menos una enfermedad asociada con una disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de enfermedades que cursen con una disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis. El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención supone combatir los efectos causados como consecuencia de dicha disfunción, para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores.

El término “disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis” tal como se emplea en la presente invención hace referencia a una alteración cuantitativa de la hematopoyesis que produce la pérdida total o parcial en el mantenimiento de la hematopoyesis y como consecuencia de dicha disfunción se produce una bajada en la celularidad (hipocelularidad) en la médula ósea del individuo respecto de una condición normal. La condición normal es aquella en la que dicha celularidad se mantiene por encima de un porcentaje mínimo como por ejemplo, pero sin limitarse, por encima del 20, 25, 30 ó 35%. La condición de hipocelularidad no afecta a la presente invención. Es decir, la enfermedad asociada a dicha disfunción en el mantenimiento de la hematopoyesis está producida como consecuencia de la disminución de la división y/o diferenciación de las células hematopoyéticas, lo que origina una disminución de la producción de cada una de las células derivadas de las células madre hematopoyéticas con respecto a un valor control de producción de dichas células. Dicha comparación puede llevarse a cabo determinando la concentración de cualquier tipo de célula hematopoyética diferenciada y comparándola con los niveles de referencia. Estos niveles de referencia son los niveles control. Por ejemplo, el nivel de referencia de los eritrocitos es de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mm<sup>3</sup> en el caso de varones o el nivel de referencia de los leucocitos es de 5000 células/mm<sup>3</sup>. Los niveles de referencia anteriores son niveles mínimos por debajo de los cuales se consideraría que hay una disminución de la producción de cada una de las células derivadas de las células madre hematopoyéticas.

El término “celularidad” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a la relación entre las células hematopoyéticas y el tejido adiposo (células constituyentes mayoritarias de la médula ósea) expresado en el porcentaje de células.

Una realización preferida se refiere al uso donde la enfermedad asociada a la disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis es una enfermedad que cursa con una deficiencia en la mielopoyesis o en la linfopoyesis.

El término “deficiencia” tal como se entiende en la presente invención se refiere a un funcionamiento inferior a lo normal, es decir a una capacidad de división y/o diferenciación de las células madre mielopoyéticas o linfopoyéticas por debajo de los niveles de referencia establecidos para cada tipo de células derivadas de las células madre hematopoyéticas y para cada sexo.

## ES 2 358 146 A1

La mielopoyesis es el proceso que da lugar a la generación, desarrollo y maduración de las células mieloides de la sangre, es decir, eritrocitos, plaquetas, granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos) o monocitos. Los eritrocitos se generan por un proceso denominado eritropoyesis. Las plaquetas se generan por trombopoyesis. Los granulocitos se generan por granulopoyesis. Los monocitos se generan por monopoyesis. La linfopoyesis es el proceso que permite la generación, desarrollo y maduración de los linfocitos.

La enfermedad que cursa con una deficiencia en la mielopoyesis o en la linfopoyesis se selecciona de la lista que comprende anemia aplásica, pancitopenia, eritroblastopenia, aplasia eritrocítica, anemia de Fanconi, síndrome de Blackfan-Diamond, panmieloptisis, anemia diseritropoyética, anemia dishematopoyética, granulocitopenia (agranulocitosis), neutropenia, o linfopenia.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial para la fabricación de un medicamento donde la célula madre multipotencial es una célula mesenquimal. Otra realización preferida se refiere al uso donde la célula madre mesenquimal es una célula Nestina positiva. Según otra realización preferida, la célula madre constituye una población celular aislada.

Dicho medicamento comprende:

- la célula madre multipotencial, mesenquimal o mesenquimal Nestina positiva, y
- un vehículo farmacológicamente aceptable,
- un excipiente farmacológicamente aceptable, u
- otra sustancia activa.

El medicamento puede comprender cualquiera de dichas células con el vehículo, excipiente u otra sustancia activa en cualquiera de sus combinaciones.

Además, el vehículo así como el excipiente deben ser farmacéuticamente aceptables.

El término “vehículo” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las secuencias de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de la célula madre multipotencial, mesenquimal o mesenquimal Nestina positiva y/o de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de las secuencias de la presente invención, estabiliza dicha secuencia o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia permita la actividad de la célula madre multipotencial, mesenquimal o mesenquimal Nestina positiva de la presente invención.

El término “sustancia activa” hace referencia a una sustancia activa que debe permitir la actividad de cualquiera de las células de la invención, es decir, debe ser compatible con la célula madre multipotencial, mesenquimal o mesenquimal Nestina positiva.

Es decir, al menos una célula madre multipotencial, mesenquimal o mesenquimal Nestina positiva, se formula en una composición farmacéutica y farmacológica apropiada (medicamento), en una cantidad terapéuticamente efectiva. El medicamento puede formularse junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables, así como también puede comprender otra sustancia activa.

En cada caso, la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida.

## ES 2 358 146 A1

El medicamento de la presente invención se puede presentar en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.

5 La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jara-

10 La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral.

15 Otra posibilidad es que el medicamento se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, transdérmica o inhalada.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de al menos una célula madre multipotencial, mesenquimal o mesenquimal Nestina positiva, donde el mamífero es un humano.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* que comprende:

25 a) poner en contacto al menos una célula madre multipotencial aislada con al menos una célula madre hematopoyética aislada, e

b) incubar el producto obtenido en el apartado (a) en un medio de cultivo adecuado para la división y/o diferenciación de la célula madre hematopoyética.

30 Tal como se demuestra en el apartado de ejemplos de la presente invención, la célula madre multipotencial, preferiblemente la célula madre mesenquimal y más preferiblemente la célula mesenquimal Nestina positiva comparte el mismo nicho en la médula ósea que las células madre hematopoyéticas. Por tanto, el primer paso del método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* consiste en poner en contacto dicha célula madre multipotencial aislada con al menos una célula madre hematopoyética en cualquier fase de desarrollo previo a su diferenciación.

35 La incubación de dicha mezcla celular debe llevarse a cabo en un medio de cultivo que permita la división y/o diferenciación de la célula madre hematopoyética.

40 En la presente invención se entiende por "medio de cultivo adecuado" cualquier solución que comprenda nutrientes necesarios para la división y/o diferenciación, o para la recuperación o aislamiento de cualquiera de las células derivadas de las células madre hematopoyéticas de la presente invención. Dicho cultivo se lleva a cabo en condiciones favorables de temperatura y pH. El medio de cultivo se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), RPMI 1640, F12, F10, MCDB 131, MEM (*Minimum Essential Media*) o DMEM/F12. Además, el medio de cultivo puede estar suplementado con otros componentes, como por ejemplo, pero sin limitarse, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, suero o sustituto de suero, aminoácidos, antibióticos, etc. No obstante puede ser empleado cualquier medio de cultivo conocido en el estado de la técnica para el cultivo de células madre hematopoyéticas. En el apartado de ejemplos de la presente invención se describen algunos tipos de medio de cultivo.

50 La incubación descrita en el apartado (b) del método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* debe llevarse a cabo durante el tiempo deseado siempre que se mantengan las condiciones adecuadas para dicho mantenimiento de la hematopoyesis. Para ello puede ser necesaria la renovación periódica de dicho medio, o la adición de nuevo medio de cultivo, o la recuperación de parte del medio en el que se encuentren las células derivadas de cualquiera de las células madre hematopoyéticas de la presente invención.

55 Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro*, donde la célula madre multipotencial es una célula mesenquimal. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método donde la célula madre mesenquimal es una célula Nestina positiva. Según otra realización preferida del método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro*, la célula madre constituye una población celular aislada.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para determinar el mantenimiento de la capacidad hematopoyética de un mamífero que comprende:

65 a) analizar al menos un producto de expresión del gen que codifica para la proteína Nestina en las células de una muestra de tejido hematopoyético aislado de dicho mamífero y

b) asignar la presencia de dicho producto de expresión analizado en el apartado (a) al mantenimiento de la capacidad hematopoyética del órgano del que procede dicho tejido.

## ES 2 358 146 A1

El término “producto de la expresión” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína Nestina del mamífero. Así pues, como producto resultante de la expresión se entiende, por ejemplo, el ARN mensajero que se obtiene de la transcripción de la secuencia nucleotídica, el ARN mensajero procesado, la proteína resultante de la traducción de cualquiera de los ARN mensajeros o la secuencia de cDNA (ADN complementario a la secuencia de ARN mensajero).

El análisis del producto de expresión se lleva a cabo mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica.

La presencia del producto de expresión descrito en un párrafo anterior indica la producción de proteína Nestina en las células del tejido aislado de dicho mamífero. La detección de dicha presencia depende de la sensibilidad de la técnica de detección que se emplee en el análisis.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para determinar el mantenimiento de la capacidad hematopoyética de un mamífero, que comprende:

a) determinar la concentración de al menos un producto de expresión del gen que codifica para la proteína Nestina en las células de una muestra de tejido hematopoyético aislada de dicho mamífero,

b) calcular la diferencia de la concentración del producto de la expresión del gen que codifica para la proteína Nestina determinada en el apartado (a) con respecto a la concentración de la expresión de dicho gen en un control positivo y/o negativo, y

c) asignar una diferencia significativa con respecto al control positivo, y/o la ausencia de una diferencia significativa con respecto al control negativo, calculadas en el apartado (b), al mantenimiento de la capacidad hematopoyética del tejido del que procede dicha muestra.

El control negativo es, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de tejido hematopoyético donde las células no sean capaces de llevar a cabo el mantenimiento de la hematopoyesis, es decir, donde dichas células no son capaces, por ejemplo, de mantener la celularidad dentro de unos porcentajes deseados (conocidos por el experto en la materia) para cualquier tipo de célula derivada de una célula madre hematopoyética. Los porcentajes deseados de celularidad pueden ser, pero sin limitarse, porcentajes inferiores a un 20%, es decir, el control negativo presenta disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis.

El control positivo es, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de tejido hematopoyético donde las células sean capaces de llevar a cabo el mantenimiento de la hematopoyesis, es decir, donde dichas células son capaces, por ejemplo, de mantener la celularidad dentro de unos porcentajes deseados (conocidos por el experto en la materia) para cualquier tipo de célula derivada de una célula madre hematopoyética. Los porcentajes deseados de celularidad pueden ser, pero sin limitarse, porcentajes superiores a un 20%, es decir, el control positivo presenta la capacidad de mantener la hematopoyesis.

El término “diferencia significativa” tal como se emplea en la presente invención hace referencia a una diferencia calculada en el apartado (b) del método mayor que un error estándar definido multiplicado por una seguridad definida. La seguridad definida puede tener un valor, por ejemplo, pero sin limitarse, de un 95% ( $p < 0,05$ ) o de un 99% ( $p < 0,01$ ). Por el contrario, la “ausencia de una diferencia significativa” hace referencia a una diferencia calculada en el apartado (b) del método igual o menor que un error estándar definido multiplicado por una seguridad definida.

Otra realización preferida se refiere al método para evaluar la capacidad hematopoyética de un mamífero, donde dicho mamífero es un humano.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

Fig. 1. Muestra que las células Nes:GFP<sup>+</sup> son células madre mesenquimales.

(A) n = 12.

(B) n = 4.

## ES 2 358 146 A1

(C) n = 4.

(D) Células aisladas como CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> (recuadro) cultivadas durante 4 semanas con medio de diferenciación osteoblástica.

(E) Diferenciación progresiva en adipocitos a partir de CFU-Fs obtenidos de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> cultivadas durante 3 semanas con medio de diferenciación adipocítica (n = 4).

(F) Las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> no generaron ninguna colonia (recuadro).

(G) *Acan*: expresión de agrecano durante las 3 semanas de cultivo con medio de diferenciación condrocítica.

(H) Acumulación de mucopolisacáridos Alcian blue<sup>+</sup> en pellets celulares procedentes de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> cultivadas durante 3 semanas con medio de diferenciación condrocítica (n = 4).

(I) Esferas clonales Las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> tras 7 días de cultivo en baja densidad; campo claro.

(J-K) expresión de GFP en una esfera tras 10 días de cultivo; (J) campo claro; (K) fluorescencia.

(L) Diferenciación de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> en linajes mesenquimales.

(M) Adipocitos refringentes multi- y uniloculares, así como células migrando desde la capa externa de la esfera, adheridas a la superficie de la placa de cultivo.

(N-O) Mesesferas clonales (n = 51) diferenciadas en OBs Col2.3-LacZ<sup>+</sup> OBs y adipocitos Oil red O<sup>+</sup>.

(P) Ejemplo representativo de mesesfera clonal que acumuló mucopolisacáridos Alcian blue<sup>+</sup> tras 3 semanas en cultivo con medio de diferenciación condrocítica (n = 4).

(Q) Diferenciación progresiva de las mesesferas clonales cultivadas durante 3 semanas en medio de diferenciación condrocítica (n = 5-11), manifestada por la expresión aumentada de “(*sex determining region Y*)-box 9” (*Sox9*), agrecano (*Acan*) y de los colágenos tipo II $\alpha$ 1 (*Col2a1*) y tipo XI $\alpha$ 2 (*Col11a2*).

Escala, 100  $\mu$ m (F, I, K, N, P); 500  $\mu$ m (H); 50  $\mu$ m (L-M, O). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; test t no pareado de dos colas; las barras de error indican error estándar.

Fig. 2. Muestra que las células Nes:GFP<sup>+</sup> están físicamente asociadas con las HSCs.

(A, B) Inmunohistoquímica frente a CD150 (flechas), CD48 y marcadores de linajes hemopoéticos en secciones de MO de ratones *Nes-Gfp*. Imágenes representativas de HSCs CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> localizadas adyacentes a las células Nes:GFP<sup>+</sup> del endostio (A) y de los sinusoides (B); (A) Los megacariocitos CD150<sup>+</sup> CD48/Lin<sup>+</sup>, indicados con asteriscos, se pudieron identificar fácilmente por su gran tamaño y tinción de CD150 homogénea. Deconvoluciones de las proyecciones Z.

(C) Las escasas células Nes:GFP<sup>+</sup> detectables en cultivos primarios mieloides estaban frecuentemente asociadas con “cobblestone-forming areas”, enriquecidas en progenitores hemopoéticos. Imagen combinada de fluorescencia y contraste de fase.

Escala, 50  $\mu$ m.

Fig. 3. Muestra cómo las células HSCs están localizadas cerca de las células Nes:GFP<sup>+</sup> en la MO.

Inmunohistoquímica frente a CD15; Ter119, Gr-1, CD3e, B220 y Mac-1 (Lin), y CD48 en secciones de MO de ratones transgénicos *Nes-Gfp*. Las puntas de flecha señalan ejemplos de HSCs CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>. Las HSCs se hallaron frecuentemente localizadas adyacentes a (A, C) o cerca de (B, D) las células Nes:GFP<sup>+</sup> del endostio, y la mayoría de ellas en contacto directo con (E, G-I) o cerca de (J-L) las células Nes:GFP<sup>+</sup> que bordeaban los sinusoides. Los asteriscos indican megacariocitos CD150<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup>, fácilmente identificables por su gran tamaño y distribución citoplasmática homogénea de CD150. Rejilla, 50  $\mu$ m.

Fig. 4. Muestra cómo la eliminación selectiva de las células que expresan nestina reduce de forma aguda el contenido y anidamiento de las células HSCs en la Médula ósea (MO).

(A) n = 5-10.

(B) n = 5-7.

## ES 2 358 146 A1

(C) n = 3-8.

(D-E) n = 4-5.

5 (F) n = 4-8.

(G) Distancias medias más cortas encontradas entre las células Nes:GFP<sup>+</sup> y las HSCs anidadas en la MO, o entre éstas y la pared del hueso 2 h (n = 16), 48 h (n = 30) y 96 h (n = 14) más tarde.

10 (H-I) Ejemplos representativos de las HSCs teñidas con DyD (flecha fina) anidadas en menos de 2 h cerca de las células GFP<sup>+</sup> (flecha gruesa) en la MO de los ratones *Nes-Gfp*. La matriz del hueso se visualizó mediante la señal armónica secundaria generada por el colágeno cuando se ilumina mediante pulsos de femtosegundos con un láser de titanio:zafiro.

15 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001; test t no pareado de dos colas; las barras de error indican error estándar.

Fig. 5. Muestra que las células Nes:GFP<sup>+</sup> de la médula ósea craneal son perivasculares.

20 Microscopía intravital de la calvaria de los ratones transgénicos Nes-Gfp inyectados i.v. con Qdot (flecha fina).

(A-C) Células Nes:GFP<sup>+</sup> (flecha gruesa) rodeando los vasos de la sutura coronal.

(D-F) Células Nes:GFP<sup>+</sup> en el endostio.

25

Fig. 6. Muestra cómo la depleción celular selectiva en los ratones *Nes-Cre/iDTR* no altera el ciclo celular de los progenitores hemopoyéticos.

30 Frecuencia de células CD48<sup>-</sup>, Lin-Sca-1+ c-kit<sup>+</sup> (LSK) (A) y CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> LSK (B) en la MO de ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR* o de animales controles *iDTR* 24 h tras la inyección de toxina diftérica (DT). Las muestras de MO, teñidas como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, se fijaron y permeabilizaron, y se detectó TUNEL utilizando el kit Mebstain Apoptosis Kit Direct (MBL) y FACS. Cada punto corresponde a un ratón. \*\* p < 0.01, test t no pareado de dos colas.

35

Fig. 7. Muestra cómo la depleción celular selectiva en los cultivos de larga duración realizados a partir de la MO de los ratones *Nes-Cre/iDTR* reduce el número de progenitores hemopoyéticos.

40 Se determinó el número de unidades formadoras de colonias en cultivo (CFU-C) en la fracción adherente (A) y los sobrenadantes (B) de cultivos mieloides (tipo Dexter) de MO de ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR*. La toxina diftérica (DT, 100 ng/ml) se añadió al medio al sembrar los cultivos y en los recambios semanales de la mitad del medio de cultivo. Los datos se normalizaron en base a cultivos similares de MO de animales controles *iDTR* para descartar la toxicidad inespecífica de la DT *in vitro* (n = 3 ratones). \*\* p < 0.05; test t no pareado de dos colas. Las

45

Fig. 8. Muestra cómo la depleción celular selectiva en los ratones *Nes-Cre/iDTR* reduce la supervivencia pero no afecta la permeabilidad vascular o la histología de la MO ni el hemograma.

50

(A) Supervivencia reducida de los ratones *Nes-Cre/iDTR* tras la ablación celular selectiva. Porcentaje de supervivencia de los ratones *Nes-Cre/iDTR* y *Nes-Cre/iDTR/ROSA-Gfp* tripleinyectados con toxina diftérica (DT, 4 µg/kg, i.p.; línea sin elementos en los extremos) o PBS (línea con puntas de flecha en ambos extremos) (n = 10), comparado con animales controles tratados con DT (línea con círculos negros en ambos extremos, n = 5). \*\*\* p < 0.001 (test de Logrank).

55

(B-C) Colorante FITC-Dextran, preparado e inyectado i.v. en los animales *Nes-Cre/iDTR* tratados con DT en la vasculatura de la MO craneal (C), o en animales control (B).

60 (D-E) <histología de la MO de los animales *Nes-Cre/iDTR* tratados con DT (E) e histología de los animales control (D). Ejemplos representativos de n = 4 ratones. Escala, 100 µm (B-C); 50 µm (D-E).

(F) Cantidad de eritrocitos (RBC), hemoglobina (Hgb), hematocrito (Hct), plaquetas (Plt), leucocitos (WBC) y progenitores hemopoyéticos (CFU-C) en la sangre en ratones *Nes-Cre/iDTR* y *Nes-Cre/iDTR/ROSA-Gfp* 24-48 h después del tratamiento con DT comparado con los niveles observados en animales transgénicos inyectados con PBS o en ratones controles tratados con DT (n = 4-7). Test t no pareado de dos colas. Las barras de error indican error estándar.

65

Fig. 9. Muestra la expresión de genes críticos para el mantenimiento de las HSCs.

RT-PCR cuantitativa a partir de muestras de ARN obtenidas de las células CD45<sup>-</sup> GFP<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> GFP<sup>-</sup> aisladas de la MO de los ratones transgénicos *Nes-Gfp* para determinar la expresión de *Cxcl12*, “stem cell factor”/ligando de kit (5 *Kitl*), interleucina-7 (*IL7*), “vascular cell adhesion molecule-1” (*Vcam1*), osteopontina (*Spp1*) y caderina-N (*Cdh2*), *Gapdh*, angiopoyetina-1 (*Angpt1*), en las células Nes:GFP<sup>+</sup> y en el resto de la población CD45<sup>-</sup> de la MO.

(A) n = 6.

10 (B) Los animales se inyectaron con salino, un agonista b-adrenérgico no selectivo (isoproterenol, b-AR) o un agonista selectivo para receptores adrenérgicos  $\beta_3$  (BRL37344;  $\beta_3$ -AR) (2 mg/kg, i.p.) y se sacrificaron 2 h después. (n = 6).

15 (C) Expresión de las conexinas 45 (*Gjc1*) y 43 (*Gja1*). (n = 3).

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001; test t no pareado de dos colas; las barras de error indican error estándar.

Fig. 10. Muestra los resultados de RT-PCR cuantitativa utilizando un gen “housekeeping” distinto.

20 (A-B) Se realizó PCR cuantitativa a partir de muestras de ARN obtenidas de las células CD45<sup>-</sup> GFP<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> GFP<sup>-</sup> aisladas de la MO de los ratones transgénicos *Nes-Gfp*. Se obtuvieron resultados muy reproducibles utilizando la  $\beta$ -actina en vez de *Gapdh* como gen “housekeeping”. Expresión de genes críticos para el mantenimiento de las HSCs (A) o para la diferenciación mesenquimal (B). (n = 3-7). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001; test t no pareado de 25 dos colas. Las barras de error indican error estándar.

## Ejemplos

30 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores, que describen el uso de las células multipotenciales de la presente invención para el mantenimiento de la hematopoyesis.

### 35 Ejemplo 1

#### *Determinación de que las células Nes:GFP<sup>+</sup> (Nestina positivas) son células madre mesenquimales (MSCs)*

En primer lugar se planteó la hipótesis de las células Nes:GFP<sup>+</sup> fueran auténticas MSCs. De hecho, toda la capacidad unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) y clonogénica de la médula ósea (MO) residía en la fracción Nes:GFP<sup>+</sup> (Fig. 1A). El cultivo de todo el resto de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> de la MO a igual o mayor densidad no generó ningún CFU-F. Tras sembrar las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> en distintas condiciones de cultivo, incluyendo medio para “MSCs”, las células perdían rápidamente expresión de GFP (Fig. 1B) y se diferenciaban en progenitores mesenquimales, como se determinó utilizando el ensayo CFU-F. Con el fin de analizar más exhaustivamente su potencial de diferenciación, las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> aisladas por FACS se sembraron en condiciones que favorecen la diferenciación en los linajes osteoblástico, adipocítico y condrocítico. La fracción CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> demostró una robusta capacidad de diferenciación hacia linajes mesenquimales, mientras que la fracción CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> no generó ninguna descendencia. Distintos genes necesarios para la diferenciación en OBs (Fig. 1C), adipocitos (Fig. 1E) y condrocitos (Fig. 1G) se regularon al alza significativamente en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> durante 3 semanas de cultivo con medio de diferenciación. El fenotipo maduro mineralizante, adipocítico o condrocítico se confirmó tras un mes en cultivo (Fig. 1D, F, H), comprobando así su capacidad para diferenciación en múltiples linajes.

Dado que las células madre neurales, que expresan nestina, pueden autorrenovarse si se cultivan como esferas en flotación (Stemple y Anderson, 1991. Cell, 71: 973-985), adaptamos condiciones del cultivo de células madre de la cresta neural (Pardal *et al.*, 2007. Cell, 131: 364-377) y de los pericitos (Crisan *et al.*, 2008. Curr Protoc Stem Cell Biol, Chapter 2, Unit 2B 2 1-2B 2 13) para expandir las células Nes:GFP<sup>+</sup> en placas de cultivo de baja adherencia. Las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup>, pero no las CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> (aisladas por FACS), formaban esferas clonales cuando se sembraban a baja densidad (Fig. 1I). Estas esferas mesenquimales, denominadas aquí “mesesferas”, tenían un diámetro medio de  $85 \pm 6 \mu\text{m}$  y seguían expresando GFP tras 7-10 días en cultivo (Fig. 1J-K). La eficiencia de formación de esferas ( $6.5 \pm 0.7\%$ ) era similar a la de las células madre de la cresta neural (Molofsky *et al.*, 2003. Nature, 425: 962-967). La frecuencia de las esferas era notablemente similar ( $6.9 \pm 0.7\%$ ) cuando las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> se sembraron en placas de 96 pocillos (1 célula/pocillo). Se estudió la capacidad de autorrenovación de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> disociando las mesesferas y sembrándolas en las mismas condiciones. Se obtuvieron de media  $4.4 \pm 0.8$  mesesferas secundarias a partir de cada esfera primaria (n = 19), una frecuencia menor a la descrita a partir de células madre neurales (Molofsky *et al.*, 2003. Nature, 425: 962-967), posiblemente debido a la densa matriz extracelular producida por las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup>, la cual dificulta una disociación eficaz de las esferas sin comprometer la viabilidad celular. Tras dos semanas en cultivo, las mesesferas clonales, así como los

cultivos muticlones a partir de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> (Fig. 1L), seguían proliferando pero mostraban una pérdida progresiva en la expresión de GFP y comenzaban a diferenciarse en linajes mesenquimales (Fig. 1M). Con el fin de estudiar más exhaustivamente la capacidad de diferenciación mesenquimal de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup>, cruzamos ratones transgénicos *Nes-Gfp* con una línea que expresa la recombinasa Cre bajo el fragmento proximal de 2.3 Kb del promotor del colágeno  $\alpha 1(I)$  (*Col2.3-Cre*), expresado selectivamente en los OBs (Dacquin *et al.*, 2002. Dev Dyn, 224: 245-251), y con la línea reportera *ROSA26/loxP-stop-loxP-LacZ* (*R26R*). Después de dos semanas en cultivo, las mesesferas clonales obtenidas de animales triples transgénicos mostraron diferenciación espontánea en adipocitos, cuya identidad se confirmó mediante la tinción con Oil Red O, y en OBs identificados de forma inequívoca mediante la expresión de  $\beta$ -galactosidasa dirigida por el promotor *Col2.3* (~ 53%; 27/51; Fig. 1N-O). Cuando las mesesferas que habían mostrado ya signos de diferenciación adipocítica se sembraron en condiciones que favorecen la diferenciación en condrocitos, acumularon mucopolisacáridos característicos del cartilago (teñidos con "Alcian Blue"; Fig. 1P) y aumentaron la expresión de genes necesarios para la diferenciación condrocítica (Fig. 1Q). Estos datos demuestran claramente que las mesesferas Nes:GFP<sup>+</sup> son autorrenovables y multipotentes *in vitro*.

15

*Conclusiones de acuerdo con lo mostrado en la Fig. 1*

Según la Fig. 1A, toda la capacidad de generar unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) o actividad mesenquimal de la MO está contenida en la población Nes:GFP<sup>+</sup> (n = 12). En la Fig 1B el análisis de expresión por Q-PCR muestra una rápida reducción en la expresión de *Gfp* una semana después de sembrar las células con medio de formación de CFU-F.

20

En 1C se muestran distintos marcadores de determinación hacia el linaje osteoblástico (*alkaline phosphatase*, *Alpl*; *Runx2*) y genes asociados con la diferenciación en OBs ("*bone morphogenetic protein-4*", *Bmp4*; osteoglicina, *Ogn*; osterix, *Sp7*; osteocalcina, *Bglap*; osteoactivina, *Gpnm*). Dichos marcadores mostraron un aumento progresivo de expresión en CFU-Fs derivados de las células aisladas CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> cultivados durante 4 semanas en medio de diferenciación osteoblástica. En la Fig. 1D se observa la confirmación de la presencia de células osteoprogenitoras únicamente en la población CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> por medio de la detección de la actividad fosfatasa alcalina y de los depósitos de calcio. Las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> no generaron ninguna colonia. En la Fig. 1E se observa la diferenciación progresiva en adipocitos a partir de CFU-Fs obtenidos de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> cultivadas durante 3 semanas con medio de diferenciación adipocítica, evidenciada por un aumento en la expresión de la adiposina (*Cfd*) y del "*peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*" (*Pparg*). En la Fig. 1F se muestra cómo el fenotipo diferenciado maduro de los adipocitos procedentes de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> aisladas se confirmó en los cultivos de 4 semanas de duración mediante la tinción "Oil Red O"; por el contrario, las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> no generaron ninguna colonia (recuadro). La Fig. 1G muestra cómo la diferenciación progresiva en condrocitos de los CFU-Fs obtenidos de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> aisladas se manifestó por un aumento en la expresión de *Acan* durante las 3 semanas de cultivo con medio de diferenciación condrocítica (*Acan*). En la Fig. 1H se observa la acumulación de mucopolisacáridos Alcian blue<sup>+</sup> en pellets celulares procedentes de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> cultivadas durante 3 semanas con medio de diferenciación condrocítica. Tal como se muestra en la Fig. 1I, las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup>, pero no el resto de la población CD45<sup>-</sup> de la MO, forman esferas clonales tras 7 días de cultivo en baja densidad. La Fig. 1L muestra cómo las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> aisladas y cultivadas juntas en placas de poliestireno rápidamente perdieron expresión de GFP y se diferenciaron en linajes mesenquimales; los adipocitos GFP<sup>-</sup> se evidenciaron por los depósitos lipoides refringentes bajo campo claro. En la Fig. 1M se pueden observar adipocitos refringentes multi- y uniloculares, así como células migrando desde la capa externa de la esfera, adheridas a la superficie de la placa de cultivo. En la Fig. 1N-O se observa cómo tras 3 semanas en cultivo, el 53% de las mesesferas clonales mostró signos de diferenciación multi-linaje en OBs *Col2.3-LacZ*<sup>+</sup> OBs y adipocitos Oil red O<sup>+</sup>. En la Fig. 1Q se observa la diferenciación progresiva de las mesesferas clonales cultivadas durante 3 semanas en medio de diferenciación condrocítica, manifestada por la expresión aumentada de ("*sex determining region Y*-box 9" (*Sox9*), *Acan*) y de los colágenos tipo II $\alpha 1$  (*Col2a1*) y tipo XI $\alpha 2$  (*Col11a2*).

50

Ejemplo 2

*Demostración de que las células Nes:GFP<sup>+</sup> son distintas de otras células madre*

55

Tratando de dilucidar el origen y la identidad de las MSCs Nes:GFP<sup>+</sup>, se han realizado análisis comparativos del genoma completo de células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> de la MO con el de distintas células madre, obtenido de las bases de datos "Gene Expression Omnibus" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y "Stem-base" (<http://www.stembase.ca/?path=/>). Estos análisis han comprendido MSCs humanas y murinas, células madre embrionarias y neurales de ratón, células murinas multipotentes procedentes de carcinomas embrionarios, células satélite de ratón y células madre hematopoyéticas (HSCs) humanas (Tabla 1). Para poder comparar los datos procedentes del genoma humano y el murino, los genes de ratón homólogos a los humanos se identificaron utilizando HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>). Como resultado, la expresión de 9.000 genes pareados y con anotación en las bases de datos se utilizó finalmente para el estudio. Los análisis de agrupamiento jerárquico imparcial y de los componentes principales revelaron que las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> de MO eran muy distintas de las células madre neurales adultas. Aunque las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> son diferentes de todas las células madre incluidas en el análisis, su patrón de expresión fue más próximo a las células osteoprogenitoras humanas CD45<sup>-</sup> CD146<sup>+</sup> (Sacchetti *et al.*, 2007. Cell, 131: 324-336).

65

# ES 2 358 146 A1

TABLA 1

*Lista de experimentos con chips de ADN y sus números de acceso*

5 m, ratón; BM, médula ósea; NSC, célula madre neural; h, humano; FB, sangre fetal; PB, sangre periférica; EB, cuerpos embrionarios; MSC, célula madre mesenquimal; ESC, célula madre embrionaria.

10	1	mBM CD45-Nes:GFP+
	2	mBM CD45-Nes:GFP+
	3	mBM CD45-Nes:GFP+
15	4	GSM314045 mNSC
	5	GSM314046 mNSC
	6	GSM314047 mNSC
20	7	GSM314048 mNSC
	8	GSM148485 hBM CD45-CD146+
	9	GSM148487 hBM CD45-CD146+
25	10	GSM148488 hBM CD45-CD146+
	11	GSM148491 hBM CD45-CD146+
	12	GSM87697 hFB Lin-CD34+ CD38+
30	13	GSM87693 hFB Lin-CD34+ CD38+
	14	GSM87695 hFB Lin-CD34+ CD38+
	15	GSM86779 hPB Lin-CD34+ CD38-
35	16	GSM86781 hPB Lin-CD34+ CD38-
	17	GSM86783-4 hPB Lin-CD34+ CD38-
	18	GSM72616 J1-EB
40	19	GSM72618 J1-EB
	20	GSM72621 J1-EB
	21	GSM93543 P19
	22	GSM93541 P19
45	23	GSM93545 P19
	24	GSM86489 mBM CD45-CD31-CD34 low/-
	25	GSM86492 mBM CD45-CD31-CD34 low/-
50	26	GSM86495 mBM CD45-CD31-CD34 low/-
	27	GSM86435 mBM CD34+ clonal MSC
	28	GSM86438 mBM CD34+ clonal MSC
55	29	GSM86441 mBM CD34+ clonal MSC
	30	GSM86510 mf Sox9+ Col2+ MSC
	31	GSM86504 mf Sox9+ Col2+ MSC
60	32	GSM86507 mf Sox9+Col2+ MSC

65

## ES 2 358 146 A1

	33	GSM73026 mMuscle Satellite Cell
	34	GSM73029 mMuscle Satellite Cell
5	35	GSM73032 mMuscle Satellite Cell
	36	GSM72622 J1-ESC
	37	GSM72624 J1-ESC
10	38	GSM72626 J1-ESC
	39	GSM194075 hBM MSC
	40	GSM194076 hBM MSC
15	41	GSM194077 hBM MSC
	42	GSM194078 hBM MSC
	43	GSM194079 hBM MSC
20	44	GSM252290 mNSC
	45	GSM252291 mNSC
	46	GSM252292 mNSC
25	47	GSM252296 mNSC

---

Se realizaron análisis ontológicos genéticos de los transcritos que estaban significativamente regulados al alza o a la baja en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> de la MO, comparado con todas las demás células madre estudiadas. Estos análisis revelaron que la mayoría de los genes regulados al alza estaban implicados en procesos metabólicos y biosintéticos, mientras que la mayor parte de los genes regulados a la baja estaban involucrados en mitosis y división celular. Estos resultados indican que las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> de la MO son relativamente quiescentes pero muy activas metabólicamente.

### Ejemplo 3

#### *Demostración de que las células Nes:GFP<sup>+</sup> forman un nicho único perivascular*

Las HSCs se pueden identificar y aislar con gran pureza utilizando una combinación de marcadores SLAM (Kiel *et al.*, 2005. Cell, 121: 1109-1121). Con el fin de evaluar la relación espacial entre las células Nes:GFP<sup>+</sup> y las HSCs, se realizó inmunohistoquímica en crio-secciones de MO de ratones transgénicos *Nes-Gfp* utilizando marcadores de linajes hemopoyéticos (anti-Ter119, Gr-1, CD3e, B220 y Mac-1), CD48 y CD150 (Fig. 2A-B y Fig. 3). Las células HSCs CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> representaban una subpoblación muy pequeña (~0.005%) de las células nucleadas de MO. A pesar de la escasa frecuencia tanto de las HSCs como de las células Nes:GFP<sup>+</sup>, la inmensa mayoría (88%; 37/42) de las células CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> estaban localizadas a menos de 5 diámetros celulares de las células Nes:GFP<sup>+</sup>, y la mayoría (60%; 25/42) tenía una localización directamente adyacente a las células Nes:GFP<sup>+</sup> distribuidas en los sinusoides (62%) o el endostio (26%; Fig. 2A, B, Fig. 3). La inferencia estadística de la distribución de *Poisson* esperada para las células Nes:GFP<sup>+</sup> en el área de muestreo, demuestra que la co-localización observada de las células CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> y las Nes:GFP<sup>+</sup> es altamente significativa ( $p < 10^{-16}$ ). Se cultivó MO total en condiciones que promueven el crecimiento mieloide (tipo Dexter) con el fin de determinar si las células Nes:GFP<sup>+</sup> contribuyen a la capa estromal. A pesar del bajo número de células Nes:GFP<sup>+</sup> detectables en estos cultivos, estas células se localizaban frecuentemente asociadas con “cobblestone-forming areas”, enriquecidas en progenitores hemopoyéticos (Fig. 2C). Por tanto, estos resultados sugieren una estrecha asociación física entre las células Nes:GFP<sup>+</sup> y las HSCs en la MO.

### Ejemplo 4

#### *Demostración de que las células nestina<sup>+</sup> son necesarias para el anidamiento de las HSCs en la MO*

La elevada expresión de *Cxcl12*, *Vcam1*, *Kit1*, *Il7* y *Angpt1* en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> y su marcada reducción durante la movilización inducida por el factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) o tras la estimulación  $\beta$ -adrenérgica sugerían que las células nestina<sup>+</sup> podrían regular la atracción de las HSCs y su tráfico en la MO. Para poder determinar si las células nestina<sup>+</sup> jugaban un papel importante en el anidamiento de las HSCs en la MO, se transplantaron  $5 \times 10^6$  células nucleadas de MO de animales congénicos *wild-type* en ratones *Nes-Cre/iDTR*, *Nes-Cre<sup>ERT2</sup>/iDTR* y controles *iDTR* letalmente irradiados, siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Katayama *et al.*,

2006. Cell, 124: 407-421). El anidamiento de CFU-Cs en la MO se redujo en un 73% en los ratones *Nes-Cre/iDTR* y en un 90% en los animales *Nes-Cre<sup>ERT2</sup>/iDTR* (Fig. 4N), indicando que las células nestina<sup>+</sup> son de hecho necesarias para el anidamiento de progenitores hemopoyéticos en la MO.

5 Con el fin de determinar si las células nestina<sup>+</sup> de la MO regulaban directamente el anidamiento de las HSCs, se visualizó mediante microscopía intravital la migración de HSCs previamente aisladas con elevado grado de purificación y posteriormente marcadas y trasplantadas en ratones transgénicos *Nes-Gfp* irradiados letalmente. Dado que estos estudios de imagen *in vivo* se pueden realizar sólo en la MO del cráneo, pero no en los huesos largos (Lo Celso *et al.*, 2009. Nature, 457: 92-96), se validó primero el modelo de calvaria comparando la frecuencia, distribución y propiedades fisiológicas (capacidad de formar CFU-C y mesesferas) de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> aisladas de la MO del cráneo y de los huesos largos. Las células Nes:GFP<sup>+</sup> de la calvaria eran también perivasculares, como se comprobó por microscopía intravital de ratones transgénicos *Nes-Gfp* inyectados i.v. con Qdot para teñir la vasculatura (Fig. 5). La frecuencia de formación de mesesferas de las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> obtenidas de la MO craneal era idéntica a la encontrada en la MO de los huesos largos, y también exclusiva dentro de la población CD45<sup>-</sup>. Las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> también contenían toda la actividad CFU-F de la MO craneal. La frecuencia y morfología de las células Nes:GFP<sup>+</sup> de la MO del cráneo no se afectaron por la irradiación letal, en concordancia con la característica radio-resistencia de las MSCs. Las células LSK CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> se aislaron por citometría de flujo, se tiñeron con un colorante lipofílico fluorescente y se inyectaron i.v. en ratones transgénicos *Nes-Gfp* adultos irradiados letalmente. El anidamiento de las HSCs en la MO se visualizó directamente en la MO craneal 2, 48 y 96 h más tarde, mediante una combinación de microscopía confocal y "two-photon" (Lo Celso *et al.*, 2009. Nature, 457: 92-96). Se escaneó toda la MO craneal y se obtuvieron proyecciones Z a partir de las cuales se calculó la distancia más corta de las HSCs que habían anidado en la MO respecto de las células Nes:GFP<sup>+</sup> y la superficie del hueso (Fig. 4O). Los análisis realizados muestran claramente que las HSCs anidaron rápidamente cerca de las células Nes:GFP<sup>+</sup> de la MO (Fig. 4O-Q), indicando que las células nestina<sup>+</sup> dirigen la migración de las HSCs en la MO.

#### Ejemplo 5

*Demostración de que las células Nestina positivas son necesarias para el mantenimiento de las HSCs en la médula ósea*

30 Para determinar si las células nestina<sup>+</sup> son de hecho necesarias para el mantenimiento de las HSCs en la MO, intentamos eliminarlas cruzando los ratones *Nes-Cre* con una línea que expresa de manera inducible por Cre el receptor para la toxina diftérica (DT) (Buch *et al.*, 2005. Nat Methods, 2: 419-426) (*iDTR*) y con la línea reportera *ROSA26/loxP-stop-loxP-GFP* (*ROSA-GFP*) (Mao *et al.*, 2001. Blood, 97: 324-326). Una única inyección de DT (4 µg/kg, i.p.) eliminó completamente en 24-48 h las células GFP<sup>+</sup> de la MO (Fig. 4A), y provocó una reducción del ~ 45% en la celularidad total de la MO (Fig. 4B), asociada con un incremento del ~ 40% en las células teñidas con yoduro de propidio, probablemente debido a la brusca reducción de citocinas y factores de crecimiento críticos para distintos progenitores hemopoyéticos (como IL-7, el ligando de c-kit y M-CSF) que son producidos en grandes cantidades por las células nestina<sup>+</sup> de la MO. También se detectó un incremento de 2.3 veces en el número de progenitores hemopoyéticos Lin<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> en el bazo de los ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR*, comparado con controles transgénicos sencillos, 24-48 h después del tratamiento con DT (Fig. 4C), sugiriendo una migración extramedular de los progenitores hemopoyéticos.

45 Es de destacar que las HSCs resultaron ser extremadamente sensibles a la depleción celular selectiva en los ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR*, como se manifestó por una reducción del ~ 75% en el número de células LSK (Fig. 4D) y del ~ 58% en el número de células LSK CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> (Fig. 4E) de la MO. Se estudió si esta mayor reducción en las HSCs se debía a apoptosis, pero no se detectó ninguna diferencia entre los dos grupos de animales en la frecuencia de células LSK CD48<sup>-</sup> TUNEL<sup>+</sup> o LSK CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> TUNEL<sup>+</sup> (Fig. 6). La reducción de progenitores hemopoyéticos en la MO estaba directamente causada por la depleción celular selectiva en la MO, ya que el tratamiento con DT de los cultivos primarios de MO de los ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR* redujo el número de progenitores hemopoyéticos en un ~ 70%, comparado con controles transgénicos sencillos (Fig. 7). El tratamiento con DT de los ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR* y triples transgénicos *Nes-Cre/ROSA-Gfp/iDTR* fue letal en el 50% de los animales después de 24 h y en el 80% de ellos 48 h más tarde (n = 10), mientras que no afectó a la viabilidad de los ratones controles dobles transgénicos *Nes-Cre/ROSA-Gfp* y transgénicos sencillos (Fig. 8A). A pesar de la reducción en la celularidad total de la MO, la permeabilidad vascular, la histología y el hemograma eran normales (Fig. 8B-F), sugiriendo que la mortalidad no se debía a un fallo hematopoyético sino a la depleción de las células nestina<sup>+</sup> o su progenie en órganos vitales, como el corazón y/o el cerebro. En las Fig. 8B-C se observa cómo el colorante FITC-Dextran, preparado e inyectado i.v., como se ha descrito anteriormente (von Andrian, 1996), en los animales *Nes-Cre/iDTR* tratados con DT, permanecía en la vasculatura de la MO craneal (Fig. 8C), como ocurría en los animales controles (Fig. 8B), indicando la ausencia de daño vascular. En las Fig. 8D-E se observa cómo la histología de la MO de los animales *Nes-Cre/iDTR* tratados con DT (8E) es similar a la de los animales controles (8D). La Fig. 8F muestra cómo la depleción celular selectiva en los ratones *Nes-Cre/iDTR* no afectó al hemograma o al número de progenitores circulantes. La cantidad de eritrocitos (RBC), hemoglobina (Hgb), hematocrito (Hct), plaquetas (Plt), leucocitos (WBC) y progenitores hemopoyéticos (CFU-C) en la sangre no cambiaron significativamente en los ratones *Nes-Cre/iDTR* y *Nes-Cre/iDTR/ROSA-Gfp* 24-48 h después del tratamiento con DT, comparado con los niveles observados en animales transgénicos inyectados con PBS o en ratones controles tratados con DT.

*Conclusiones basadas en lo mostrado en la Fig. 4*

En la Fig. 4A-E se observa que tras la ablación celular selectiva en ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/iDTR*, los progenitores hemopoyéticos se desplazan de la MO a sitios extramedulares. La Fig. 4A muestra cómo una única inyección de toxina diftérica (DT, 4 µg/kg, i.p.) en ratones triples transgénicos *Nes-Cre/ROSA-Gfp/iDTR* eliminó completamente la población GFP<sup>+</sup> de la MO después de 24-48 h, como se reveló por la ausencia de células GFP<sup>+</sup>, comparado con los niveles normales en ratones controles triples transgénicos inyectados con PBS o en ratones dobles transgénicos *Nes-Cre/ROSA-Gfp* inyectados con DT. En la Fig. 4B se observa la celularidad reducida en la MO de los fémures y tibias de los ratones *Nes-Cre/iDTR* y *Nes-Cre/iDTR/ROSA-Gfp* 24-48 h tras el tratamiento con DT, el cual no afectó a los animales que no tenían el transgén *iDTR*, como control. En la Fig. 4C se muestra la detección de un incremento de 2.8 veces en el número de células Lin<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> detectadas en el bazo de los ratones *Nestin-Cre/iDTR* 24-48h después de la inyección con DT, comparado con animales controles dobles transgénicos inyectados con PBS o transgénicos sencillos tratados con DT. En la Fig. 4D-E se observa una reducción en el número de células HSCs de la MO tras la ablación celular selectiva en los ratones *Nes-Cre/iDTR*. El tratamiento con DT en los ratones *Nes-Cre/iDTR* y *Nes-Cre/ROSA-Gfp/iDTR* causó 24-48 h más tarde una reducción del (D) ~ 75% en el número de células Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup> (LSK) y del (E) ~ 58% en las células LSK CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> de la MO. Las Fig. 4F-I muestran cómo las células nestina<sup>+</sup> de la MO son necesarias para el anidamiento de las HSCs y de los progenitores hemopoyéticos. Por ejemplo, en la Fig. 4F se observa cómo la depleción de las células nestina<sup>+</sup> reduce el anidamiento de los progenitores hemopoyéticos en la MO. Los ratones *Nes-Cre/iDTR*, *Nes-Cre<sup>ERT2</sup>/iDTR* y los controles *iDTR* se inyectaron con DT (4 mg/kg, i.p.) y se irradiaron letalmente (1.2 Gy, una dosis) 16-20 h después. Se inyectaron i.v. cinco millones de células nucleadas obtenidas de la MO de animales congénicos en un volumen de 200 µl de PBS. La MO se sembró 3 h más tarde en el medio para el crecimiento de unidades formadoras de colonias en cultivo (CFU-C). El número de CFU-Cs anidadas por cada fémur se corrigió para representar la MO total multiplicando por 16.9, ya que un fémur contiene aproximadamente el 5.9% de la MO total del ratón, como se describió anteriormente (Katayama *et al.*, 2006. Cell, 124: 407-421). Uno o dos animales irradiados (de la misma edad, genotipo y género) no recibieron trasplante en cada experimento, para poder corregir los datos en caso de encontrar progenitores residuales del receptor. La eliminación selectiva de las células nestina<sup>+</sup> en los ratones *Nes-Cre/iDTR* y *Nes-Cre<sup>ERT2</sup>/iDTR* comprometió significativamente el anidamiento de progenitores hemopoyéticos en la MO. Por otra parte, en la Fig. 4G-I se observa cómo las HSCs anidan rápidamente cerca de las células GFP<sup>+</sup> en la MO de los ratones transgénicos *Nes-Gfp*. Las células de la MO de ratones congénicos se tiñó con anticuerpos biotinilados frente a los marcadores de linajes hemopoyéticos (detectados con estreptavidina conjugada con “Pacific Orange”), a-c-kit conjugado con APC, a-Sca-1 conjugado con “Pacific Blue”, a-CD150 conjugado con PE y a-CD48 conjugado con FITC. Las células LSK CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> se aislaron y se tiñeron con Vybrant DyD (Invitrogen). Un número de HSCs entre 5.000 y 11.000 se inyectó i.v. en ratones transgénicos *Nes-Gfp* letalmente irradiados como se ha descrito en estudios previos (Lo Celso *et al.*, 2009. Nature, 457: 92-96).

Ejemplo 6

*Determinación de la expresión y regulación de genes de mantenimiento de las HSCs por las células Nes:GFP<sup>+</sup>*

Con el fin de estudiar con mayor profundidad la regulación del nicho de las células madre hematopoyéticas (NH, del inglés *haematopoietic stem-cell niche*) por el factor G-CSF y el Sistema Nervioso Central (SNS), se analizó la expresión de genes que regulan el mantenimiento de las HSCs y su atracción en la MO (CXCL12/SDF-1, ligando de c-kit, angiopoyetina-1, interleucina-7, “vascular cell adhesion molecule-1”, osteopontina y caderina-N) en células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> aisladas de la MO de ratones tratados con G-CSF o inyectados con vehículo, como en estudios previos (Katayama *et al.*, 2006. Cell, 124: 407-421). La expresión de estos genes fue extremadamente elevada (próxima o superior a la de *Gapdh*) en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> y, con la excepción de *Angpt1*, de 50 a 800 veces superior que en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> de la MO. Además, la expresión de estos genes (excepto osteopontina y caderina-N) disminuyó significativamente en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup>, pero no en las CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup>, después de la movilización de las HSCs inducida por G-CSF (Fig. 9A) o tras la estimulación del receptor adrenérgico β<sub>3</sub> (Fig. 9B). El uso de un gen “housekeeping” diferente mostró resultados muy similares (Fig. 10). La expresión de las conexinas 45 y 43 fue también de 200 a 500 veces superior en las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> que en las CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>-</sup> (Fig. 9C), sugiriendo la existencia de acoplamiento electromecánico entre las células CD45<sup>-</sup> Nes:GFP<sup>+</sup> inervadas por terminales nerviosos simpáticos (Katayama *et al.*, 2006. Cell, 124: 407-421; Mendez-Ferrer *et al.*, 2008. Nature, 452: 442-447; Yamazaki y Allen, 1990. Am J Anat, 187: 261-276). Por tanto, las citoquinas, las hormonas y el SNS regulan tanto la atracción de las HSCs como la formación del hueso en el nicho de la MO por medio del control directo de las MSCs nestina<sup>+</sup>, donde la expresión de genes críticos para el mantenimiento de las HSCs y el destino celular (proliferación y diferenciación) está regulada de manera coordinada.

*Conclusiones acerca de la función de las células MSCs nestina<sup>+</sup> en el NH*

El papel relevante de las MSCs nestina<sup>+</sup> en el NH está basado en las siguientes evidencias: i) En la presente invención se ha mostrado en condiciones de homeostasis una marcada proximidad, no azarosa, de ambas células madre. Esta asociación física se produce tanto en el endostio como en el parénquima medular. ii) Las MSCs nestina<sup>+</sup> están inervadas por el SNS, enriquecidas en la expresión de Cxcl12 y del receptor adrenérgico β<sub>3</sub> funcional. iii) Las MSCs nestina<sup>+</sup> presentan niveles de expresión muy elevados de moléculas críticas para el mantenimiento y la quiescencia de las HSCs en el “nicho osteoblástico”, tales como angiopoyetina-1, osteopontina, caderina-N y ligando de c-kit.

En la presente invención muestran evidencias de que tanto la proliferación como la diferenciación osteoblástica de las MSCs nestina<sup>+</sup> de la MO se inducen selectivamente por PTH y se inhiben por G-CSF y las fibras simpáticas que inervan las células nestina<sup>+</sup>. Por tanto, estos resultados extienden a las MSCs observaciones previas del efecto inhibitorio del SNS en la formación del hueso y de la expansión de HSCs inducida por PTH (Adams *et al.*, 2007. Nat Biotechnol, 25: 238-243; Calvi *et al.*, 2003. Nature, 425: 841-846), ambos descritos como mediados exclusivamente por los OBs. iv) El G-CSF o los agonistas de receptores adrenérgicos  $\beta_3$ , cuya activación también promueve la salida de HSCs de la MO, redujeron significativamente la expresión de genes que controlan la atracción de las HSCs en el nicho de la MO (*Cxcl12*, *Kitl*, *Angpt1* y *Vcam1*). Los resultados que se muestran en la presente invención indican que la regulación coordinada de los linajes hemopoyéticos y mesenquimales también ocurre a nivel de las células madre, ya que los mecanismos homeostáticos neurales (SNS) y humorales (PTH) regulan en tándem el mantenimiento y la quiescencia de las HSCs y la proliferación y diferenciación de las MSCs. v) Es de destacar que los experimentos de depleción celular selectiva basados en dos líneas transgénicas independientes (ratones *iDTR* cruzados con animales *Nes-Cre* y *Nes-Cre<sup>ERT2</sup>*) resultaron en ambos casos en una rápida reducción en el número de células LSK CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> de la MO y en su movilización hacia el bazo. El hecho de que la depleción de células nestina<sup>+</sup> en cultivos primarios de MO también redujo el número de progenitores hemopoyéticos demuestra que el efecto fue directamente causado por la ablación celular selectiva en la MO. Por otro lado, esta reducción es más aguda y pronunciada que la descrita tras la eliminación selectiva de los OBs utilizando la expresión de timidina quinasa dirigida por *Col2.3* (Zhu *et al.*, 2007. Blood, 109: 3706-3712), apoyando el papel de las células nestina<sup>+</sup> en el NH. vi) Finalmente, se ha demostrado que las células nestina<sup>+</sup> son necesarias para el anidamiento de las HSCs en la MO utilizando dos métodos diferentes. En un grupo de experimentos, la eliminación de las células nestina<sup>+</sup>, utilizando ambos modelos de depleción basados en el DTR, comprometió el anidamiento de los progenitores hemopoyéticos en la MO de animales receptores irradiados letalmente. No se observó el mismo efecto en la migración de leucocitos, en línea con evidencias recientes que apoyan la existencia de mecanismos distintos que regulan el tráfico de células sanguíneas maduras vs inmaduras. En otro grupo de experimentos que las HSCs aisladas con elevado grado de pureza, marcadas e inyectadas en animales receptores letalmente irradiados, rápidamente (en menos de dos horas) anidan cerca de las células Nes:GFP<sup>+</sup> de la MO, como evidencia adicional del papel de las MSCs nestina<sup>+</sup> como células reguladoras de la atracción de las HSCs en el nicho de la MO. En conjunto, estos estudios indican un papel relevante de las MSCs nestina<sup>+</sup> en el NH.

Los estudios realizados permiten proponer la existencia de un nicho único en la MO formado por la asociación MSC-HSC, estrictamente regulado a nivel local por el microambiente y también a distancia mediante señales humorales y del sistema nervioso autónomo.

## Ejemplo 7

### 35 Materiales y métodos

#### 7.1. Animales

Se utilizaron ratones transgénicos *Nes-Gfp* (Mignone *et al.*, 2004. Cell Cycle, 6: 2161-2170), FVB-Tg(*Colla1-cre*)1Kry/Mmcd (Dacquin *et al.*, 2002. Dev Dyn, 224: 245-251), B6.Cg(SJL)-TgN(*Nes-cre*)1Kln (Tronche *et al.*, 1999. Nat Genet, 23: 99-103), *Nes-Cre<sup>ERT2</sup>*, C57BL/6-Gt(ROSA)26Sortm1(HBEGF)Awai/J (Buch *et al.*, 2005. Nat Methods, 2: 419-426), B6;129-Gt(ROSA)26Sortm2Sho/J (Mao *et al.*, 2001. Blood, 97: 324-326), *RCE:LoxP*, Tg(CAG-Bgeo/GFP)21Lbe/J (*ZEG*) y B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1Sor/J (Jackson Laboratories) y ratones congénicos C57BL/6-CD45.1 (Frederick Cancer Research Center). A menos que se indique en el pie de figura, todos los animales utilizados fueron adultos. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de uso y mantenimiento de animales de Mount Sinai School of Medicine.

#### 50 7.2. Extracción y cultivo de las células

Para extraer las células, la MO se eluyó con medio de FACS descrito en estudios previos (Molofsky *et al.*, 2003. Nature, 425: 962-967), constituido por medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen) suplementado con 1 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA, Sigma), 10 mM HEPES (Sigma) pH 7.4 y 1% penicilina-estreptomicina (PS, Invitrogen). Tras lisar los eritrocitos con 0.8% NH<sub>4</sub>Cl, la MO se procesó enzimáticamente del mismo modo descrito para aislar las células de la cresta neural del intestino postnatal (Molofsky *et al.*, 2003. Nature, 425: 962-967). Las células se enriquecieron inmuno-magnéticamente utilizando bolas magnéticas conjugadas con un anticuerpo anti-CD45 (Milteyi Biotec), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se aislaron las células CD45<sup>-</sup> GFP<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> GFP<sup>-</sup> por FACS. Para el ensayo de formación de esferas, las células se sembraron a densidad clonal (< 1,000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 35 mm (*StemCell Technologies*) o en pocillos únicos de placas de 96 pocillos (*Corning*) de adherencia ultra-baja. La composición del medio de cultivo se adaptó del de las células de la cresta neural (Pardal *et al.*, 2007. Cell, 131: 364-377) y del de los pericitos (Crisan *et al.*, 2008a. Curr Protoc Stem Cell Biol, Chapter 2, Unit 2B 2 1-2B 2 13) y contenía un 15% de extracto de embrión de pollo, preparado como se ha descrito anteriormente (Stemple y Anderson, 1992. Cell, 71: 973-985),  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 mM, 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), 1% de suplemento N2 y 2% de suplemento B27 (Invitrogen), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-basic, “insulin-like growth factor-1” (IGF-1), “epidermal growth factor” (EGF), “platelet-derived growth factor” (PDGF), “oncostatin M” (OSM) (Peprotech) y “leukemia inhibitory factor” (ESGRO<sup>®</sup>, Millipore) (todos a 20 ng/ml) en DMEM/F12 (1:1)/human endothelial (Invitrogen) (1:2). Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en un incubador de cámara de agua

y se dejaron sin tocar durante una semana para evitar la agregación celular. La mitad del medio de cultivo se cambió semanalmente.

### 5 7.3. Diferenciación *in vitro*

La diferenciación osteoblástica fue inducida cultivando las células durante 4 semanas con 50  $\mu\text{g/ml}$  ácido L-ascórbico 2-fosfato, glicerofosfato 10 mM (Sigma) y 15% FBS en a-MEM suplementado con PS (Invitrogen). La diferenciación adipocítica fue inducida con dexametasona 1  $\mu\text{M}$ , indometacina 100  $\mu\text{M}$ , 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 10 0.5 mM, 10  $\mu\text{g/ml}$  insulina (Sigma) y 10% FBS en a-MEM suplementado con PS. La diferenciación condrocítica fue inducida en cultivos de CFU-F confluentes preparados como se ha descrito anteriormente (Mendez-Ferrer *et al.*, 2008. Nature, 452: 442-447), y también en pellets celulares, con dexametasona  $10^{-7}$  M, ácido L-ascórbico  $10^{-4}$  M, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, 1x ITS+1 (10 mg/L insulina bovina, 5.5 mg/L transferrina, 5  $\mu\text{g/L}$  selenita de sodio, 4.7  $\mu\text{g/ml}$  ácido linoleico, y 0.5 mg/ml albúmina de suero bovino; Sigma) y 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 (PeproTech) en DMEM (Invitrogen) durante 4 semanas. Todos los cultivos se mantuvieron con 5%  $\text{CO}_2$  en un incubador de cámara de agua a 37°C, y la mitad del medio se cambió 2 veces por semana. Para estudiar la diferenciación en linajes mesenquimales, las células se lavaron con PBS suplementado con  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM (modPBS) y se fijaron durante 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído (Sigma) al 3% en modPBS. Para detectar la actividad fosfatasa alcalina, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con 50  $\mu\text{g/ml}$  Naftol AS-MX fosfato, 0.5% N,N-dimetilformamida y 0.6 mg/ml “Fast Red Violet LB” en Tris-HCl 0.1 M, pH 8.9. La formación de nódulos de calcio se examinó mediante la tinción de von Kossa. Para ello se lavaron las células 3 veces y se tiñeron con nitrato de plata al 5%, recién preparado, durante 30 min. Tras 3 lavados, la reacción se reveló con carbonato de sodio al 5% en formalina al 25% durante 5 min. Tras lavar 3 veces, las células se fijaron con tiosulfato de sodio al 5% durante 2 min y se dieron 3 lavados. Los adipocitos se tiñeron con “Oil Red O” de la siguiente manera: se lavaron las células con 60% isopropanol y se dejaron secar completamente. Se preparó una dilución 6:4 en agua destilada de una solución stock conteniendo 0.35 g/ml Oil Red O en isopropanol (Sigma), filtrada 20 min más tarde. Las células se incubaron durante 10 min con esta solución y se lavaron 4 veces. Para teñir los mucopolisacáridos característicos del cartílago, los cultivos y pellets celulares fijados se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 1% Alcian blue 8GX (Sigma) en ácido acético al 3%, pH 2.5, y se lavaron 4 veces.

### 7.4. Trasplante *in vivo*

Los cubos cerámicos porosos ( $\sim 3 \text{ mm}^3$ ) conteniendo un 65% de hidroxiapatita de fosfato cálcico y un 35% de fosfato tricálcico (Ceraform<sup>®</sup>) se lavaron dos veces para eliminar pequeños fragmentos desprendidos de los cubos, se autoclavaron y se recubrieron con 0.1 mg/ml fibronectina de plasma bovino (Sigma). Para eliminar el aire de los osículos y asegurar el recubrimiento total de su superficie, los osículos se colocaron en un tubo conteniendo la solución de fibronectina y se agitaron durante 1 min mientras se aplicaba presión negativa mediante succión con una jeringa de 60 ml con una aguja de 21 g atravesando la tapa del tubo. Se reemplazó la tapa por una nueva y se repitió el mismo procedimiento. Los osículos cubiertos con fibronectina se dejaron secar toda la noche en una campana de flujo laminar. Las células recién aisladas se introdujeron en los osículos mediante el mismo proceso descrito, mientras que las esferas se depositaron sobre la superficie de los osículos. En ambos casos las células se dejaron adherir a los osículos, en el medio de crecimiento de las esferas, durante 24 h en el incubador. Los osículos se implantaron s.c. bajo la piel dorsal de animales adultos anestesiados, procedentes de la misma camada, pero que no tenían los transgenes.

### 7.5. Análisis histológicos

Dos meses después del trasplante, los animales anestesiados se inyectaron con 100 U de heparina sódica (i.p., Sigma) para evitar la coagulación, y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con  $\sim 20 \text{ ml}$   $\text{MgCl}_2$  2 mM en PBS frío, seguido de 100 ml paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0.2%, EGTA 5 mM y  $\text{MgCl}_2$  2 mM en PBS, pH 7.4, a 4°C. Los osículos se recuperaron y se post-fijaron durante 2 h a 4°C con la misma solución fijadora. Tras dos lavados con  $\text{MgCl}_2$  2 mM en PBS frío, los osículos se lavaron durante 10 min con  $\text{MgCl}_2$  2 mM, 0.01% desoxicolato sódico (Sigma) y 0.02% Nonidet P-40 (Roche) en PBS. Se realizó la tinción de X-gal con  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5 mM,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, 0.01% desoxicolato sódico (Sigma), 1 mg/ml 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosido (X-gal, BioSynth AG<sup>®</sup>) y 0.02% Nonidet P-40 (Roche) en PBS a 37°C y con movimiento durante toda la noche. Los osículos se descalcificaron parcialmente con EDTA 0.25 M durante 2 ó 3 días y se procesaron para sección con criostato (10  $\mu\text{m}$ ) utilizando una cuchilla de carburo de tungsteno (Diamond Knives) y portas cubiertos con 4x metacrilato y el sistema de transferencia con cintas adhesivas CryoJane (Instrumedics). La inmunohistoquímica con amplificación de la señal se realizó del mismo descrito anteriormente (Mendez-Ferrer *et al.*, 2008. Nature, 452: 442-447). La inmunohistoquímica para la detección de los marcadores SLAM se ha descrito en estudios previos (Kiel *et al.*, 2005. Cell, 121: 1109-1121).

### 65 7.6. Tratamiento *in vivo*

El isoproterenol o el agonista BRL37344 (2 mg/kg; Sigma) se inyectaron i.p. 2 h antes de sacrificar a los animales; los agonistas adrenérgicos estaban también presentes a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  durante la digestión enzimática y

## ES 2 358 146 A1

la separación celular por FACS, realizados a 37°C y temperatura ambiente, respectivamente. Los tratamientos con G-CSF (Katayama *et al.*, 2006. Cell, 124: 407-421) o PTH (Adams *et al.*, 2007. Nat Biotechnol, 25: 238-243) han sido descritos en estudios previos.

5

### 7.7. Extracción de RNA y PCR cuantitativa

Las células separadas por FACS se recuperaron directamente en solución de lisis y se extrajo el RNA utilizando el kit Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Invitrogen). La transcripción inversa se realizó con el *Reverse Transcription System* (Promega). El protocolo de PCR cuantitativa se ha descrito previamente (Mendez-Ferrer *et al.*, 2008. Nature, 452: 442-447). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se han incluido en la Tabla 2.

10

TABLA 2

15

*Secuencias de cebadores usados para la PCR cuantitativa*

Cebadores	Secuencia	Producto (pb)	Anillamiento (°C)
<i>Cxcl12_Fw</i>	SEQ ID NO: 1		
<i>Cxcl12_Rv</i>	SEQ ID NO: 2	118	60
<i>Gfp_Fw</i>	SEQ ID NO: 3		
<i>Gfp_Rv</i>	SEQ ID NO: 4	280	60
<i>Kitl_Fw</i>	SEQ ID NO: 5		
<i>Kitl_Rv</i>	SEQ ID NO: 6	65	60
<i>Angpt1_Fw</i>	SEQ ID NO: 7		
<i>Angpt1_Rv</i>	SEQ ID NO: 8	138	60
<i>IL7_Fw</i>	SEQ ID NO: 9		
<i>IL7_Rv</i>	SEQ ID NO: 10	102	60
<i>Vcam1_Fw</i>	SEQ ID NO: 11		
<i>Vcam1_Rv</i>	SEQ ID NO: 12	121	60
<i>Spp1_Fw</i>	SEQ ID NO: 13		
<i>Spp1_Rv</i>	SEQ ID NO: 14	149	60
<i>Ogn_Fw</i>	SEQ ID NO: 15		
<i>Ogn_Rv</i>	SEQ ID NO: 16	122	60
<i>Alpl_Fw</i>	SEQ ID NO: 17		
<i>Alpl_Rv</i>	SEQ ID NO: 18	73	60
<i>Gpnmb_Fw</i>	SEQ ID NO: 19		
<i>Gpnmb_Rv</i>	SEQ ID NO: 20	65	60
<i>Runx2_Fw</i>	SEQ ID NO: 21		
<i>Runx2_Rv</i>	SEQ ID NO: 22	128	60
<i>Sp7_Fw</i>	SEQ ID NO: 23		
<i>Sp7_Rv</i>	SEQ ID NO: 24	275	60

65

ES 2 358 146 A1

	<i>Bglap_Fw</i>	SEQ ID NO: 25		
5	<i>Bglap_Rv</i>	SEQ ID NO: 26	183	60
	<i>Bmp4_Fw</i>	SEQ ID NO: 27		
	<i>Bmp4_Rv</i>	SEQ ID NO: 28	69	60
10	<i>Pparg_Fw</i>	SEQ ID NO: 29		
	<i>Pparg_Rv</i>	SEQ ID NO: 30	100	60
	<i>Cfd_Fw</i>	SEQ ID NO: 31		
15	<i>Cfd_Rv</i>	SEQ ID NO: 32	50	60
	<i>Acan_Fw</i>	SEQ ID NO: 33		
20	<i>Acan_Rv</i>	SEQ ID NO: 34	269	60
	<i>Sox9_Fw</i>	SEQ ID NO: 35		
	<i>Sox9_Rv</i>	SEQ ID NO: 36	186	60
25	<i>Gjc1_Fw</i>	SEQ ID NO: 37		
	<i>Gjc1_Rv</i>	SEQ ID NO: 38	245	60
	<i>Gja1_Fw</i>	SEQ ID NO: 39		
30	<i>Gja1_Rv</i>	SEQ ID NO: 40	119	60
	<i>Gapdh_Fw</i>	SEQ ID NO: 41		
35	<i>Gapdh_Rv</i>	SEQ ID NO: 42	77	60

Nota: La abreviatura Fw se refiere a cebadores con secuencias directas (del inglés *Forward*) y la abreviatura Rv se refiere a cebadores con secuencias inversas (del inglés *Reverse*). El tamaño del fragmento que se consigue amplificar con cada uno de los pares de cebadores Fw/Rv correspondientes está medido en pares de bases (pb). El parámetro "anillamiento" indica la temperatura de hibridación óptima entre los cebadores Fw y Rv y la secuencia de ADN molde.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de al menos una célula madre multipotencial aislada para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro*, donde si la célula madre multipotencial procede de un embrión humano, dicha célula se obtiene sin destruir o afectar a la viabilidad de dicho embrión.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde la célula madre multipotencial es una célula mesenquimal.
3. Uso según la reivindicación 2, donde la célula madre mesenquimal es una célula Nestina positiva.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la célula madre constituye una población celular aislada.
5. Uso de al menos una célula madre multipotencial para la fabricación de un medicamento para el mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero, donde si la célula madre multipotencial procede de un embrión humano, dicha célula se obtiene sin destruir o afectar a la viabilidad de dicho embrión.
- 20 6. Uso de al menos una célula madre multipotencial para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad asociada con una disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis de un mamífero, donde si la célula madre multipotencial procede de un embrión humano, dicha célula se obtiene sin destruir o afectar a la viabilidad de dicho embrión.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, donde la enfermedad asociada a la disfunción del mantenimiento de la hematopoyesis es una enfermedad que cursa con una deficiencia en la mielopoyesis o en la linfopoyesis.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la célula madre multipotencial es una célula mesenquimal.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, donde la célula madre mesenquimal es una célula Nestina positiva.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde la célula madre constituye una población celular aislada.
- 35 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde el mamífero es un humano.
12. Método para el mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* que comprende:
- 40 a) poner en contacto al menos una célula madre multipotencial aislada con al menos una célula madre hematopoyética aislada, donde si la célula madre multipotencial procede de un embrión humano, dicha célula se obtiene sin destruir o afectar a la viabilidad de dicho embrión, e
- b) incubar el producto obtenido en el apartado (a) en un medio de cultivo adecuado para la división y/o diferenciación de la célula madre hematopoyética.
- 45 13. Método según la reivindicación 12, donde la célula madre multipotencial es una célula mesenquimal.
14. Uso según la reivindicación 13, donde la célula madre mesenquimal es una célula Nestina positiva.
- 50 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde la célula madre constituye una población celular aislada.
16. Método para determinar el mantenimiento de la capacidad hematopoyética de un mamífero que comprende:
- 55 a) analizar al menos un producto de expresión del gen que codifica para la proteína Nestina en las células de una muestra de tejido hematopoyético aislado de dicho mamífero y
- b) asignar la presencia de dicho producto de expresión analizado en el apartado (a) al mantenimiento de la capacidad hematopoyética del órgano del que procede dicho tejido.
- 60 17. Método para determinar el mantenimiento de la capacidad hematopoyética de un mamífero que comprende:
- 65 a) determinar la concentración de al menos un producto de expresión del gen que codifica para la proteína Nestina en las células de una muestra de tejido hematopoyético aislada de dicho mamífero,

## ES 2 358 146 A1

b) calcular la diferencia de la concentración del producto de la expresión del gen que codifica para la proteína Nestina determinada en el apartado (a) con respecto a la concentración de la expresión de dicho gen en un control positivo y/o negativo, y

5 c) asignar una diferencia significativa con respecto al control positivo, y/o la ausencia de una diferencia significativa con respecto al control negativo, calculadas en el apartado (b), al mantenimiento de la capacidad hematopoyética del tejido del que procede dicha muestra.

10 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde el mamífero es un humano.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

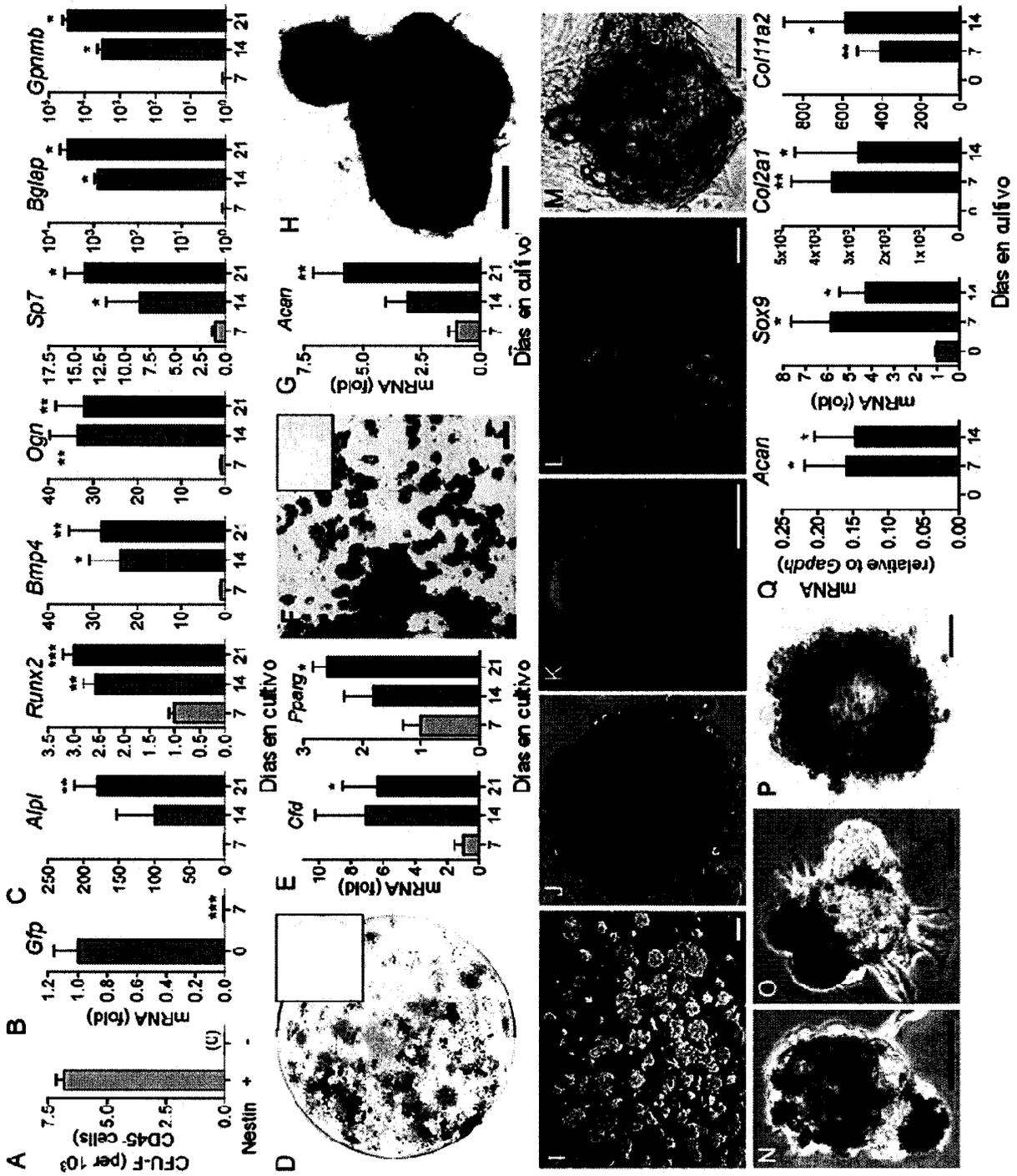
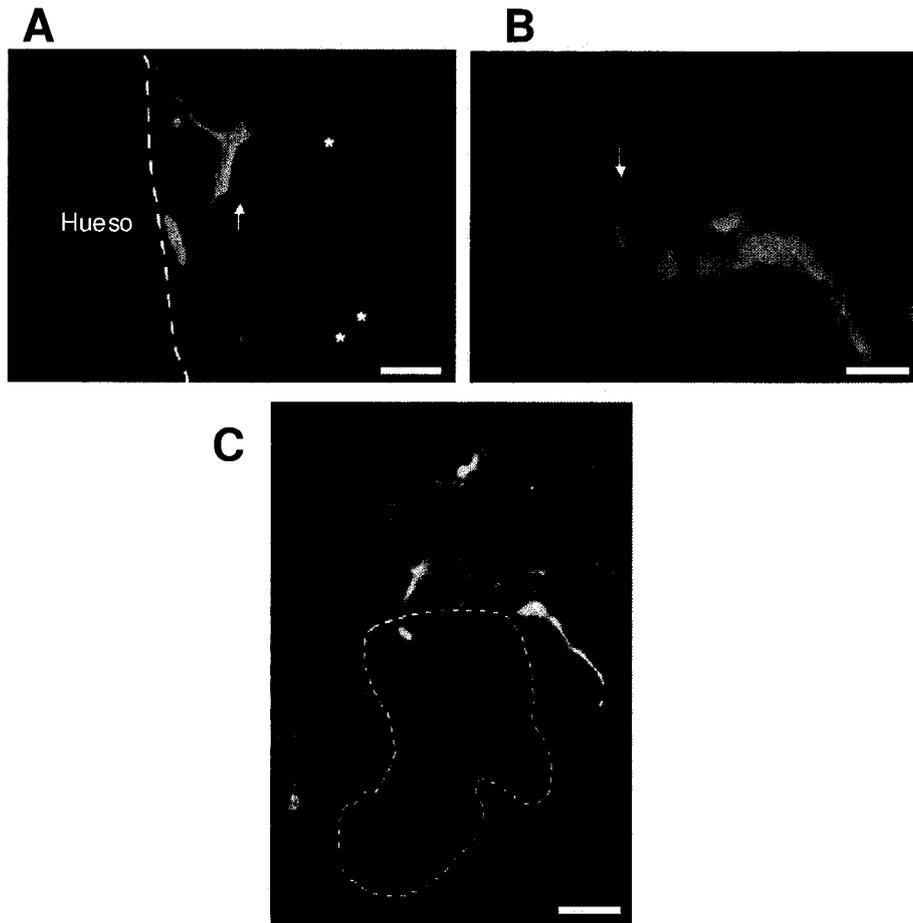
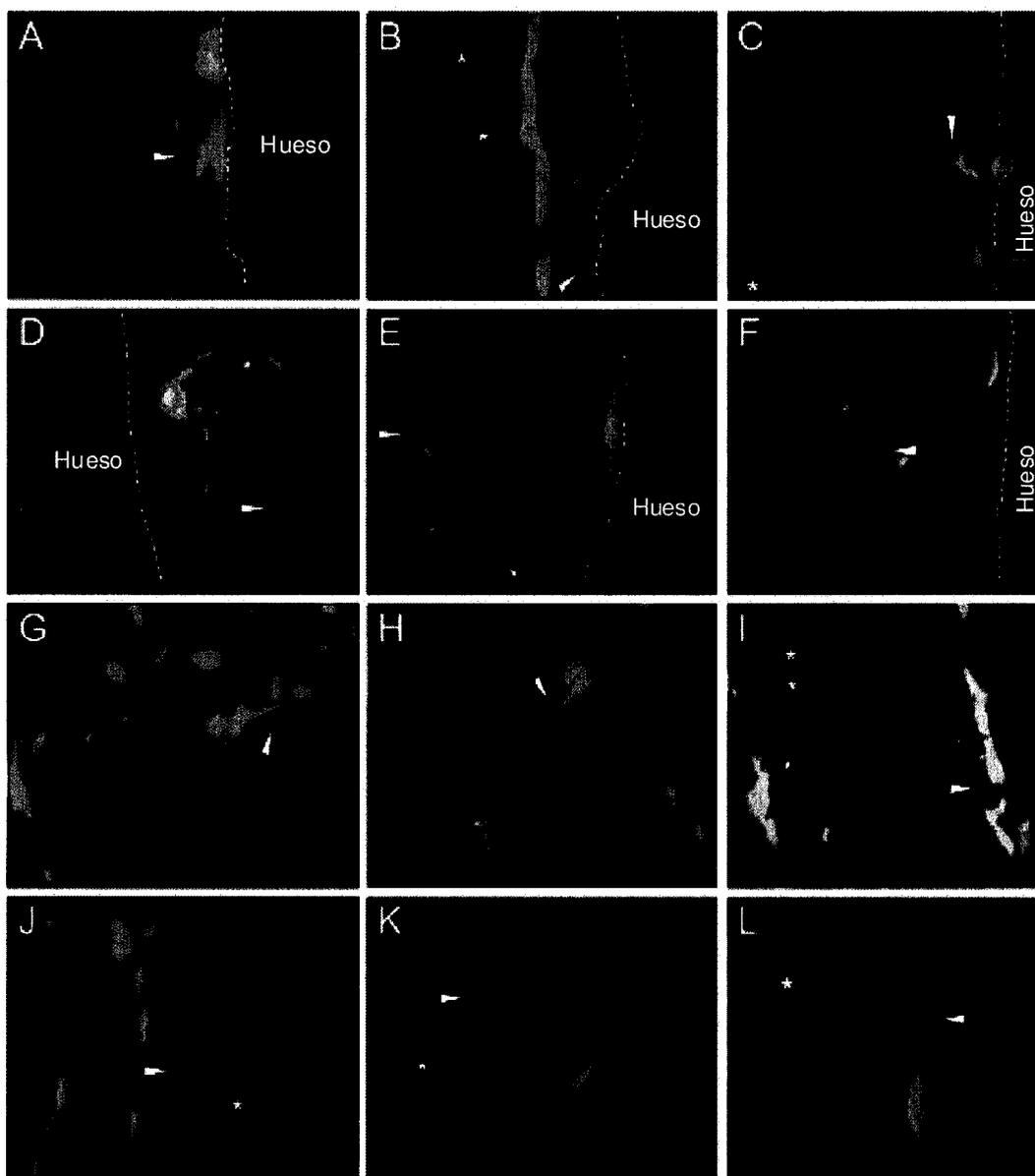


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**

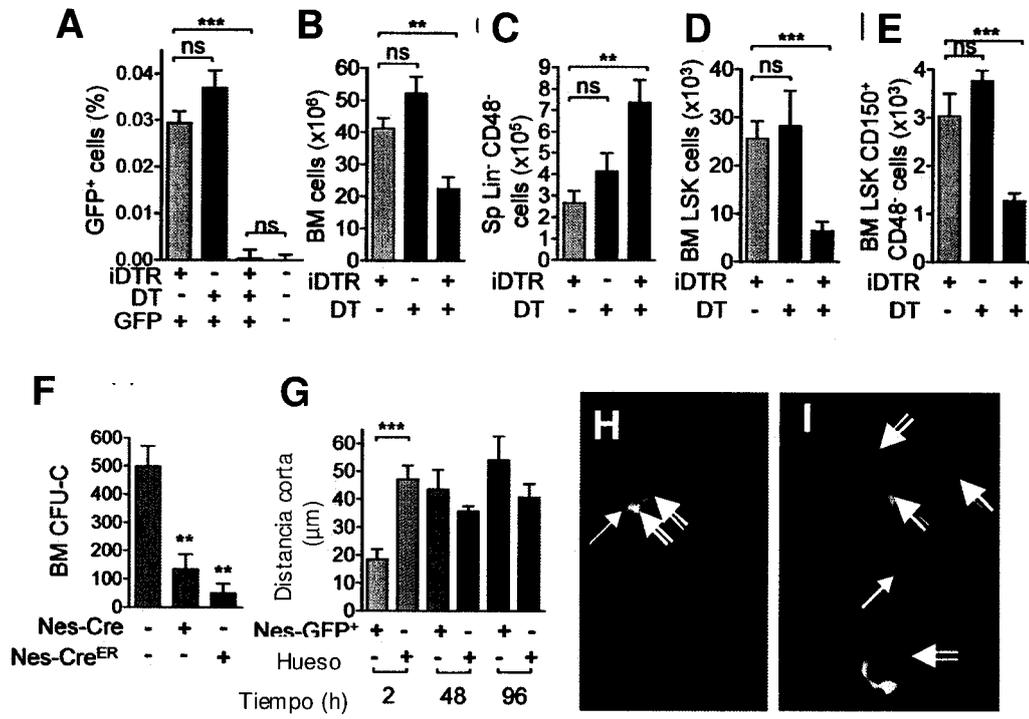


FIG. 4

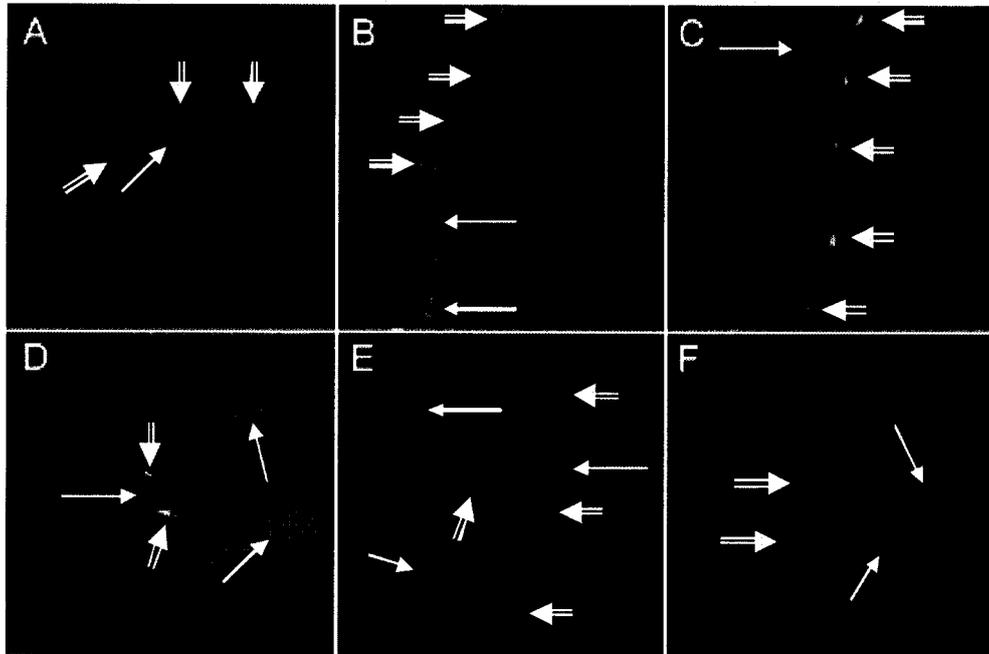


FIG. 5

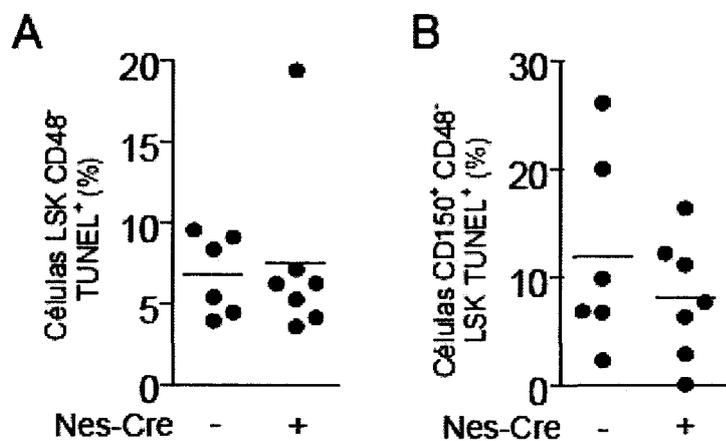


FIG. 6

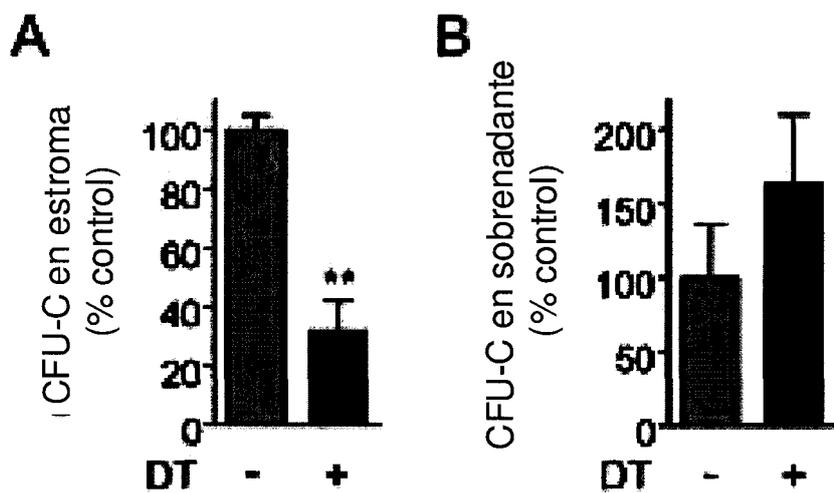
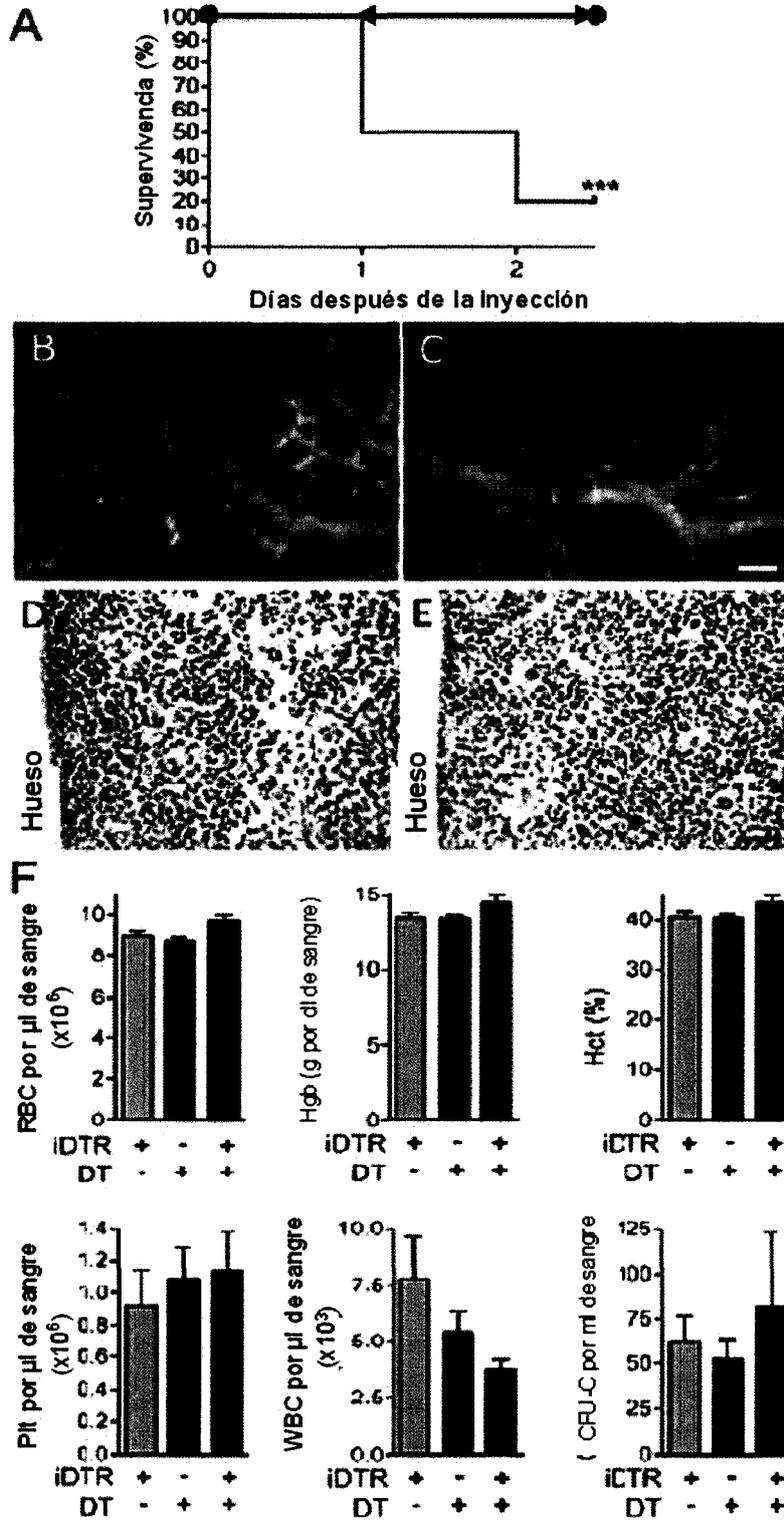


FIG. 7



**FIG. 8**

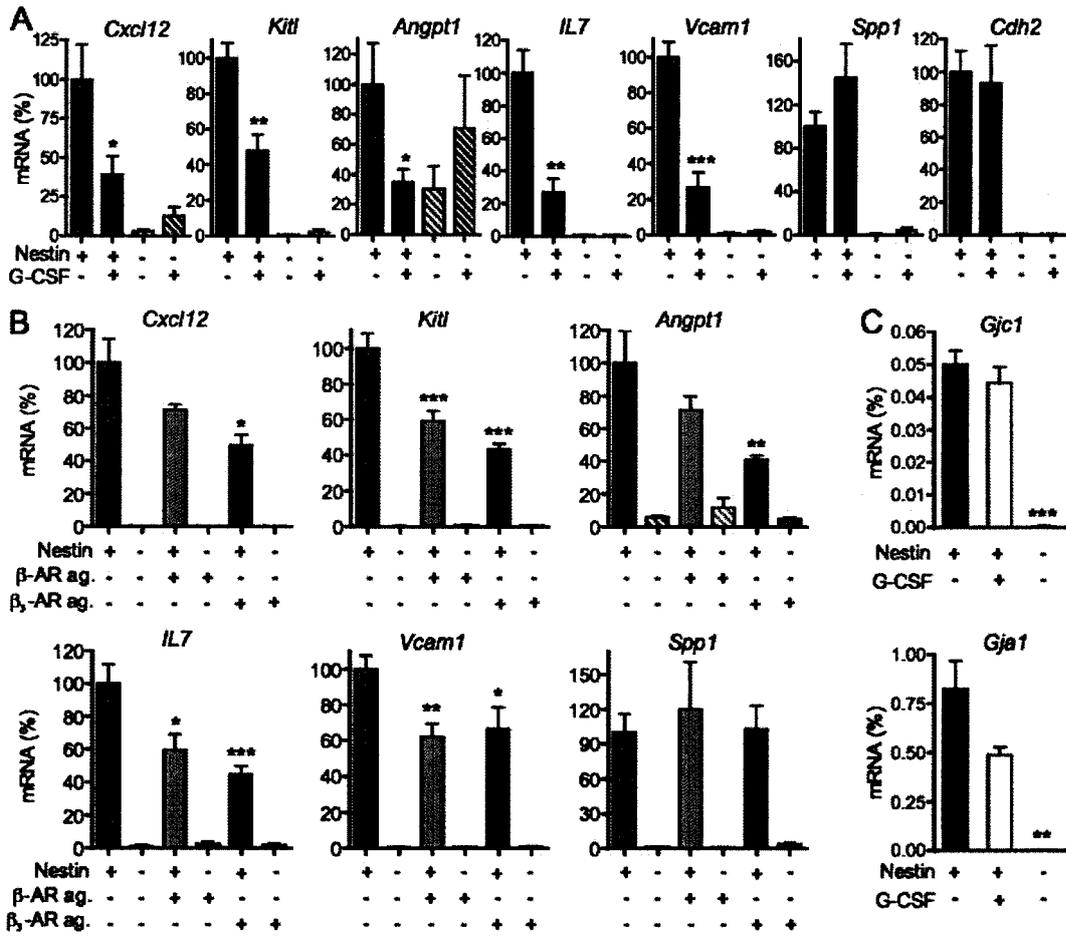


FIG. 9

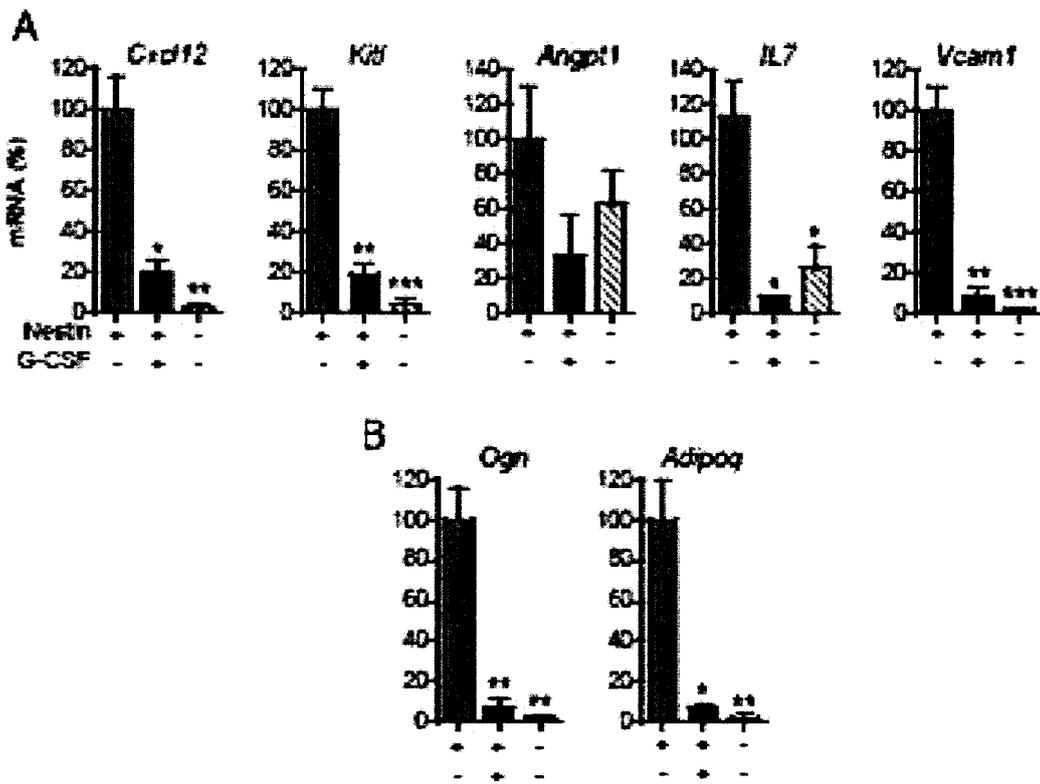


FIG. 10

# ES 2 358 146 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110>	FUNDACION PÚBLICA ANDALUZA PARA LA GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD EN SEVILLA	
5	Méndez Ferrer, Simón	
<120>	Uso de células mesenquimales Nestina positivas para el mantenimiento de la hematopoyesis	
10	<130> 1985.17	
	<160> 42	
15	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 17	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 1	
25	cgccaaggctc gtcgccg	17
	<210> 2	
	<211> 19	
30	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 2	
35	ttggctctgg cgatgtggc	19
	<210> 3	
	<211> 24	
40	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 3	
45	atcatggccg acaagcagaa gaac	24
	<210> 4	
	<211> 24	
50	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 4	
55	gtacagctcg tccatgccga gagt	24
	<210> 5	
	<211> 19	
60	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 5	
65	ccctgaagac tcgggccta	19

# ES 2 358 146 A1

	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> DNA	
5	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 6	
	caattacaag cgaaatgaga gcc	23
10	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 7	
	ctcgtcagac attcatcatc cag	23
20	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 8	
	caccttcttt agtgcaaagg ct	22
30	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 9	
	gtgctgctcg caagttgaag	20
40	<210> 10	
	<211> 21	
45	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 10	
	agttcaccag tgtttggtg c	21
50	<210> 11	
	<211> 22	
55	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 11	
	gacctgttcc agcgagggtc ta	22
60	<210> 12	
	<211> 26	
65	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	

## ES 2 358 146 A1

	<code>&lt;400&gt; 12</code>			
		<code>cttccatcct catagcaatt aaggtg</code>		26
5	<code>&lt;210&gt; 13</code>			
	<code>&lt;211&gt; 22</code>			
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>			
	<code>&lt;213&gt; <i>Mus musculus</i></code>			
10	<code>&lt;400&gt; 13</code>			
		<code>tccctcgatg tcatccctgt tg</code>		22
15	<code>&lt;210&gt; 14</code>			
	<code>&lt;211&gt; 22</code>			
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>			
20	<code>&lt;213&gt; <i>Mus musculus</i></code>			
	<code>&lt;400&gt; 14</code>			
		<code>ggcactctcc tggctctctt tg</code>		22
25	<code>&lt;210&gt; 15</code>			
	<code>&lt;211&gt; 22</code>			
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>			
30	<code>&lt;213&gt; <i>Mus musculus</i></code>			
	<code>&lt;400&gt; 15</code>			
		<code>accataacga cctggaatct gt</code>		22
35	<code>&lt;210&gt; 16</code>			
	<code>&lt;211&gt; 21</code>			
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>			
40	<code>&lt;213&gt; <i>Mus musculus</i></code>			
	<code>&lt;400&gt; 16</code>			
45		<code>aacgagtgtc attagccttg c</code>		21
	<code>&lt;210&gt; 17</code>			
	<code>&lt;211&gt; 25</code>			
	<code>&lt;212&gt; DNA</code>			
50	<code>&lt;213&gt; <i>Mus musculus</i></code>			
	<code>&lt;400&gt; 17</code>			
55		<code>cacaatatca aggatatcga cgtga</code>		25
	<code>&lt;210&gt; 18</code>			
	<code>&lt;211&gt; 25</code>			
60	<code>&lt;212&gt; DNA</code>			
	<code>&lt;213&gt; <i>Mus musculus</i></code>			
	<code>&lt;400&gt; 18</code>			
65		<code>acatcagttc tgttcttcgg gtaca</code>		25

# ES 2 358 146 A1

	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 19	
	cccccaagcac agacttttga g	21
10		
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 20	
	gcttttctgca tctccagcct	20
20		
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 21	
	ttacctacac cccgccagtc	20
30		
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 22	
	tgctggtctg gaaggggtcc	19
40		
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 23	
	atggcgtcct ctctgcttga	20
50		
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
55	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 24	
	gaaggggtggg tagtcatttg	20
60		
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
65	<213> <i>Mus musculus</i>	

## ES 2 358 146 A1

	<i>&lt;400&gt;</i> 25		
		gggcaataag gtagtgaaca g	21
5	<i>&lt;210&gt;</i> 26		
	<i>&lt;211&gt;</i> 21		
	<i>&lt;212&gt;</i> DNA		
	<i>&lt;213&gt;</i> <i>Mus musculus</i>		
10	<i>&lt;400&gt;</i> 26		
		gcagcacagg tcctaaatag t	21
15	<i>&lt;210&gt;</i> 27		
	<i>&lt;211&gt;</i> 20		
	<i>&lt;212&gt;</i> DNA		
	<i>&lt;213&gt;</i> <i>Mus musculus</i>		
20	<i>&lt;400&gt;</i> 27		
		taagaactgc cgtcgccatt	20
25	<i>&lt;210&gt;</i> 28		
	<i>&lt;211&gt;</i> 20		
	<i>&lt;212&gt;</i> DNA		
	<i>&lt;213&gt;</i> <i>Mus musculus</i>		
30	<i>&lt;400&gt;</i> 28		
		ggccacaatc caatcattcc	20
35	<i>&lt;210&gt;</i> 29		
	<i>&lt;211&gt;</i> 20		
	<i>&lt;212&gt;</i> DNA		
	<i>&lt;213&gt;</i> <i>Mus musculus</i>		
40	<i>&lt;400&gt;</i> 29		
		accactcgca ttcctttgac	20
45	<i>&lt;210&gt;</i> 30		
	<i>&lt;211&gt;</i> 20		
	<i>&lt;212&gt;</i> DNA		
	<i>&lt;213&gt;</i> <i>Mus musculus</i>		
50	<i>&lt;400&gt;</i> 30		
		tgggtcagct cttgtgaatg	20
55	<i>&lt;210&gt;</i> 31		
	<i>&lt;211&gt;</i> 24		
	<i>&lt;212&gt;</i> DNA		
	<i>&lt;213&gt;</i> <i>Mus musculus</i>		
60	<i>&lt;400&gt;</i> 31		
		tgcataact cagagtgtca atca	24
65			



## ES 2 358 146 A1

	<400> 38		
	tcccaggtac atcacagagg g		21
5	<210> 39		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> <i>Mus musculus</i>		
10	<400> 39		
	agaacacggc aaggtgaaga t		21
15	<210> 40		
	<211> 23		
	<212> DNA		
20	<213> <i>Mus musculus</i>		
	<400> 40		
	tgaaccata gatgtaccac tgg		23
25	<210> 41		
	<211> 20		
	<212> DNA		
30	<213> <i>Mus musculus</i>		
	<400> 41		
	tgtgtccgtc gtggatctga		20
35	<210> 42		
	<211> 21		
	<212> DNA		
40	<213> <i>Mus musculus</i>		
	<400> 42		
45	cctgcttcac caccttcttg a		21
50			
55			
60			
65			



②① N.º solicitud: 200930890

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FORRAZ, N. <i>et al.</i> Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for ex vivo expansion and enriched for LTC-IC. <i>Stem cells</i> . 2004. Vol. 22, nº 1, páginas 100-108. ISSN 1066-5099. Ver todo el documento.	1,4-7,10-12,15
X	MCGUCKIN, C.P., <i>et al.</i> Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. <i>Experimental cell research</i> . Mayo 2004. Vol. 295, nº 2, páginas 350-359. ISSN 0014-4827, <doi:10.1016/j.yexcr.2003.12.028>. Ver todo el documento.	1,4-7,10-12,15
A	CHAN, C.K.F., <i>et al.</i> Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. <i>Nature</i> . 22.01.2009. Vol. 457, nº 7228, páginas 490-494. ISSN 1476-4687 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-18
A	US 20090053182 A1 (ICHIM, T.E.) 26.02.2009, párrafos [0004]-[0007],[0013],[0017],[0041],[0042],[0048],[0059]-[0066],[0097],[0110],[0111]; ejemplos; reivindicaciones 1,2,28,65,130.	1-18
A	SHIH, C-C, <i>et al.</i> Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. <i>Blood</i> . 15.10. 2001. Vol. 98, nº 8, páginas 2412-2422. ISSN 0006-4971. Ver todo el documento, especialmente resumen y páginas 2418-2421.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.01.2011

Examinador  
B. Pérez Esteban

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N5/0775** (01.01.2010)

**A61K35/28** (01.01.2006)

**A61P7/00** (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.01.2011

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 3, 8, 9, 13, 14 y 16-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 4-7, 10-12, y 15	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FORRAZ, N. <i>et al.</i> Stem cells.2004. Vol. 22, nº 1, páginas 100-108. ISSN 1066-5099.	2004
D02	MCGUCKIN, C.P., <i>et al.</i> Experimental cell research. Mayo 2004. Vol. 295, nº 2, páginas 350-359. ISSN 0014-4827, <doi:10.1016/j.yexcr.2003.12.028>.	Mayo 2004
D03	CHAN, C.K.F., <i>et al.</i> Nature. 22-01-2009. Vol. 457, nº 7228, páginas 490-494. ISSN 1476-4687 (Electrónico).	22.01.2009
D04	US 20090053182 A1 (ICHIM, T.E.)	26.02.2009
D05	SHIH, C-C, <i>et al.</i> Blood. 15.10. 2001. Vol. 98, nº 8, páginas 2412-2422. ISSN 0006-4971.	15.10. 2001

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente describe el uso de células madre mesenquimales que expresan nestina para el mantenimiento de la hematopoyesis. Describe también el uso de estas células para la fabricación de un medicamento para el mantenimiento de la hematopoyesis en un mamífero y para la prevención de disfunciones en la misma. Por último, se refiere a un método para mantener la hematopoyesis *in vitro* y para evaluar la capacidad hematopoyética de un mamífero.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el uso reivindicado de las células de la solicitud, por lo que ésta es nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Se han encontrado dos documentos (D01 y D02), en los que se describen células madre negativas para marcadores hematopoyéticos aisladas de cordón umbilical, que son capaces de mantener y expandir células madre y progenitores hematopoyéticos (HSPC, por sus siglas en inglés). Estas células, además, están enriquecidas en marcadores de superficie implicados en la migración, adhesión y anidamiento de las HSPC en la médula ósea. A la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02, resultaría evidente para el experto en la materia utilizar células madre multipotenciales para el mantenimiento de la hematopoyesis, y para la fabricación de los medicamentos reivindicados en la solicitud, o para desarrollar el método de la reivindicación 12, por lo que las reivindicaciones 1, 4 a 7, 10 a 12, y 15 no tendrían actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Puesto que en estos documentos no se determina si las células madre pueden ser mesenquimales, y tampoco se describe el marcador nestina en las mismas, las reivindicaciones 2, 3, 8, 9, 13, 14 y 16-18 cumplen el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D03 identifica una población celular aislada de hueso fetal de ratón, y negativa para marcadores hematopoyéticos. Estas células, además de producir células óseas y generar hueso por osificación endocondral, son capaces de crear médula ósea que contiene células madre hematopoyéticas "de largo plazo", en un proceso en el que la osificación endocondral es necesaria para la formación del nicho hematopoyético. A pesar de tratarse de células capaces de generar condrocitos (primer paso de la osificación endocondral), y de ser positivas para el marcador CD105, puesto que el artículo no especifica claramente que se trate de células mesenquimales, y no se demuestra que sean multipotenciales, el documento D03 no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

En el documento de patente D04 se describen células madre pluripotentes que, formando parte de un medio de cultivo condicionado, y en situación de co-cultivo con otras células madre, son capaces de estimular la proliferación de estas últimas. En el documento se indica que las células pluripotentes podrían ser células mesenquimales (en la literatura no siempre se delimita claramente la frontera entre células pluripotentes y multipotentes) (ver párrafo [0042] y reivindicación 28), o células positivas para el marcador nestina (ver párrafo [0041] y reivindicación 2), y que estas células madre reivindicadas podrían utilizarse en un método para estimular la hematopoyesis (ver párrafo [0017] y reivindicaciones 65 y 130. Sin embargo, esta información aparece en el documento D04 de forma general, y no se soporta con ningún ejemplo, ni se describen convenientemente las células madre ni sus marcadores de superficie, por lo que no se considera que D04 afecte la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

Por último, en el documento D05 se divulga el uso de células madre neurales, positivas para el marcador nestina, que, como las células de la solicitud, pueden reconstruir hematopoyesis "de largo plazo" en presencia de médula ósea humana funcional. Tampoco este documento afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, pues no se trata de células mesenquimales, sino de precursores neurales.