

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 809**

51 Int. Cl.:
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00953840 .6**
96 Fecha de presentación: **04.08.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1226233**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.07.2002**

54 Título: **CÉLULAS MADRE ADULTAS MULTIPOTENTES Y PROCEDIMIENTOS PARA SU AISLAMIENTO.**

30 Prioridad:
05.08.1999 US 147324 P
10.11.1999 US 164650 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2011

73 Titular/es:
ABT Holding Company
3201 Carnegie Avenue
Cleveland, OH 44115, US

72 Inventor/es:
Furcht, Leo T.;
Verfaillie, Catherine M. y
Reyes, Morayma

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 809 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre adultas multipotentes y procedimientos para su aislamiento

Campo de la invención

5 La invención se refiere en general a procedimientos para el aislamiento de células madre, células aisladas por los procedimientos y usos terapéuticos para esas células. Más específicamente, la invención se refiere a células progenitoras derivadas de médula aisladas que tienen el potencial de diferenciarse para formar células de diversos linajes celulares, así como a procedimientos para aislar las células y para inducir la diferenciación específica de las células aisladas por el procedimiento, y marcadores específicos que están presentes en estas células tales como proteínas y factores de transcripción.

Antecedentes de la invención

10 La generación de órganos y tejidos a partir de células madre y su posterior trasplante proporciona tratamientos prometedores para muchas patologías, haciendo de las células madre un foco central de investigación en muchos campos. El uso de células madre para la generación de órganos y tejido para trasplante proporciona una terapia alternativa prometedora para diabetes, enfermedad de Parkinson, hepatopatía, cardiopatía, y trastornos autoinmunitarios, por nombrar algunas. Sin embargo, existen al menos dos problemas principales asociados con el trasplante de órganos y tejido. En primer lugar, existe una falta de donantes de órganos y tejido. Tan solo un 5 por ciento de los órganos necesarios para trasplantes en los Estados Unidos están siempre disponibles para un receptor. (Evans, y col., J. Am. Med. Assoc. (1992) 267: 239-246.) De acuerdo con la Asociación Americana del Corazón, sólo 2.300 de los 40.000 americanos que necesitaron un corazón nuevo en 1997 recibieron uno, y la Fundación Americana del Hígado informa que existen menos de 3.000 donantes para los casi 30.000 pacientes que mueren cada año de insuficiencia hepática. El segundo problema principal es la incompatibilidad potencial del tejido trasplantado con el sistema inmunitario del receptor. Debido a que el sistema inmunitario del huésped reconoce el órgano o tejido donado como extraño, se deben proporcionar al paciente medicaciones anti-rechazo con un coste significativo tanto financiero como físico.

25 El xenotrasplante o el trasplante de tejido u órganos de otras especies, podría proporcionar un medio alternativo para superar la falta de órganos y tejidos humanos. El xenotrasplante ofrecería la ventaja de la planificación avanzada del trasplante, permitiendo que se recoja el órgano mientras aún está sano y permitiendo que el paciente se someta a cualquier pretratamiento beneficioso antes de la cirugía de trasplante. Desafortunadamente, el xenotrasplante no supera el problema de incompatibilidad del tejido, sino que lo agrava. Además, de acuerdo con los centros para el control de enfermedades, existe evidencia de que los virus dañinos cruzan las barreras entre especies. Los cerdos se han convertido en candidatos probables como donantes de órgano y tejido, aún cuando se ha documentado la transmisión entre especies de más de un virus de cerdos a seres humanos. Por ejemplo, recientemente se sacrificaron más de un millón de cerdos en Malasia en un esfuerzo por contener un brote de virus Hendra, una enfermedad que se transmitió a más de 70 humanos con resultados mortales. (Butler, D., Nature (1999) 398: 549.)

Células madre: Definición y uso

40 Por lo tanto, la fuente más prometedora de órganos y tejidos para trasplante radica en el desarrollo de la tecnología de células madre. En teoría, las células madre pueden sufrir una división celular autorrenovadora para dar lugar a células hijas fenotípica y genotípicamente idénticas durante un tiempo indefinido y por último se pueden diferenciar en, al menos, un tipo de célula final. Se pueden generar tejidos para trasplante generando tejidos u órganos a partir de las células madre propias del paciente, o alterando las células heterólogas de modo que el sistema inmunitario del receptor no las reconozca como extrañas, para proporcionar las ventajas asociadas con el xenotrasplante sin el riesgo asociado de infección o de rechazo del tejido.

45 Las células madre también proporcionan una esperanza para la mejora de los resultados del tratamiento génico. Las células madre propias de un paciente se podrían alterar genéticamente *in vitro*, después reintroducirse *in vivo* para producir un producto génico deseado. Estas células madre alteradas genéticamente tendrían el potencial de ser inducidas para diferenciarse para formar una multitud de tipos celulares para su implantación en zonas específicas en el organismo, o para su aplicación sistémica. Alternativamente, las células madre heterólogas se podrían alterar genéticamente para expresar el antígeno del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del receptor, o ningún MHC, para permitir el trasplante de esas células del donante al receptor sin el riesgo asociado de rechazo.

55 Las células madre se definen como células que tienen un potencial de proliferación extenso, algunos dirían indefinido, que las diferencia en varios linajes celulares, y que pueden repoblar tejidos tras el trasplante. La célula madre por excelencia es el embriocitoblasto (ES), ya que tiene un potencial de auto-renovación ilimitado y de diferenciación multipotente. Estas células se derivan de la masa celular interior del blastocisto, o se pueden derivar de células germinativas primigenias de un embrión post-implantación (células germinativas embrionarias o células EG). Se han derivado células ES y EG de ratón, y más recientemente también de seres humanos y primates no humanos. Cuando se introduce en blastocistos de ratón o blastocistos de otros animales, las células ES pueden contribuir a todos los tejidos del ratón (animal). Cuando se trasplanta en animales post-natales, las células ES y EG

generan teratomas, lo que demuestra de nuevo su multipotencia. Se pueden identificar células ES (y EG) por tinción positiva con los anticuerpos SSEA1 y SSEA4.

A nivel molecular, las células ES y EG expresan una serie de factores de transcripción altamente específicos para esas células no diferenciadas. Estos incluyen oct-4 y Rex-1. También se encontraron los LIF-R y los factores de transcripción sox-2 y Rox-1, incluso aunque los dos últimos también se expresan en células no-ES. oct-4 es un factor de transcripción expresado en el embrión pregastrulación, el embrión en la fase de división temprana, las células de la masa celular interior del blastocisto, y en las células de carcinoma embrionario (CE). oct-4 está regulado por disminución cuando se inducen células para diferenciar *in vitro* y, en el animal adulto, oct-4 sólo se encuentra en células germinativas. Varios estudios han mostrado que se requiere oct-4 para mantener el fenotipo no diferenciado de células ES, y desempeña un papel importante en la determinación de etapas tempranas en embriogénesis y diferenciación, oct-4, en combinación con Rox-1, provoca la activación transcripcional de la proteína Zn-finger Rex-1, y también se requiere para mantener ES en un estado no diferenciado. De forma análoga, se necesita sox-2, junto con oct-4, para mantener el estado no diferenciado de ES/EC y para mantener las células ES murinas (pero no humanas). Las células germinativas humanas o murinas requieren la presencia de LIF. Otro rasgo característico de las células ES es la presencia de telomerasa, que proporciona a estas células un potencial de autorenovación ilimitado *in vitro*.

Se han identificado células madre en la mayoría de los tejidos de órganos. La mejor caracterizada es la célula madre hematopoyética. Esta es una célula derivada del mesodermo que se ha purificado basándose en los marcadores de superficie celulares y en las características funcionales. La célula madre hematopoyética, aislada de la médula ósea, la sangre, la sangre del cordón umbilical, el hígado fetal y el saco vitelino, es la célula progenitora que reinicia la hematopoyesis para la vida de un receptor y genera múltiples linajes hematopoyéticos (véase Fei, R., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.635.387; McGlave, y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.460.964; Simmons, P., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.677.136; Tsukamoto, y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.750.397; Schwartz, y cols., patente de los Estados Unidos N.º 759.793; DiGuisto, y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.681.599; Tsukamoto, y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.716.827; Hill, B., ET cols., Exp. Hematol. (1996) 24 (8): 936-943). Cuando se trasplantan en seres humanos o animales letalmente irradiados, las células madre hematopoyéticas pueden repoblar el conjunto de células hematopoyéticas eritroides, neutrófilo-macrófagos, megacariocitos y linfoides. *In vitro*, se pueden inducir células madre hematopoyéticas para que sufran al menos alguna división celular autorenovadora y se pueden inducir para diferenciarse para los mismos linajes como se observa *in vivo*. Por lo tanto, esta célula cumple con los criterios de una célula madre. Sin embargo, las células madre que sólo se diferencian para formar células de linaje hematopoyético no pueden proporcionar una fuente de células para la reparación de otros tejidos dañados, por ejemplo, el tejido del corazón o del pulmón dañado por agentes quimioterapéuticos en dosis altas.

Una segunda célula madre que se ha estudiado extensamente es la célula madre neuronal (Gage FH: Science 287:1433-1438, 2000; Svendsen CN y cols, Brain Path 9:499-5 3, 1999; Okabe S y col, Mech Dev 59:89-102, 1996). Inicialmente se identificaron células madre neuronales en la zona subventricular y en el bulbo olfativo del cerebro fetal. Hasta hace poco, se creía que el cerebro adulto ya no contenía células con potencial de células madre. Sin embargo, varios estudios en roedores, y más recientemente también en seres humanos y primates no humanos, han mostrado que las células madre siguen estando presentes en el cerebro adulto. Estas células madre pueden proliferar *in vivo* y regenerar continuamente al menos alguna célula neuronal *in vivo*. Cuando se cultivan *ex vivo*, las células madre neuronales se pueden inducir para proliferar, así como para diferenciarse en diferentes tipos de neuronas y células gliales. Cuando se trasplantan en el cerebro, las células madre neuronales se pueden injertar y generar células neuronales y células gliales. Por lo tanto, esta célula también cumple con la definición de una célula madre.

Las células madre mesenquimales (MSC), derivadas originalmente del mesodermo embrionario y aisladas de médula ósea adulta, se pueden diferenciar para formar músculo, hueso, cartilago, grasa, estroma de médula y tendón. Durante la embriogénesis, el mesodermo se desarrolla en mesodermo del brote de las extremidades, tejido que genera hueso, cartilago, grasa, músculo esquelético y posiblemente endotelio. El mesodermo también se diferencia a mesodermo visceral, lo que puede dar lugar a músculo cardíaco, músculo liso, o islotes sanguíneos que consisten en células progenitoras hematopoyéticas y endotelio. Por lo tanto, las células madre mesenquimales o mesodérmicas podrían proporcionar una fuente para varios tipos de células y tejidos. Una tercera célula específica de tejido que se puede denominar como una célula madre es la célula madre mesenquimal, descrita inicialmente por Fridenshtein (Fridenshtein, Arkh. Patol., 44:3-11, 1982). Se han aislado varias células madre mesenquimales (véase, por ejemplo, Caplan, A., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.486.359; Young, H., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.827.735; Caplan, A., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.811.094; Bruder, S., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.736.396; Caplan, A., y cols., patente de los Estados Unidos N.º 5.837.539; Masinovsky, B., patente de los Estados Unidos N.º 5.837.670; Pittenger, M., patente de los Estados Unidos N.º 5.827.740; Jaiswal, N., y cols., J. Biochem Celular. (1997) 64(2): 295-312; Cassiede P., y cols., J. Bone Miner. Res. (1996) 11(9): 1264-1273; Johnstone, B., y cols., (1998) 23S(1): 265-272; Yoo, y cols., J. Bone Joint Surg. Am. (1998) 80(12): 1745-1757; Gronthos, S., Blood (1994) 84(12): 4164-4173; Makino, S., y cols., J. Clin. Invest. (1999) 103(5): 697-705). De las muchas células madre mesenquimales que se han descrito, todas han demostrado una diferenciación limitada para formar sólo aquellas células diferenciadas que generalmente se considera que son de origen mesenquimal. Hasta la fecha, la célula madre mesenquimal más multipotente notificada es la célula aislada

por Pittenger, y cols., que expresa el fenotipo SH2⁺ SH4⁺ CD29⁺ CD44⁺ CD71⁺ CD90⁺ CD106⁺ CD120a⁺ CD124⁺ CD14⁻ CD34⁻ CD45⁻. Esta célula se puede diferenciar para formar varios tipos de células de origen mesenquimal, pero aparentemente está limitada en el potencial de diferenciación para células del linaje mesenquimal, ya que el equipo que las aisló señaló que las células hematopoyéticas no se identificaron en los cultivos expandidos. (Pittenger, y cols., Science (1999) 284: 143-147.)

Se han identificado otras células madre, incluyendo células madre gastrointestinales, células madre epidérmicas y células madre hepáticas, denominadas también células ovals (Potten C, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353:821-30, 1998; Vatio F, Philos.Trans R Soc Lond B Biol Sci 353:831, 1997; Alison M y cols, Hepatol 29:678-83, 1998). La mayoría de éstas están menos caracterizadas.

En comparación con las células, las células madre específicas de tejido tienen menos capacidad autorrenovadora y, aunque se diferencian en múltiples linajes, no son multipotentes. Ningún estudio ha tratado si las células específicas de tejido expresan marcadores descritos anteriormente de células ES. Además, no se ha explorado completamente el grado de actividad de telomerasa en células madre específicas de tejido, en parte porque es difícil obtener grandes números de poblaciones altamente enriquecidas de estas células.

Hasta hace poco, se pensaba que las células madre específicas de órganos sólo se podían diferenciar en células del mismo tejido. Varias publicaciones recientes han sugerido que las células madre específicas de órganos adultos pueden diferenciarse en células de diferentes tejidos. Varios estudios han mostrado que las células trasplantadas en el momento de un trasplante de médula ósea se pueden diferenciar en músculo esquelético (Ferrari Science 279:528-30, 1998; Gussoni Nature 401:390-4, 1999). Esto se podría considerar dentro del ámbito del potencial de diferenciación posible de las células mesenquimales que están presentes en la médula. Jackson publicó que las células satélites musculares se pueden diferenciar en células hemopoyéticas, de nuevo un cambio en el fenotipo dentro del mesodermo esplácnico (Jackson PNAS USA 96:14482-6, 1999). Otros estudios han mostrado que las células madre de una capa embrionaria (por ejemplo, mesodermo esplácnico) se pueden diferenciar en tejidos que se cree que se derivan durante la embriogénesis a partir de una capa embrionaria diferente. Por ejemplo, las células endoteliales o sus precursoras detectadas en seres humanos o animales que sufren un trasplante de médula se derivan, al menos en parte, del donante de médula (Takahashi, Nat Med 5:434-8, 1999; Lin, Clin Invest 105:71-7, 2000). Por tanto, la progenie derivada de mesodermo visceral y mesodermo no esplácnico, tal como MSC, se transfieren con la médula infundida. Aún más sorprendentes son los informes que demuestran tanto en roedores como en seres humanos que las células epiteliales hepáticas y las células epiteliales de los conductos biliares se derivan de la médula del donante (Petersen, Science 284:1168-1170, 1999; Theise, Hepatology 31:235-40, 2000; Theise, Hepatology 32:11-6, 2000). Asimismo, tres grupos han mostrado que las células madre neuronales se pueden diferenciar en células hemopoyéticas. Finalmente, Clarke y cols. comunicaron que las células madre neuronales inyectadas en blastocistos pueden contribuir a todos los tejidos del ratón quimérico (Clarke, Science 288:1660-3, 2000).

Se necesario indicar que la mayoría de estos estudios no han demostrado de forma concluyente que una única célula se puede diferenciar en tejidos de diferentes órganos. De hecho, la mayoría de los investigadores no identificaron el fenotipo de la célula de iniciación. Una excepción es el estudio de Weissman y Grompe, que mostraron que las células que repoblaron el hígado estaban presentes en células de médula Lin⁻Thy1^{Low}Sca1⁺, que están altamente enriquecidas en células madre hematopoyéticas. Análogamente, el grupo de Mulligan mostró que las células Sp de la médula, altamente enriquecidas en HSC, se pueden diferenciar en el músculo y en el endotelio, y Jackson y cols mostraron que las células Sp de músculo, son responsables de la reconstitución hemopoyética (Gussoni y cols., Nature 401:390-4, 1999).

El trasplante de tejidos y órganos generados a partir de células madre embrionarias heterólogas requiere que las células se modifiquen además genéticamente para inhibir la expresión de varios marcadores de superficie celulares, o bien que el uso de supresores inmunitarios quimio-terapéuticos continúe para proteger contra el rechazo del trasplante. Por tanto, aunque la investigación sobre células madre embrionarias proporciona una solución alternativa prometedora al problema del suministro limitado de órganos para el trasplante, podrían permanecer los problemas y riesgos asociados con la necesidad de inmunosupresión para mantener el trasplante de células heterólogas o de tejido. Se necesitarían unas 20 líneas inmunológicamente diferentes estimadas de células madre embrionarias para establecerse para proporcionar células inmunocompatibles para tratamientos dirigidos a la mayoría de la población (Wadman, M., Nature (1999) 398: 551).

El uso de células a partir del individuo desarrollado, en vez de un embrión, como fuente de células madre autólogas o alogénicas podría superar el problema de incompatibilidad de tejido asociado con el uso de células madre embrionarias trasplantadas, así como solucionar el dilema ético asociado con la investigación sobre células madre embrionarias. La mayor desventaja asociada con el uso de células madre autólogas para el trasplante de tejido radica entonces en su potencial de diferenciación limitado. Se han aislado varias células madre a partir de organismos completamente desarrollados, en particular seres humanos, pero estas células, aunque se ha comunicado que son multipotentes, han demostrado un potencial limitado para diferenciar en múltiples tipos celulares.

Por tanto, incluso aunque se han aislado previamente células madre con potencial de diferenciación múltiple por

5 otros investigadores y por los inventores de la presente invención, no se ha descrito una célula progenitora con el potencial para diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares de diferentes linajes, incluyendo fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, músculo esquelético, endotelio, estroma, músculo liso, músculo cardíaco y células hematopoyéticas. Si el trasplante celular y de tejido y la terapia génica se usan para proporcionar los avances terapéuticos esperados, se necesita una célula madre o célula progenitora con el potencial de diferenciación mayor o más extenso. Se necesita el equivalente adulto de una célula madre embrionaria.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una célula de línea celular como se expone en la reivindicación 1.

10 La presente solicitud describe una célula madre de mamífero multipotente aislada que es negativa de antígeno de superficie para CD44, CD45 y HLA de clase I y II. La célula también puede ser negativa de antígeno de superficie para CD34, Muc18, Stro-1, HLA-clase-I y puede ser positiva para ARNm de oct3/4, y puede ser positiva para ARNm de hTERT. En particular, la célula puede ser negativa de antígeno de superficie para CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD50, CD62E y CD62P, HLA-DR, Muc18, STRO-1, cKit, Tie/Tek, CD44, HLA-clase I y 2-microglobulina y es positiva para CD10, CD13, CD49b, CD49e, CDw90, Fik1 EGF-R, TGF-R1 y TGF-R2, BMP-R1A, PDGF-R1a y PDGF-R1b.

15 También describe una célula multipotente aislada derivada de un mamífero post-natal que responde al factor de crecimiento LIF y tiene receptores para LIF. La célula de la invención es para su uso en medicina.

20 Las células de la presente invención descrita anteriormente tienen la capacidad para inducirse para diferenciarse para formar tipos celulares diferenciados de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico. Por ejemplo, las células, pueden tener la capacidad para inducirse para diferenciarse para formar células al menos de tipo celular osteoblasto, condrocito, adipocito, fibroblasto, estroma de médula, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, endotelial, epitelial, hematopoyético, glial, neuronal u oligodendrocito.

La célula puede ser de un feto, un recién nacido, un niño o un adulto. La célula puede derivarse de un órgano, tal como de médula, hígado o cerebro.

25 La presente solicitud describe células diferenciadas obtenidas a partir de células madre adultas multipotentes descritas anteriormente, en las que la célula de progenie puede ser un hueso, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma de médula, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, endotelial, epitelial, endocrino, exocrino, hematopoyético, glial, neuronal u oligodendrocito. La célula de la progenie diferenciada puede ser una célula epitelial de la piel, células epitelial del hígado, células epitelial del páncreas, célula endocrina o célula de los islotes del páncreas, célula exocrina del páncreas, célula del epitelio del intestino, célula del epitelio del riñón o una estructura asociada epidérmica (tal como un folículo piloso). La célula de la progenie diferenciada puede formar tejidos blandos que rodee los dientes o puede formar dientes.

30 La presente solicitud describe una célula madre de mamífero multipotente transgénica aislada como se ha descrito anteriormente, en la que se ha alterado el genoma de la célula por inserción de ADN aislado preseleccionado, por sustitución de un segmento del genoma celular con ADN aislado preseleccionado, o por delección de o inactivación de al menos una porción del genoma celular. Esta alteración puede ser por transducción vírica, tal como por inserción de ADN por integración vírica de vectores, o usando un vector de virus de ADN, virus de ARN o virus retrovírico. De forma alternativa, se puede inactivar una porción del genoma celular de la célula transgénica aislada usando una molécula de ácido nucleico antisentido con una secuencia que es complementaria a la secuencia de la porción del genoma celular que va a ser inactivado. Además, se puede inactivar una porción del genoma celular usando una secuencia de ribozima dirigida a la secuencia de la porción del genoma celular que va a ser inactivado. El genoma alterado puede contener la secuencia genética de un marcador seleccionable o rastreable que se expresa de modo que la célula progenitora con el genoma alterado, o su progenie, pueda diferenciarse de células progenitoras que tienen un genoma inalterado. Por ejemplo, el marcador puede ser una proteína fluorescente verde, roja, amarilla, Beta-gal, Neo, DHFR^m o higromicina. La célula puede expresar un gen que se puede regular por un promotor inducible u otro mecanismo de control para regular la expresión de una proteína, enzima u otro producto celular.

35 La presente solicitud describe una célula que puede expresar niveles altos de telomerasa y que puede mantener telómeros grandes después de un cultivo in vitro extenso, en comparación con los telómeros de linfocitos de los mismos donantes. Los telómeros pueden tener una longitud de aproximadamente 11-16 KB después de un cultivo in vitro extenso.

40 La presente solicitud describe un procedimiento para aislar células madre adultas multipotentes (MASC). El procedimiento implica deplecionar células mononucleares de médula ósea de células CD45⁺ glucoforina A⁺, recuperar células CD45- glucoforina A, plaquear las células CD45- glucoforina A- recuperadas sobre un recubrimiento de matriz, y cultivar las células plaqueadas en medio suplementado con factores de crecimiento. La etapa de deplecionar puede implicar selección negativa usando anticuerpos monoclonales o policlonales. Los factores de crecimiento se pueden elegir a partir de PDGF-BB, EGF, IGF y LIF. La última etapa puede implicar además cultivar en medio suplementado con dexametasona, ácido linoleico y/o ácido ascórbico.

5 La presente solicitud describe un procedimiento de cultivo para aislar células madre adultas multipotentes que implica añadir las células a un medio libre de suero o bajo en suero que contiene insulina, selenio, albúmina sérica bovina, ácido linoleico, dexametasona y factor de crecimiento derivado de plaquetas. El medio libre de suero o bajo en suero puede ser DMEM bajo en glucosa mezclado con MCDB. La insulina puede estar presente en una concentración de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 µg/ml. El medio libre de suero o bajo en suero puede contener una cantidad eficaz de transferrina en una concentración de más de 0, pero de menos de aproximadamente 10 µg/ml, el selenio puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 µg/ml, la albúmina sérica bovina puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 µg/ml, el ácido linoleico puede estar presente en una concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 µg/m, y la dexametasona puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,005 a 0,15 µM. El medio libre de suero o bajo en suero puede contener ácido L-ascórbico aproximadamente 0,05 - 0,2 mM. El medio libre de suero o bajo en suero puede contener de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas, de 5 a aproximadamente 15 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, de 5 a aproximadamente 15 ng/ml de factor de crecimiento similar a insulina, 10-10.000 UI de factor inhibidor de leucemia. La solicitud describe una población clonal cultivada de células madre adultas multipotentes aisladas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

La presente solicitud describe un procedimiento para inmortalizar permanentemente y/o condicionalmente células derivadas de MASC y progenie diferenciada transfiriendo telomerasa en MASC o progenie diferenciada.

20 La presente solicitud describe un procedimiento para reconstituir el sistema hematopoyético e inmunitario de un mamífero administrando al mamífero células madre multipotentes completamente alogénicas (MASC), células madre hematopoyética derivadas o células progenitoras para inducir tolerancia en el mamífero para el posterior trasplante de tejido derivado de célula madre multipotentes u otros trasplantes de órganos.

La presente solicitud describe un procedimiento de expansión de células madre multipotentes no diferenciadas en folículos pilosos diferenciados administrando factores de crecimiento apropiados, y haciendo crecer las células.

25 La presente solicitud describe numerosos usos para las células descritas anteriormente. La presente solicitud describe un procedimiento de uso de las células aisladas realizando un trasplante en el útero de una población de las células para formar quimerismo de células o tejidos, produciendo de este modo células humanas en seres humanos post-natales o prenatales o animales después de trasplante, en el que las células producen enzimas, proteínas u otros productos terapéuticos en el ser humano o en el animal de modo que se corrigen los defectos genéticos. La presente solicitud también describe un procedimiento de uso de las células para terapia génica en un sujeto que necesita tratamiento terapéutico, implicando alterar genéticamente las células introduciendo en la célula un ADN aislado preseleccionado que codifica un producto génico deseado, expandir las células en el cultivo, e introducir las células en el cuerpo del sujeto para producir el producto génico deseado.

35 La presente solicitud describe un procedimiento de reparación del tejido dañado en un sujeto humano que necesita esta reparación expandiendo las células madre adultas multipotentes aisladas en el cultivo, y poner en contacto una cantidad eficaz de las células expandidas con el tejido dañado de este sujeto. Las células se pueden introducir en el cuerpo del sujeto por inyección localizada o por inyección sistémica. Las células se pueden introducir en el cuerpo del sujeto junto con un implante de matriz adecuado. El implante de matriz puede proporcionar material genético, citocinas, factores de crecimiento u otros factores adicionales para promover el crecimiento y la diferenciación de las células. Las células se pueden encapsular antes de su introducción en el cuerpo del sujeto, tal como dentro de cápsula de polímero.

45 La presente solicitud describe un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria a un agente infeccioso en un sujeto humano que implica alterar genéticamente una población clonal expandida de células madre adultas multipotentes en cultivo que expresan una o más moléculas de antígeno preseleccionadas que consiguen una respuesta inmunitaria protectora frente a un agente infeccioso, e introducir en el sujeto una cantidad eficaz de las células genéticamente alteradas para inducir la respuesta inmunitaria. El procedimiento puede implicar además, antes de la segunda etapa, la etapa de diferenciar las células madre adultas multipotentes para formar células dendríticas.

50 La presente solicitud describe un procedimiento de uso de MASC para identificar polimorfismos genéticos asociados con anomalías fisiológicas, implicando aislar las MASC de una población estadísticamente significativa de individuos de los que se pueden obtener datos fenotípicos, expandir el cultivo de las MASC de la población estadísticamente significativa de individuos para establecer cultivos de MASC, identificar el menos un polimorfismo genético en las MASC cultivadas, inducir las MASC cultivadas para diferenciar, y caracterizar procesos metabólicos aberrantes asociados con dicho al menos un polimorfismo genético comparando el patrón de diferenciación mostrado por una MASC que tiene un genotipo normal con el patrón de diferenciación mostrado por una MASC que tiene un polimorfismo genético identificado.

55 La presente solicitud describe además un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto mamífero que implica alterar genéticamente células madre adultas multipotentes para expresar una proteína tumoricida, una proteína anti-angiogénica o una proteína que se expresa sobre la superficie de una célula tumoral junto con una proteína asociada

con la estimulación de una respuesta inmunitaria a antígeno, e introducir una cantidad anti-cáncer eficaz de las células madre multipotentes alteradas genéticamente en el sujeto mamífero.

La presente solicitud describe un procedimiento de uso de MASC para caracterizar respuestas celulares a agentes biológicos o farmacológicos que implica aislar MASC a partir de una población estadísticamente significativa de individuos para establecer una pluralidad de cultivos de MASC, poner en contacto los cultivos de MASC con uno o más agentes biológicos o farmacológicos, identificar una o más respuestas celulares al uno o más de los agentes biológicos o farmacológicos, y comparar la una o más de las respuestas celulares de los cultivos de las MASC de individuos en la población estadísticamente significativa.

La presente solicitud también describe un procedimiento de uso de células específicamente diferenciadas para tratamiento que comprende administrar células específicamente diferenciadas a un paciente que lo necesita. Describe además el uso de células madre multipotentes genéticamente modificadas para expresar selectivamente un gen endógeno o un transgen, y el uso de MASC que crecen in vivo para el/la trasplante/administración en un animal para tratar una enfermedad. Por ejemplo, se pueden usar células neuroretinianas derivadas de MASC o madre multipotentes para tratar ceguera provocada por, entre otras cosas, pero sin limitarse a, enfermedad neuroretiniana provocada entre otras cosas por degeneración macular, retinopatía diabética, glaucoma, retinitis pigmentosa. Se pueden usar las células para injertar una célula en un mamífero que comprende administrar células autólogas, alogénicas o xenogénicas, para restablecer o corregir una función metabólica, enzimática, de coagulación, estructural u otra función específica de tejido al mamífero. Se pueden usar las células para injertar una célula en un mamífero, provocando la diferenciación in vivo de tipos celulares, y para administrar las células madre diferenciadas en el mamífero. Se pueden usar las células, o su progenie diferenciada in vitro o in vivo, para corregir un proceso de enfermedad genética, enfermedad degenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica por almacenamiento, enfermedad neuronal o de cáncer. Se pueden usar para producir material similar al gingival para el tratamiento de enfermedad periodontal. Se pueden usar para desarrollar tejido epitelial de piel derivado de células madre multipotentes que se pueden usar para injerto de piel y cirugía plástica. Se pueden usar para potenciar el músculo, tal como en el pene o en el corazón. Se puede usar para producir sangre ex vivo para uso terapéutico, o para producir células hematopoyéticas humanas y/o sangre en animales prenatales o postnatales para su uso humano. Se pueden usar como un agente terapéutico para ayudar, por ejemplo, en la recuperación de un paciente de quimioterapia o radioterapia en el tratamiento del cáncer, en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, para inducir tolerancia en el receptor. Se pueden usar para tratar SIDA u otras enfermedades infecciosas.

Se pueden usar los cardiomiocitos o MASC para tratar enfermedades cardíacas incluyendo, entre otras, pero sin limitarse a, miocarditis, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, lesión provocada por infartos de miocardio, hipertensión, aterosclerosis, disfunción de la válvula cardíaca. Se puede usar una célula madre derivada de mamífero multipotente modificada genéticamente, o su progenie diferenciada, para tratar una enfermedad con déficit de SNC o daño. Además, se puede usar la célula madre derivada de mamífero multipotente, o su célula diferenciada neuronalmente relacionada, para tratar una enfermedad con déficits neuronales o degeneración incluyendo, entre otros, pero sin limitarse a, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia asociada con SIDA, lesión de la médula espinal, enfermedades metabólicas que afectan al cerebro u otros nervios.

Se puede usar una célula madre derivada de mamífero multipotente o su progenie diferenciada, tal como células del estroma, para soportar el crecimiento y la diferenciación de otros tipos celulares in vivo o in vitro, incluyendo pero sin limitarse a células hematopoyéticas, células beta o de los islotes pancreáticos, hepatocitos, etc. Se puede usar la célula madre, o progenie diferenciada del cartílago, para tratar una enfermedad de las articulaciones o del cartílago incluyendo pero sin limitarse a desgarros del cartílago, adelgazamiento del cartílago, artrosis. Además, se pueden usar las células madre, o su progenie diferenciada de osteoblastos, para mejorar un procedimiento que tiene efectos perjudiciales sobre el hueso, incluyendo, entre otros pero sin limitarse a, fracturas óseas, fracturas que no cicatrizan, artrosis, "agujeros" en huesos provocados por tumores que se transmiten al hueso, tales como de próstata, mama, mieloma múltiple, etc.

La presente solicitud también describe un kit para proporcionar inmunización para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto humano. El kit puede contener, envasado por separado, medios y anticuerpos para el aislamiento de células madre adultas multipotentes a partir de un aspirado de la médula ósea; medios y factores celulares para el cultivo de las células madre adultas multipotentes aisladas; y elementos genéticos para alterar genéticamente las células madre adultas multipotentes para producir moléculas antigénicas. El kit puede contener además medios y factores celulares eficaces para diferenciar las células madre adultas multipotentes para formar tipos celulares específicos de tejido. Los elementos genéticos pueden ser vectores víricos, y los vectores víricos pueden contener la secuencia de nucleótidos que codifica uno o más antígenos de origen bacteriano o vírico. Los elementos genéticos pueden ser plásmidos que contienen una secuencia de nucleótidos que codifican un antígeno bacteriano, vírico o parasitario. Los plásmidos se pueden envasar con componentes para la transfección del fosfato de calcio. Los elementos genéticos pueden ser vectores que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican antígenos comunes a células cancerígenas, o los elementos genéticos pueden ser vectores que contienen secuencias de nucleótidos que codifican antígenos de organismos parasitarios.

La presente solicitud describe además un procedimiento de trazado de un perfil genético de una célula madre derivada multipotente como se ha descrito anteriormente, y el uso de este trazado de perfil genético en un banco de datos. También proporciona el uso de células madre multipotentes con perfil genético como se ha descrito anteriormente en bases de datos para ayudar en el descubrimiento del fármaco.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1a y la Fig. 1b son fotografías de MASC no diferenciadas de la presente invención. Las células que carecen de expresión CD45, así como de expresión de glucoforina-A se seleccionaron por depleción de perlas inmunomagnéticas y FACS. Las células recuperadas después de la clasificación son pequeños blastos (Fig. 1a). Se plaquearon 5000 células en pocillos recubiertos de fibronectina de placas de 96 pocillos en medio definido que consistía en DMEM, 10 ng/ml de IGF, 10 ng/ml de EGF y 10 ng/ml de PDGF-BB así como transferrina, selenio, albúmina sérica bovina, dexametasona, ácido linoleico, insulina y ácido ascórbico. Después de 7-21 días, se desarrollan pequeñas colonias de células adherentes. (Figura 1b).

La Fig. 2 es una gráfica que ilustra las tasas de expansión para MASC en cultivo. Se plaquearon células CD45-/GlyA- en pocillos recubiertos de fibronectina de placas de 96 pocillos en medio definido que consistía en DMEM, 10 ng/ml de IGF, 10 ng/ml de EGF y 10 ng/ml de PDGF-BB así como transferrina, selenio, albúmina sérica bovina, dexametasona, ácido linoleico, insulina y ácido ascórbico, con o sin FCS al 2 %. Cuando semi-conflúen, se recuperaron las células por tripsinización y se sub-cultivaron dos veces por semana a una dilución 1:4 bajo las mismas condiciones de cultivo.

Fig. 3. Se cultivó la longitud del telómero de MASC de un donante, edad 35, con densidades de resiembra de 2×10^3 células/cm² para 23 y 35 divisiones celulares. Se determinó la longitud del telómero usando técnicas estándar. La longitud del telómero fue de 9kB. Ésta fue 3kB más larga que la longitud del telómero de linfocitos sanguíneos obtenidos del mismo donante. La longitud del telómero evaluada después de 10 y 25 divisiones celulares resp. y de nuevo después de 35 divisiones celulares, permaneció inalterada. Como controles, se sometieron a prueba células HL60 (telómeros cortos) y células 293 (telómeros largos).

La Fig. 4 ilustra el protocolo general para cultivo, transducción, diferenciación y confirmación de diferenciación usada por los inventores para las MASC de la presente invención. Se realizó la transducción con un vector retroviral que contiene eGFP después del cultivo, como se indica. Se expusieron MASC semi-confluentes durante seis horas en dos días secuenciales a MFG-eGFP que contenían sobrenadante PA317 preparado en medio de MASC (es decir, DMEM, FCS al 2 %, EGF, PDGF-BB, transferrina, selenio, albúmina sérica bovina, dexametasona, ácido linoleico, insulina y ácido ascórbico) en presencia de 10 µg/ml de protamina. Veinticuatro horas después de la última transducción, se tripsinizaron las células y se sometieron a selección de FACS. Del treinta al setenta por ciento de las MASC fueron positivas para eGFP. Se clasificaron de una a cien células/pocillo positivas para eGFP usando el dispositivo ACDU sobre FACS en pocillos recubiertos con FN de placas de 96 pocillos, en el mismo medio de MASC. De esos pocillos, aproximadamente 2/placa que contenían 10 células/pocillo produjeron progenie de MASC. Después se expandieron por cultivo los clones. Se indujeron de ocho a 10 subpoblaciones de estas células expandidas para diferenciarse, a lo largo de diferentes vías, confirmándose la diferenciación usando las técnicas indicadas.

La Fig.5 ilustra el protocolo de diferenciación usado por los inventores para inducir las MASC de la presente invención para diferenciarse para formar osteoblastos, condroblastos y adipocitos como se indica. Se describen las citocinas necesarios y las pruebas apropiadas para demostrar la inducción de diferenciación terminal.

La Fig. 6. ilustra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para sialoproteína ósea en el día 15 después de cultivo después de la inducción de las MASC con dexametasona 10^{-7} M, β-glicerofosfato y ácido ascórbico 10mM. En el cuadro del medio, los resultados de la tinción con azul de toluidina para el cartílago muestran la diferenciación para condrocitos después del cultivo de MASC en micromasa en medio libre de suero con 100 ng/ml de TGF-β1. En el cuadro inferior, la tinción con rojo de aceite en el día 14 y el análisis de transferencia de tipo Western para PPARγ muestra diferenciación después del tratamiento de MASC con suero de caballo al 10 %. La Fig. 7. muestra análisis de transferencia de tipo Western para proteínas musculares. El cuadro A, muestra los resultados de cultivo de MASC confluentes con 5-azacitidina 3 µM durante 24h. Después se mantuvieron los cultivos en medio de expansión de MASC (DMEM, FCS al 2 %, EGF, PDGF-BB, transferrina, selenio, albúmina sérica bovina, dexametasona, ácido linoleico, insulina y ácido ascórbico). Se evaluó la diferenciación con transferencia de tipo Western. 5 días después de la inducción con 5-azacitidina, se pudieron detectar los factores de transcripción Myf5, Myo-D y Myf6 aproximadamente en un 50 % de las células. Después de 14-18 días, se expresó Myo-D en niveles significativamente inferiores, mientras que Myf5 y Myf6 persistieron. Se detectó desmina, y actina esquelética tan solo 4 días después de la inducción, y miosina esquelética en 14 días. Por inmunohistoquímica, el 70-80 % de las células expresaron proteínas musculares maduras después de 14 días (no mostrado). El tratamiento con 5-azacitidina o bien con ácido retinoico dio como resultado la expresión de Gata4 y Gata6 durante la primera semana del cultivo. Además, se pudieron detectar los niveles bajos de troponina-T desde el día 2 en adelante, lo que puede sugerir que el músculo fetal generado como troponina-T cardíaca, se encuentra en el músculo esquelético embrionario. Se detectó actina del músculo liso a los 2 días después de la inducción y persistió hasta los 14 días. En el cuadro B, se añadieron 100 ng/ml de PDGF como citocina sola para MASCS confluyente mantenida en medio libre

de suero durante 14 días. Se evaluó la presencia de marcadores de músculo liso por transferencia de tipo Western. Se detectó actina del músculo liso desde el día 2 en adelante y miosina del músculo liso después de 6 días. Aproximadamente un 70 % de las células se tiñeron como positivas con anticuerpos de anti-actina y miosina del músculo liso el día 15 por inmunohistoquímica. Se encontró presencia de miogenina desde día 4 en adelante y de desmina después de 6 días. También se detectaron proteínas Myf5 y Myf6 después de 2-4 días, que persistieron hasta el día 15. No se detectó Myo-D. En el cuadro C, se expusieron MASC confluentes ácido retinoico y después se cultivaron en medio libre de suero con 100 ng/ml de bFGF. Después se analizaron las células por transferencia de tipo Western. Se expresaron Gata4 y Gata6 a partir del día 2 y persistieron hasta el día 15. Se expresó troponina-T cardíaca después del día 4 y troponina-I cardíaca a partir del día 6 en adelante, mientras que se pudo detectar ANP después del día 11 (no mostrado). Se detectaron estas proteínas cardíacas en >70 % de las células por inmunohistoquímica en el día 15 (no mostrado). Se encontró el factor de transcripción Myf6 a partir del día 2 en adelante. La expresión de desmina comenzó el día 6 y de miogenina el día 2. También se encontró actina esquelética. Cuando se mantuvieron los cultivos durante >3 semanas, las células formaron sincitia. También se observaron contracciones espontáneas infrecuentes que se produjeron en los cultivos, que se propagaron durante varios mm de distancia.

La Fig.8 es una fotomicrografía que muestra la fusión de mioblastos y miotubos para formar miotubos multinucleados. Los mioblastos de una población transducida de eGFP de MASC se indujeron posteriormente con 5-azacitidina durante 24 y se mantuvieron en medio de expansión de MASC se cultivaron conjuntamente con mioblastos generados de MASC transducidas de e-GFP del mismo donante. Para inducir miotubos, se cultivaron mioblastos derivados de MASC (obtenidos después de la inducción de MASC no transducidas con 5-azacitidina durante 24 h después de que se mantuvieran en medio de expansión de MASC durante 14 días) con suero de caballo al 10 % en DMEM. Una vez se formaron las células multinucleadas, se incubaron miotubos con PKH26 (un colorante de membrana rojo), se lavaron y se cultivaron conjuntamente con miotubos transducidos de eGFP generados como se ha descrito anteriormente en presencia de suero de caballo al 10 %. Después de 2 días, se examinaron las células bajo un microscopio de fluorescencia. La fotomicrografía muestra que el mioblasto positivo de eGFP se ha fusionado con el miotubo marcado de PKH26. La Fig. 9 es un diagrama que describe procedimientos usados por los inventores para inducir la diferenciación del endotelio a partir de las MASC de la presente invención y marcadores usados para detectar la diferenciación del endotelio.

La Fig. 10 es una serie de fotografías de tinción con inmunofluorescencia para de terminar el factor von Willebrand y los marcadores CD34. Las MASC expresan Fli1 pero no CD34, PECAM, E- y P-selectina, CD36, Tie/Tek o Flt1. Cuando se cultivaron MASC con medio de MASC libre de suero con 20 ng/ml de VEGF, se observa la aparición de CD34 sobre la superficie celular y las células expresaron vWF en el día 14 (inmunofluorescencia). Cuando se cultivaron células inducidas de VEGF sobre matrigel o colágeno de tipo IV, se observó una formación tubular vascular.

La Fig. 11 es una serie de fotomicrografías que muestran que las MASC se diferencian para astrocitos, oligodendrocitos y células neuronales cuando se cultivan con SCF, Flt3-L, Tpo y Epo durante 14 días después de lo cual se cultivaron en medio de MASC que contenía SCF y EGF por el alimentador de apoyo hematopoyético AFT024. Se marcaron las células con anticuerpos frente a proteína glial-fibrilar-ácida (GFAP) (astrocitos), galactocerebrósido (GalC) (oligodendrocitos) y neurofilamento-68 y 200 (neuronas).

La Fig. 12 es una serie de fotomicrografías que muestran que, cuando se cultivan MASC de baja densidad en pocillos recubiertos con fibronectina con 100 ng/ml de bFGF, desarrollan neuronas. Se tiñeron un 20±2 % de las células positivas para p-tubulina-III, un 22±3 % para neurofilamento-68, un 50±3 % para neurofilamento-160, un 20±2 % para neurofilamento-200, un 82±5 % para enolasa específica neuronal (NSE) y un 80±2 % para proteína asociada a los microtúbulos 2 (MAP2). El número de neuritas por neurona se incrementó de desde 3±1, hasta 5±1 y 7±2 a partir de 2, 3 a 4 semanas después de la diferenciación. No mostrado, después de 2 semanas en el cultivo, un 26±4 % de las células fueron positivas para GFAP, un 28±3 % positivas para GalC, mientras que pocas células fueron positivas para GFAP o GalC después de 4 semanas.

La Fig. 13 muestra los resultados de RT-PCR y del análisis de transferencia de tipo Western para GFAP, proteína básica de mielina (MBP) y neurofilamento-200 x, x y días después de la inducción de MASC con bFGF.

La Fig.14 muestra el efecto de 100 ng/ml de bFGF, o 10 ng/ml de FGF-9, FGF-8, FGF-10, FGF-4, BDNF, GDNF o bien de CNTF sobre el desarrollo neuronal a partir de MASC. Se identificó la naturaleza de las células diferenciadas por inmunohistoquímica usando anticuerpos frente a GFAP, GalC, neurofilamento 200, tirosina hidroxilasa (TH), GABA y parvalbúmina, y acetilcolina (CAT). Cuando se cultiva durante 3 semanas con bFGF, las MASC se diferenciaron en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. No se detectaron GABA, parvalbúmina, tirosina hidroxilasa, DOPA-descarboxilasa, o triptófano hidroxilasa. Cuando se cultivó durante 3 semanas con 10 ng/ml de FGF-9 y EGF las MASC generaron astrocitos, oligodendrocitos y GABAérgica y dopaminérgica. Cuando se cultivaron MASC con 10 ng/ml de FGF-8 y EGF durante 3 semanas, se produjeron neuronas tanto dopaminérgicas como GABAérgicas. El cultivo de MASC en 10 ng/ml de FGF-10 y EGF durante tres semanas generó astrocitos y oligodendrocitos, pero no neuronas. Cuando se trató con 10 ng/ml de FGF-4 y EGF durante 3 semanas, MASC se diferenciaron en astrocitos y oligodendrocitos, pero no en neuronas. Cuando se trataron MASC con 10 ng/ml de BDNF y EGF, se observó diferenciación exclusiva en neuronas positivas para tirosina hidroxilasa. Cuando se cultivó con GDNF, las MASC se

diferenciaron en neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas. Cuando se cultivó con, se observó diferenciación exclusiva en neuronas GABAérgicas después de tres semanas.

Fig. 15. Se implantaron MASC no diferenciadas alrededor de un infarto parietal provocado por la ligadura de la arteria cerebral media en el cerebro de ratas Wistar. Se mantuvieron las ratas sobre ciclosporina y se examinó la función de las extremidades paralizadas 6 semanas después de la inyección de las MASC. Como control, los animales recibieron inyecciones salinas o medio acondicionado por MASC. Se muestran los resultados para el reemplazo de extremidad sometido a prueba 6 semanas después del trasplante de las MASC o de las soluciones de control. Sólo se observó la mejora funcional a niveles equivalentes a los de animales simulados en ratas trasplantadas con MASC.

Fig. 16 Se implantaron MASC no diferenciadas alrededor de un infarto parietal provocado por la ligadura de la arteria cerebral media en el cerebro de ratas Wistar. Se mantuvieron las ratas sobre ciclosporina y se examinó la función de las extremidades paralizadas 6 semanas después de la inyección de las MASC. Después de 2 y 6 semanas, se sacrificaron los animales para determinar el fenotipo neuronal. Debido a la autofluorescencia del cerebro después del trasplante con células eGFP⁺, se tuvo que recurrir a análisis inmuno-histoquímico del injerto. La mayoría de las células eGFP⁺ se detectaron en la propia zona del injerto a las 2 semanas. Después de 6 semanas, las células eGFP⁺ migraron fuera del injerto. En 2 semanas, las células con tinción con un anticuerpo anti-eGFP permanecieron esféricas en naturaleza y variaron desde 10-30 µm en diámetro. Después de 6 semanas, las células eGFP⁺ eran significativamente más pequeñas y se pudieron observar neuritas en la zona injertada, que se extendían fuera del tejido cerebral normal. Se confirmó la presencia de células humanas por tinción con un anticuerpo nuclear específico humano, NuMa (no mostrado). Este anticuerpo se usará en el futuro para identificar células humanas en el injerto permitiendo la tinción doble y triple con anticuerpos inmunofluorescentes. Al usar anticuerpos anti-nestina específicos humanos, se detectaron pequeñas agrupaciones de células positivas para nestina en la misma ubicación del injerto que las células positivas para NuMa y las células GFP⁺, lo que sugiere diferenciación neuroectodérmica. Además, se encontró tinción positiva para β -tubulina III y Neurofilamento-68 y -160, Oligomarcador y GFAP, lo que sugiere diferenciación para células neuronales y gliales.

La Fig. 17 muestra análisis inmunohistoquímico y de transferencia de tipo Western para citoqueratina 18 y 19 después de que se trataran MASC con HGF y KGF. Después de 14 días, se pudieron ver células epiteloides grandes que expresaron citoqueratina 18 y 19.

Descripción detallada de la invención

No se sabe si las células madre que están asignadas a un determinado linaje tienen la capacidad de someterse a una reprogramación genética similar a la que se produce en el "proceso de clonación" o "trans-diferenciación". Los inventores de la presente invención han mostrado que las células madre multipotentes persisten incluso después del nacimiento en múltiples órganos (tales como médula, hígado, cerebro) cuando se purifican desde estos órganos y se cultivan puede in vitro pueden proliferar sin senescencia obvia y se pueden diferenciar en múltiples tipos celulares, diferentes de los tejidos de los que se derivan. El fenotipo de células madre derivadas de diferentes órganos con "plasticidad" es similar (ARNm⁺CD45-CD44-HLA-DR HLA-clase I-oct3/4 y hTRT⁺). Además, las características de tales células madre son similares a las de, por ejemplo, las células germinativas primigenias de las que pueden ser un descendiente directo.

Los inventores de la presente invención tienen evidencias de que una pequeña fracción de células de médula, así como células en el cerebro y en el hígado, expresan comúnmente genes sólo encontrados en células ES o EG (oct-4, Rex-1). Además, los inventores de la presente invención han detectado células eGFP⁺ en la médula y en el cerebro ratones transgénicos recién nacidos para la construcción oct-4/eGFP, demostrando además que células que expresan para oct-4 están presentes en tejidos aparte de las células germinativas en la vida post-embionaria. Por lo tanto, un pequeño número de células madre puede persistir a lo largo de un adulto, viviendo en diferentes órganos que tengan características multipotentes. Esto explica la plasticidad percibida de las células madre derivadas de múltiples órganos.

Selección y fenotipo de células madre adultas multipotentes

La presente invención proporciona una célula de línea celular humana, como se expone en la reivindicación 1, que puede diferenciarse para formar células de hueso, cartílago, adipocitos, fibroblastos, células del estroma de la médula ósea, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, endotelio, células epiteliales (queratinocitos), células hemopoyéticas, gliales, neuronales y progenitoras de oligodendrocitos. Estas células muestran fenotipos de diferenciación más parecidos a una célula madre embrionaria que a cualquier célula madre derivada de adulto descrita hasta la fecha.

Se aislaron las células madre adultas multipotentes descritas en el presente documento por el procedimiento desarrollado por los inventores, que identificaron un número de marcadores de superficie celular específicos que caracterizan las MASC. Se puede usar el procedimiento de la presente invención para aislar células madre adultas multipotentes a partir de cualquier adulto, niño o feto, de origen humano, murino y de otras especies. Además, en el ratón, se han aislado estas células a partir de cerebro y de hígado. Por lo tanto, ahora es posible para un experto en

la técnica obtener aspirados de la médula ósea, biopsias de cerebro o hígado, y, posiblemente de otros órganos, y aislar las células usando técnicas de selección positiva o negativa conocidas por los expertos en la técnica, dependiendo de los marcadores de superficie expresados sobre estas células, como identificaron los inventores, sin experimentación indebida.

5 **A. MASC de médula humana:**

Para seleccionar las células madre adultas multipotentes, se derivan células mononucleares de médula ósea a partir de aspirados de la médula ósea, que se pueden obtener por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Muschler, G.F., y cols., J. Bone Joint Surg. Am. (1997) 79(11): 1699-709, Batinic, D., y cols., Bone Marrow Transplant. (1990) 6(2): 103-7). Las células madre adultas multipotentes están presentes dentro de la médula ósea (u otros órganos tales como hígado o cerebro), pero no expresan el antígeno de leucocitos común CD45 ni glucoforina-A (Gly-A) específica de eritroblasto. La población mezclada de células se somete a una separación de Ficoll Hypaque. Después, las células se someten selección negativa usando anticuerpos anti-CD45 y anti-Gly-A, deplecionando la población de células CD45⁺ y Gly-A⁺, y recuperando el aproximadamente 0,1 % restante de células mononucleares de médula. También se pueden plaquear las células en pocillos recubiertos con fibronectina y cultivados como se describe a continuación durante 2-4 semanas después de que las células se deplecionen de células CD45⁺ y Gly-A⁺. De forma alternativa, se usa selección positiva para aislar células usando una combinación de marcadores específicos de célula identificados por los inventores y descritos en el presente documento, tales como el receptor del factor inhibidor de leucemia (LIF). Los expertos en la técnica conocen técnicas de selección tanto positivas como negativas, y en la técnica también se conocen numerosos anticuerpos monoclonales y policlonales adecuados para fines de selección negativa (véase, por ejemplo, Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press) y están comercialmente disponible de varias fuentes. También se han descrito técnicas para la separación celular en mamíferos a partir de una mezcla de poblaciones celulares de Schwartz, y cols., en la patente de los Estados Unidos N.º 5.759.793 (separación magnética), Basch, y cols., J. Immunol. Methods (1983) 56: 269 (cromatografía por inmutafinidad), y Wysocki y Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978) 75: 2844 (clasificación celular activada por fluorescencia). (Fig. 1A) Se plaquean células CD45⁻/GlyA- recuperadas sobre placas de cultivo recubiertas con 5-115 ng/ml (preferentemente de aproximadamente 7-10 ng/ml) de fibronectina sérica u otro recubrimiento de matriz apropiado. Se mantienen las células en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) u otro medio de cultivo celular apropiado, suplementado con 1-50 ng/ml (preferentemente de aproximadamente 5-15 ng/ml) de factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), 1-50 ng/ml (preferentemente de aproximadamente 5-15 ng/ml) factor de crecimiento epidérmico (EGF), 1-50 ng/ml (preferentemente de aproximadamente 5-15 ng/ml) de factor de crecimiento similar a insulina (IGF), o 100-10.000 UI (preferentemente de aproximadamente 1.000 UI) de LIF, con dexametasona de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁸ M u otro esteroide apropiado, 2-10 µg/ml de ácido linoleico y ácido ascórbico 0,05-0,15 µM. Otros medios apropiados incluyen, por ejemplo, MCDB, MEM, IMDM, y RPMI. Las células se pueden mantener sin suero, en presencia de suero de ternero fetal al 1-2 %, o bien, por ejemplo, en suero AB humano al 1-2 % o suero autólogo. (Fig. 1B)

Los inventores de la presente invención han mostrado que las MASC cultivadas a baja densidad expresan el LIF-R, y estas células no expresan o expresan mínimamente CD44, mientras que las células cultivadas a alta densidad, que tienen características de MSC, pierden la expresión de LIF-R pero expresan CD44. El 1-2 % de las células CD45-GlyA- son CD44- y < 0,5 % de las células CD45-GlyA- son LIF-R⁺. Se sometieron células seleccionadas de FACS a RT-PCR cuantitativa (PCR en tiempo real) para ARNm de oct-4. Los niveles de ARNm de oct-4 eran 5 veces mayores en células CD45⁻GlyA- CD44- y 20 veces mayores en células CD45-GlyA-LIF-R⁺ que en células CD45-GlyA- no clasificadas. Se plaquearon células clasificadas en cultivo de MASC con 10 ng/ml de EGF, PDGF-BB y LIF. La frecuencia con la que comenzaron a crecer las MASC fue 30 veces mayor en células CD45-GlyA-LIF-R⁺, y de 3 veces mayor en células CD45-GlyA-CD44- que en células CD45-GlyA- no clasificadas.

45 Cuando se resiembran células humanas a <0,5x10³ células/cm², los cultivos crecen poco y mueren. Cuando se resiembran a >10x10³ células/cm² cada 3 días, las células dejan de proliferar después de <30 divisiones celulares y, como se discutirá a continuación, esto también provoca una pérdida de potencial de diferenciación. Cuando se resiembran a 2x10³ células/cm² cada 3 días, se pueden obtener rutinariamente >40 divisiones celulares, y algunas poblaciones han experimentado >70 divisiones celulares. El tiempo de división celular fue de 36-48 h para las 20-30 divisiones celulares iniciales. El tiempo de divisiones celulares posteriores se extendió como mucho a 60-72 h. (Fig. 2)

La longitud del telómero de MASC de 5 donantes (edades de 2 años a 55 años) cultivada a densidades de resiembra de 2x10³ células/cm² para 23-26 divisiones celulares fue de entre 11-13 kB. Ésta fue 5-5 kB más larga que la longitud del telómero de linfocitos sanguíneos obtenidos de los mismos donantes. La longitud del telómero de células de 2 donantes evaluada después de 23 y 25 divisiones celulares resp. y de nuevo después de 35 divisiones celulares, permaneció inalterada. El cariotipo de estas MASC fue normal. (Fig. 3)

60 **B. MASC de tejidos murinos:**

Se obtuvo médula de ratones C57/BL6 y se plaquearon células mononucleares o células deplecionadas de células positivas para CD45 y GlyA bajo las mismas condiciones de cultivo usadas para MASC humanas (10 ng/ml de PDGF-BB y EGF humana). Cuando se plaquearon las células mononucleares de médula, se deplecionaron células

5 CD45⁺ 14 días después del inicio de cultivo para retirar las células hemopoyéticas. Como para MASC humanas, se sembraron los cultivos a 2.000 células/cm² cada 2 divisiones celulares. Al contrario de lo que se observó con células humanas, cuando se plaquearon células mononucleares de médula murina deplecionadas el día 0 de células CD45⁺ en el cultivo de MASC, no se observó crecimiento. Cuando se plaquearon células mononucleares de médula murina, y se cultivaron células 14 días después de la depleción de células CD45⁺, aparecieron células con la morfología y el fenotipo similares a las de MASC humanas. Cuando se cultivaron con PDGF-BB y EFG solo, la división celular fue lenta (>6 días) y no se pudieron mantener los cultivos por encima de 10 divisiones celulares. La adición de 100-10.000 ng/ml (preferentemente 1.000 UI) de LIF mejoró significativamente el crecimiento celular y se han obtenido >70 divisiones celulares.

10 Se plaquearon células mononucleares de médula, cerebro o hígado mononuclear a partir de ratones FVB/N de 5 días de vida en cultivos de MASC con EGF, PDGF-BB y LIF sobre fibronectina. 14 días después, se retiraron las células CD45⁺ y se mantuvieron las células en condiciones de cultivo de MASC, como se ha descrito anteriormente. Las células con morfología y fenotipo similar al de las MASC humanas y MASC de médula murina C57B16 crecieron en cultivos iniciados con células de médula, cerebro o hígado de ratones FVB/N.

15

C. Fenotipo de MASC.

1. MASC humanas.

20 El análisis inmunofenotípico por FACS de MASC humanas obtenido después de 22-25 divisiones celulares mostró que las células no expresan CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD50, CD62E y -P, HLA-DR, Muc18, STRO-1, cKit, Tie/Tek; y expresan niveles bajos de CD44, HLA-clase I, y β 2-microglobulina, pero expresan CD10, CD13, CD49b, CD49e, CDw90, Flk1 (N>10).

25 Una vez que las células experimentan >40 divisiones en cultivos sembrados a 2x10³/cm², el fenotipo se vuelve más homogéneo y ninguna célula expresó HLA-clase-I o CD44 (n=6). Cuando se hicieron crecer células a una confluencia mayor, expresaron niveles altos de Muc18, CD44, HLA-clase I y β 2-microglobulina, lo que es similar al fenotipo descrito para MSC (N = 8) (Pittenger, Science (1999) 284: 143-147).

La inmunohistoquímica mostró que las MASC humanas que crecieron a una densidad de siembra de 2x10³/cm² expresan EGF-R, TGF-R1 y -2, BMP-R1A, PDGF-R1a y -B, y que una pequeña subpoblación (entre el 1 y el 10 %) de MASC se tiñe con anticuerpos anti-SSEA4 (Kannagi R, EMBO J 2:2355-61, 1983).

30 Se evaluó, con el uso de ensayos de ADNc Clontech, el perfil génico expresado de MASC humanas cultivadas a densidades de siembra de 2x10³/cm² para 22 y 26 divisiones celulares y se hallaron los siguientes perfiles:

A. MASC no expresan CD31, CD36, CD62E, CD62P, CD44-H, cKit, Tie, receptores para IL1, IL3, IL6, IL11, G-CSF, GM-CSF, Epo, Flt3-L, o CNTF, y bajos niveles de ARNm de HLA-clase-I, CD44-E y Muc-18.

35 B. MASC expresan ARNm para las citocinas BMP1, BMP5, VEGF, HGF, KGF, MCP1; los receptores de citocina Flk1, EGF-R, PDGF-R1 α , gp130, LIF-R, activina-R1 y R2, TGFR-2, BMP-R1A; los receptores de adhesión CD49c, CD49d, CD29; y CD10.

40 C. Las MASC expresan ARNm para hTERT y TRF1; el factor de transcripción de dominio POU oct-4 c sox-2 (requerido con oct-4 para mantener el estado no diferenciado de ES/EC, Uwanogho D, Mech Dev 49:23-36, 1995), sox-11 (desarrollo neuronal), sox-9 (condrogénesis, Lefebvre V, Matrix Biol 16:529-40, 1998); factores de transcripción de homeodominio: Hoxa4 y -a5 (especificación de esqueleto cervical y torácico; organogénesis de tracto respiratorio, Packer AI, Dev Dyn 17:62-74, 2000), Hox-a9 (mielopoyesis, Lawrence H, Blood 89:1922, 1997), D1x4 (especificación de cerebro anterior y estructuras periféricas de la cabeza, Akimenko MA, J Neurosci 14:3475-86, 1994), MSX1 (mesodermo embrionario, corazón y músculo adulto, condro- y osteogénesis, Foerst-Potts L, Dev Dyn 209:70-84, 1997), PDX1 (páncreas, Offield MF, Development 122:983-95, 1996)

D. Se ha confirmado la presencia de ARNm de oct-4, LIF-R y hTERT por RT-PCR.

45 E. Además, la RT-PCR mostró que ARNm de Rex-1 (requerido con oct-4 para mantener ES en un estado no diferenciado, Rosfjord E, Biochem Biophys Res Commun 203:1795-802, 1997) y ARNm de Rox-1 (requerido con oct-4 para la transcripción de Rex-1, Ben-Shushan E, Cell Biol 18:1866-78, 1998) se expresan en MASC.

50 oct-4 es un factor de transcripción expresado en el embrión pregastrulación, el embrión en la fase de división temprana, las células de la masa celular interior del blastocisto, y en las células de carcinoma embrionario (CE) (Nichols J, et al Cell 95:379-91, 1998), y está regulado por disminución cuando se inducen células para diferenciar. La expresión de oct-4 desempeña un papel importante en la determinación de las etapas tempranas en embriogénesis y diferenciación. oct-4, en combinación con Rox-1, provoca la activación transcripcional de la proteína Zn-finger Rex-1, también requerida para mantener ES no diferenciado (Rosfjord E, Rizzino A. Biochem Biophys Res Commun 203:1795-802, 1997; Ben-Shushan E, y cols, Mol Biol Celular 18:1866-78, 1998). Además,

sox-2, expresado en ES/CE, pero también en otras células más diferenciadas, es necesario junto con oct-4 para retener el estado no diferenciado de ES/CE (Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, Pearl G, Healy C, Scotting PJ, Sharpe PT: La expresión embrionaria de los genes Sox2, Sox3 y Sox11 de gallina sugiere un papel interactivo en el desarrollo neuronal. Mech Dev 49:23-36, 1995). El mantenimiento de células ES murinas y de células germinativas primigenias requiere la presencia de LIF, mientras que este requisito no está tan claro para células ES humanas y no humanas de primate.

Los inventores de la presente invención observaron que oct-4, Rex-1 y Rox-1 se expresan en MASC derivadas de médula humana y murina y de hígado y cerebro murino. Las MASC humanas expresan el LIF-R y son positivas en tinción con SSEA-4. Los experimentos iniciales muestran que MASC humanas están enriquecidas por la selección de células LIF-R⁺ incluso aunque aún no esté claro si su crecimiento está afectado por LIF. En cambio, LIF ayuda en el crecimiento de MASC murinas. Finalmente, los niveles de ARNm de oct-4, LIF-R, Rex-1 y Rox-1 se incrementan en cultivos de MASC humanas por encima de 30 divisiones celulares, lo que da como resultado células fenotípicamente más homogéneas. En cambio, las MASC cultivadas a alta densidad pierden la expresión de estos marcadores. Esto está asociado con la senescencia antes de 40 divisiones celulares y la pérdida de diferenciación para células diferentes de condroblastos, osteoblastos y adipocitos. Así, la presencia de oct-4, combinado con Rex-1, Rox-1, sox-2, y LIF-R son marcadores que se correlacionan con la presencia de las células más primitivas en los cultivos de MASC.

Los inventores de la presente invención han examinado ratones transgénicos para un gen de eGFP promotora de oct-4. En estos animales, la expresión de eGFP se observa en células germinativas primigenias así como en células germinativas después del nacimiento. Como las MASC expresan oct-4, los inventores de la presente invención sometieron a prueba si las células positivas para eGFP se podrían encontrar en la médula, el cerebro y el hígado de estos animales después del nacimiento. Se clasificaron las células eGFP⁺ (1 % de la población más brillante) a partir de médula, cerebro e hígado de ratones de 5 días de vida. Cuando se evaluó por microscopía de fluorescencia, <1 % de las células clasificadas a partir de cerebro y médula fueron eGFP⁺. Se pudo detectar ARNm de oct-4 por Q-RT-PCR en la población clasificada. Se han plaqueado células clasificadas bajo condiciones que soportan las MASC murinas (pocillos recubiertos de fibronectina con EGF, PDGF, LIF). Las células sobrevivieron pero no se expandieron. Cuando se transfirieron a fibroblastos embrionarios murinos, se observó crecimiento celular. Cuando se replaquearon de nuevo bajo condiciones de MASC, se detectaron células con morfología y fenotipo de MASC.

2. MASC murinas.

Al igual que para células humanas, las MASC de C57/BL6 cultivadas con con EGF, PDGF-BB y LIF son negativas para CD44 y HLA-clase-I, positivas en tinción con SSEA-4, y expresan transcritos para oct-4, LIF-R, Rox-1 y sox-2. De forma análoga, las MASC de médula, cerebro e hígado de FVB/N, expresan ARNm de oct3/4.

Cultivo de células madre adultas multipotentes

Se pueden cultivar células madre adultas multipotentes (MASC) aisladas como se describe en el presente documento usando procedimientos de la invención. En resumen, se prefiere el cultivo en medio con poco suero o libre de suero para mantener las células en el estado no diferenciado. Se complementa el medio libre de suero usado para cultivar las células, como se describe en el presente documento, como se describe en la tabla I.

Tabla I

Insulina	10-50 µg/ml (10 µg/ml)*
Transferrina	0-10 µg/ml (5,5 µg/ml)
Selenio	2 - 10 ng/ml (5 ng/ml)
albúmina sérica bovina (BSA)	0,1-5 µg/ml (0,5 µg/ml)
Ácido linoleico	2-10 µg/ml (4,7 µg/ml)
Dexametasona	0,005 - 0,15 µM (0,01 µM)
Ácido L-ascórbico 2-fosfato	0,1 mM
DMEM bajo en glucosa (DMEM-LG)	40 - 60 % (60 %)
MCDB-201	40 - 60 % (40 %)
Suero de ternero fetal	0-2 %
Crecimiento derivado de plaquetas	5-15 ng/ml (10 ng/ml)
Factor de crecimiento epidérmico	5-15 ng/ml (10 ng/ml)
Factor de crecimiento similar a insulina	5-15 ng/ml (10 ng/ml)

Factor inhibidor de leucemia	10-10.000 IU (1.000 IU)
* Se muestran las concentraciones preferidas entre paréntesis.	

Debido a que las MASC expresan el LIF-R y algunas células expresan oct-4, se sometió a prueba si la adición de LIF mejoraría el cultivo. La adición de 10 ng/ml de LIF a MASC humanas no afectó al crecimiento celular a corto plazo (el mismo tiempo de división celular hasta 25 divisiones celulares, nivel de expresión de oct-4). Al contrario de lo que se observó con células humanas, cuando se plaquearon células mononucleares de médula murina deplecionadas el día 0 de células CD45⁺ en el cultivo de MASC, no se observó crecimiento. Cuando se plaquearon células mononucleares de médula murina, y se cultivaron células 14 días después de la depleción de células CD45⁺, aparecieron células con la morfología y el fenotipo similares a las de MASC humanas. Esto sugiere que se pueden necesitar factores secretados por células hematopoyéticas para soportar el crecimiento inicial de MASC murinas. Cuando se cultivaron con PDGF-BB y EFG solo, la división celular fue lenta (>6 días) y no se pudieron mantener los cultivos por encima de 10 divisiones celulares. La adición de 10 ng/ml de LIF potenció significativamente el crecimiento celular.

Una vez establecidas en el cultivo, las células se pueden congelar y almacenar como disoluciones congeladas, usando DMEM con FCS al 40 % y DMSO al 10 %. Los expertos en la técnica también conocen otros procedimientos para la preparación de disoluciones congeladas para células cultivadas.

Inducción de MASC para diferenciar para formar progenitores asignados y tipos celulares específicos de tejido

Con el uso de factores de crecimiento apropiados, quimocinas y citocinas, se pueden inducir las MASC de la presente invención para diferenciarse para formar un número de linajes celulares, incluyendo, por ejemplo, diversas células de origen mesodérmico así como célula de origen neuroectodérmico (células gliales, oligodendrocitos y neuronas) así como de origen endodérmico.

A. Mesodermo esplácnido

1. Osteoblastos: Se cultivaron MASC confluentes con aproximadamente dexametasona 10^{-6} - 10^{-8} M (de manera preferida aproximadamente 10^{-7} M), β -glicerofosfato y ácido ascórbico 5-20 mM (preferentemente 10mM). Para demostrar la presencia de osteoblastos, se usó la tinción de Von Kossa (reducción con plata de CaPO₄), o anticuerpos frente a sialoproteína ósea, osteonectina, osteopontina y osteocalcina (inmunohistoquímica/Western). Después de 14-21 días de cultivo, >80 % de las células se tiparon como positivas con estos anticuerpos. (Fig. 5, 6)

2. Condroblastos: Se tripsinizaron MASC, y se cultivaron en DMEM libre de suero suplementado con 50-1.00 ng/ml (preferentemente 100 ng/ml) de TGF- β 1 en cultivo de suspensión de micromasa. Se formaron pequeños agregados de cartílago en el fondo de las pipetas que se tiñeron como positivos con azul de toluidina. Inicialmente se detectó colágeno de tipo I en toda la micromasa (día 5), pero después de 14 días sólo se detectó en la capa externa del cartílago fibroso. Se pudo detectar colágeno de tipo II después de 5 días y se tiñó fuertemente la micromasa en el día 14. La tinción para sialoproteína ósea fue negativa o mínimamente positiva en la capa de cartílago fibroso externa. Se encontró una tinción variable para osteonectina, osteocalcina y osteopontina. Se confirmó la presencia de colágeno de tipo II por transferencia de tipo Western y RT-PCR. Además, la RT-PCR sobre células recuperadas después de 5 días mostró la presencia de los factores de transcripción específicos para cartílago CART1 y CD-RAP1. (Fig. 5, 6)

3. Adipocito: Para inducir la diferenciación de adipocito, se puede usar dexametasona de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-6} M (de manera preferida aproximadamente 10^{-7} M), de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 μ g/ml (de manera preferida aproximadamente 100 μ g/ml) de insulina o medio suplementado con aproximadamente suero de caballo al 20 %. Se puede detectar la diferenciación de adipocito por examen con microscopía de luz, tinción con rojo de aceite o detección de lipoproteína lipasa (LPL), proteína de unión a lípido adipocito (aP2), o receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR). Los expertos en la técnica conocen procedimientos para la detección de marcadores celulares y productos, y pueden incluir la detección usando ligandos específicos, tales como, por ejemplo, troglitazona (TRO) y rosiglitazona (RSG), que se unen a PPARy. (Fig 5, 6)

4. Perfil génico expresado de cartílago y hueso. Los inventores de la presente invención examinaron genes expresados tras la diferenciación para osteoblastos y condroblastos. En particular, examinaron el perfil génico expresado de MASC (n=3) y MASC cambiadas a condiciones de cultivo de osteoblastos o condroblastos durante dos días para determinar si se observa un cambio homogéneo relativo para los dos linajes específicos, usando los ensayos de ADNc de Clontech e Invitrogen. Una lista parcial de cambios detectados se muestra en la tabla 2. Esto no es de ninguna manera una evaluación concluyente del perfil génico expresado en MASC, osteoblastos y condroblastos. Sin embargo, los resultados indican que la diferenciación de MASC para hueso y cartílago induce cambios significativos y divergentes en el perfil génico expresado, consistentes con la observación de que la mayoría de las células dentro de un cultivo pueden inducirse para diferenciar sobre una vía dada.

Tabla 2: Genes expresados diferencialmente en MASC, osteoblastos y condroblastos

Familia	Pérdida Osteoblasto o condroblasto	Adquisición/incremento osteoblasto	condroblasto
Factores de transcripción	oct-4, sox-2, Hoxa4, 5, 9; D1x4, PDX1, hTERT, TRF1	Hox7, hox11, sox22	Sox-9, FREAC, hox-11, hox7, CART1, Notch3
Ciclo celular	Ciclinas, cdk's	Cdk's	Cdk's
Receptores de adhesión y ECM	sindecano-4; distroglucano integrina $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$,	sindecano-4, decorina, lumicano, fibronectina, sialoproteína ósea, TIMP-1, CD44, integrina $\beta 8$, $\beta 5$	colágeno-II, fibronectina, decorina, glucoproteína de cartilago, proteína de matriz oligomérica de cartilago, MMP y TIMP, N-cadherina, CD44, integrina $\alpha 1$ y $\alpha 6$
Citocina-R/ citocinas	FLK1, LIF-R, RAR- α , RAR γ , EGF-R, PDGF-R1a y -B, TGF-R1 y -2, BMP-R1A, BMP1 y 4, HGF, KGF, MCP1	PTHr-P, Leptina-R, VitD3-R, FGF-R3, FGF-R2, estrógeno-R, wnt-7a, VEGF-C, BMP2	VitD3-R, BMP2, BMP7

5. Perfil génico expresado de hueso por hibridación sustractiva: Los inventores de la presente invención usaron un enfoque de sustracción para identificar diferencias genéticas entre MASC no diferenciadas y progenie asignada. Se extrajo ARNm de Poli-A de MASC no diferenciadas y se indujo la diferenciación de las células en el linaje de osteoblastos durante 2 días. Se realizó la sustracción y la amplificación de los ADNc expresados diferencialmente usando el kit PCR-Select de Clontech, con la recomendación del fabricante sin modificación. Se comenzó a analizar secuencias génicas expresadas en cultivos de osteoblastos de 2 días pero no en MASC no diferenciadas.

1) Los inventores de la presente invención secuenciaron 86 secuencias de ADNc expresadas diferencialmente. Se confirmó por Northern que los ARNm están de hecho expresados específicamente en progenitores de osteoblastos de 2 días y no en MASC. Se compararon las secuencias (usando el algoritmo BLAST) para las siguientes bases de datos: colecciones de proteínas y nucleótidos SwissProt, GenBank, EST, contigs. de EST murina y humana.

2) Se categorizaron las secuencias por homología: 8 son factores de transcripción, 20 están implicadas en el metabolismo celular; 5 en reparación de cromatina; 4 en la vía de apoptosis; 8 en la función mitocondrial; 14 son receptores de adhesión / componentes de ECM; 19 son secuencias de EST publicadas con función desconocida y 8 son novedosas.

3) Para 2 de las secuencias novedosas, los inventores de la presente invención comenzaron a realizar Q-RT-PCR sobre MASC inducidas para diferenciarse para hueso durante 12 h, 24 h, 2 días, 4 días, 7 días y 14 días a partir de 3 donantes individuales. Se expresaron los genes durante don 2 y 4 días iniciales de diferenciación respectivamente, y después se regularon por disminución.

4) Los inventores de la presente invención también han comenzado a analizar genes presentes en MASC no diferenciadas pero no osteoblastos de 2 días. Se han secuenciado treinta genes expresador diferencialmente y 5 de ellos son secuencias EST o secuencias desconocidas.

B. Músculo

La diferenciación para cualquier fenotipo muscular requirió que se dejara que las MASC se volvieran confluentes antes de la inducción de la diferenciación.

1. Músculo esquelético: Para inducir la diferenciación celular del músculo esquelético, se trataron MASC confluentes con 5-azacitidina de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 μ M (preferentemente de aproximadamente 3 μ M) en medio de expansión de MASC durante 24 horas. Después, se mantuvieron los cultivos en medio de MASC. Se evaluó la diferenciación con transferencia de tipo Western e inmunohistoquímica. Se puede demostrar la diferenciación del músculo esquelético *in vitro* detectando la activación secuencial de Myf-5, Myo-D, Myf-6, miogenina, desmina, actina esquelética y miosina esquelética, por inmunohistoquímica o análisis de transferencia de tipo Western usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica y anticuerpos comercialmente disponibles. Cinco días después de la inducción con 5-azacitidina, los factores de transcripción Myf5, Myo-D y Myf6 se pudieron detectar en aproximadamente el 50 % de las células. Después de 14-18 días, Myo-D se expresó en niveles significativamente menores, mientras que Myf5 y Myf6 persistieron. Se detectó desmina y actina esquelética tan solo 4 días después de la inducción, y miosina esquelética en 14 días. Por

inmunohistoquímica, el 70-80 % de las células expresaron proteínas musculares maduras después de 14 días. El tratamiento con 5-azacitidina dio como resultado la expresión de Gata4 y Gata6 durante la primera semana del cultivo. Además, se pudieron detectar niveles bajos de troponina-T desde el día dos en adelante. Se detectó actina del músculo liso a los 2 días después de la inducción y persistió durante 14 días. Cuando se añadió suero de caballo al 20 %, se observó una fusión de mioblastos en miotubos que eran multinucleados. (Fig. 7) Usando un marcado fluorescente doble se pudo mostrar que los mioblastos transducidos pudieron provocar la fusión con miocitos diferencialmente laterales (Fig. 8).

2. Músculo liso: También se pueden inducir células del músculo liso cultivando MASC en medio libre de suero sin factores de crecimiento, suplementado con concentraciones altas (de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 ng/ml, preferentemente de aproximadamente 100 ng/ml) de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Preferentemente, las células deberían ser confluentes al inicio de la diferenciación. Se pueden identificar células del músculo liso terminalmente diferenciadas detectando la expresión de desmina, actina específica del músculo liso, y miosina específica del músculo liso por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Se detectó actina del músculo liso desde el día dos en adelante y miosina del músculo liso después de 14 días. Aproximadamente un 70 % de las células se tiñeron como positivas con anticuerpos de anti-actina y miosina del músculo liso. Se observó una presencia de miogenina desde día cuatro en adelante y de desmina después de 6 días. También se detectaron proteínas Myf5 y Myf6 después de 2-4 días, que persistieron hasta el día 15. No se detectó Myo-D. (Fig. 7)

3. Músculo cardíaco: Se puede llevar a cabo la diferenciación del músculo cardíaco añadiendo de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 ng/ml (preferentemente de aproximadamente 100 ng/ml) de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) al medio de cultivo libre de suero estándar sin factores de crecimiento, como se ha descrito previamente. Se expusieron MASC confluentes a 5-azacitidina μM (preferentemente de aproximadamente 3 μM) y a ácido retinoico 10^{-5} - 10^{-7} M (preferentemente 10^{-6} M), y después se cultivó en medio de expansión de MASC. De forma alternativa, se cultivaron MASC con cualquiera de estos inductores solos o en una combinación de ambos y después se cultivaron en medio libre de suero con 50-200 ng/ml (preferentemente 100 ng/ml) de FGF2 o una combinación de 5-20 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de BMP-4 y 100 ng/ml de FGF2. Se encontró expresión de proteínas consistentes con cardiomiocitos. Se expresaron Gata4 y Gata6 a partir del día 2 y persistieron hasta el día 15. Se expresó troponina-T cardíaca después del día 4 y troponina-I cardíaca desde día 6 en adelante, mientras que se pudo detectar ANP después del día 11. Se detectaron estas proteínas cardíacas en >70 % de las células por inmunohistoquímica en el día 15. Se encontraron el factor de transcripción Myf6 desde el día 2 en adelante. La expresión de desmina comenzó el día 6 y de miogenina el día 2. También se encontró actina esquelética. Cuando se mantuvieron los cultivos durante >3 semanas, las células formaron sincitia. También se observaron contracciones espontáneas infrecuentes que se produjeron en los cultivos, que se propagaron durante varios mm de distancia. (Fig. 7)

C. Células endoteliales Las MASC expresan Flk1 pero no CD34, PECAM, E- y P-selectina, CD36, Tie/Tek o Flt1. Cuando se cultivan MASC con medio de MASC libre de suero con 20 ng/ml de VEGF, se observa la aparición de CD34 sobre la superficie celular y las células expresaron vWF en el día 14 (inmunofluorescencia) (Fig. 9, 10). Además, las células expresaron Tie, Tek, Flk1 y Flt1, PECAM, P-selectina y E-selectina y CD36. Se confirmaron los resultados de la tinción histoquímica por transferencia de tipo Western. Cuando se cultivaron células inducidas de VEGF sobre matrigel o colágeno de tipo IV, se observó una formación tubular vascular. (Fig. 9, 10)

D. Células hemopoyéticas. Como las MASC se diferencian en células endoteliales CD34⁺ y estudios recientes muestran que las células CD34-Flk1⁺ se pueden inducir para diferenciarse en células endoteliales así como en células hemopoyéticas, se sometió a prueba si las MASC se podían inducir para diferenciar en precursores hemopoyéticos. Se replaquearon MASC sobre colágeno de tipo IV en medio de MASC que contenía PDGF-BB-y EGF con FCS al 5 % y 100 ng/ml de SCF que se condicionó por el alimentador AFT024, una línea mesenquimal derivada de hígado fetal que soporta células madre de repoblación murinas y humanas *ex vivo*. Las células recuperadas de estos cultivos expresaron cKit, cMyb, Gata2 y G-CSF-R, pero no CD34 (RT-PCR). Debido a que la hemopoyesis está inducida por factores que se liberan por endodermo visceral embrionario, se cultivaron conjuntamente MASC humanas con EB murinas βGal^+ en presencia de SCF humana, Flt3-L, Tpo y Epo. En 2 estudios separados, se detectó una pequeña población de células βGal^- que expresaron CD45 humana.

E. Células del estroma: Los inventores indujeron diferenciación "estromal" incubando MASC con IL-1a, FCS y suero de caballo. Para demostrar que estas células puede soportar la hemopoyesis, se irradiaron los alimentadores a 2.000 cGy y se plaquearon células sanguíneas del cordón umbilical CD34⁺ en contacto con el alimentador. Después de 1, 2 y 5 semanas, se replaqueó la progenie en metilcelulosa para determinar el número de células que formaron colonias (CFC). Se observó una expansión de 3-5 veces de CFC después de 2 semanas y el mantenimiento de CFC en 5 semanas, que fue similar a los cultivos de células CD34⁺, en contacto con el alimentador derivado de hígado fetal murino, AFT024.

F. Células neuronales Sorprendentemente, las MASC inducidas con VEGF, las citocinas hemopoyéticas SCF, Flt3-L, Tpo y Epo en medio de MASC que contenía EGF condicionado por el alimentador de soporte hematopoyético AFT024, se diferenciaron en astrocitos positivos para proteína glial-fibrilar-ácida (GFAP), oligodendrocitos positivos para galactocerebrósido (GalC) y neuronas positivas para neurofilamentos (Fig. 11). Los inventores plantearon la

hipótesis de que la producción de FGF2 por los alimentadores AFT024 y la adición de EGF a los cultivos puede inducir la diferenciación a las células neuronales *in vitro*.

Después, se examinó el efecto de FGF2, conocido por desempeñar un papel clave en el desarrollo neuronal y en el cultivo *ex vivo* de precursores neuronales, sobre el desarrollo neuronal derivado de las MASC. Cuando se cambió <50 % de cultivos confluentes de MASC derivadas de médula humana (n=7) que se habían cultivado con EGF y PDGF-BB a un medio que contenía 50-500 ng/ml (preferentemente 100ng/ml) de FGF2, se observó diferenciación para células que expresaban para astrocitos, oligodendrocitos y neuronas después 2-4 semanas (Fig. 11). Después de dos semanas en cultivo, el 26±4 % de las células fueron positivas para GFAP, el 28±3 % positivas para GalC y el 46±5 % positivas para neurofilamento-200. Cuando se volvió a examinar después de tres semanas, menos células fueron positivas para GFAP o GalC, pero el 20±2 % de las células se tiñeron como positivas para p-tubulina-III, el 22±3 % para neurofilamento-68, el 50 ± 3 % para neurofilamento-160, el 20±2 % para neurofilamento-200, el 82 ± 5 % para enolasa específica de neurona (NSE) y el 80 ± 2 % para proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) (Fig. 11). No se detectaron GABA, parvalbúmina, tirosina hidroxilasa, DOPA-descarboxilasa ni triptófano hidroxilasa. El número de neuritas por neurona se incrementó de desde 3±1, hasta 5±1 y 7±2 a partir de 2, 3 a 4 semanas después de la diferenciación. Se confirmó la diferenciación para células con características de astrocitos, oligodendrocitos y neuronas demostrando la presencia de GFAP, proteína básica de mielina (MBP) y neurofilamento-200 por transferencia de tipo Western y análisis RT-PCR tratado en FGF2 pero sin MASC).

El FGF-9, aislado en primer lugar a partir de una línea celular de glioblastoma, induce la proliferación de células gliales en cultivo. El FGF-9 se encuentra *in vivo* en neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, sustancia negra, núcleos motores del tronco encefálico y capas celulares de Purkinje. Cuando se cultivó durante 3 semanas con 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de FGF-9 y EGF las MASC generaron astrocitos, oligodendrocitos y GABAérgica y dopaminérgica. Durante el desarrollo del SNC, FGF-8, expresado en el límite mesencéfalo/rombencéfalo por el prosencéfalo rostral, en combinación con el erizo sónico, induce la diferenciación de neuronas dopaminérgicas en mesencéfalo y prosencéfalo. Se ha observado que cuando se cultivaron las MASC con 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de FGF-8 y EGF durante 3 semanas, se produjeron neuronas tanto GABAérgicas como dopaminérgicas. El FGF-10 se encuentra en el cerebro en cantidades muy bajas y su expresión está restringida al hipocampo, tálamo, mesencéfalo y tronco encefálico donde se expresa de forma preferente en neuronas pero no en células gliales. El cultivo de MASC en 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de FGF-10 y EGF durante tres semanas generó astrocitos y oligodendrocitos, pero no neuronas. El FGF-4 se expresa por el notocordio y se requiere para la regionalización del mesencéfalo. Cuando se trató con 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de FGF-4 y EGF durante 3 semanas, las MASC se diferenciaron en astrocitos y oligodendrocitos, pero no en neuronas.

Otros factores de crecimiento que son se expresan específicamente en el cerebro y que afectan al desarrollo neuronal *in-vivo* e *in-vitro* incluyen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de glial (GDNF) y factor neurotrófico ciliar (CNTF). El BDNF es un miembro de la familia de los factores de crecimiento nervioso que promueve la diferenciación *in vitro* de NSC, células subependimales humanas, y precursores neuronales para neuronas y promueve la excreción de neuritas de células madre hipocámpicas *in vivo*. De acuerdo con la función conocida de BDNF de soportar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, cuando se trataron MASC con 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de BDNF y EGF se observó diferenciación exclusiva en neuronas positivas para tirosina hidroxilasa. El GDNF es un miembro de la superfamilia TGF. En neurogénesis temprana, GDNF se expresa en el neuroectodermo anterior lo que sugiere que puede desempeñar un papel clave en el desarrollo neuronal. El GDNF promueve la supervivencia de neuronas motoras en el nervio y el músculo periférico y tienen capacidades neurotróficas y de diferenciación. Se ha encontrado que 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de GDNF indujeron MASC para diferenciarse en neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas. El CNTF, aislado en primer lugar a partir de ganglio ciliar, es un miembro de la familia de gp130 de citocinas. El CNTF promueve la supervivencia neuronal temprana en el desarrollo. En cultivos hipocámpicos de ratas embrionarias, CNTF incrementó el número de neuronas GABAérgicas y colinérgicas. Además, evitó la muerte celular de neuronas GABAérgicas y promovió la incorporación de GABA. 5-50 ng/ml (preferentemente 10 ng/ml) de CNTF ejerció la misma inducción GABAérgica sobre MASC ya que éstas se diferenciaban exclusivamente en neuronas GABAérgicas después de tres semanas de la exposición a CNTF.

También se examinó el destino de las MASC trasplantadas en cerebro de rata. Se trasplantaron 50.000 MACS de eGFP⁺ estereotácticamente alrededor de un infarto parietal inducido en ratas Wistar, mantenidas sobre ciclosporina. Se sometió a prueba el reemplazo de extremidad seis semanas después del trasplante de solución salina, medio acondicionado de MASC o MASC. Sólo se observó una mejora funcional en niveles equivalentes a los animales simulados en ratas trasplantadas con MASC (Fig. 15).

Después de 2 y 6 semanas, se sacrificaron los animales para determinar el fenotipo neuronal. Debido a la autofluorescencia del cerebro después del trasplante con células eGFP⁺, se realizó un análisis inmunohistoquímico del implante. La mayoría de las células eGFP⁺ se detectaron en la propia zona del injerto a las 16 semanas (Fig. 16). Después de cinco semanas, las células eGFP⁺ migraron fuera del injerto. En dos semanas, las células con tinción con un anticuerpo anti-eGFP permanecieron esféricas en naturaleza y variaron desde 10-30 µm en diámetro. Después de seis semanas, las células con un anticuerpo anti-eGFP eran significativamente más pequeñas y se pudieron observar dendritas en la zona injertada, que se extendían fuera del tejido cerebral normal. Se confirmó la presencia de células humanas por tinción con un anticuerpo nuclear específico humano, NuMa. Este anticuerpo se

puede usar para identificar células humanas en el injerto permitiendo la tinción doble y triple con anticuerpos inmunofluorescentes.

Al usar anticuerpos anti-*nestina* específicos humanos, los inventores de la presente invención detectaron pequeñas agrupaciones de células positivas para *nestina* en la misma ubicación del injerto que las células positivas para NuMa y las células GFP⁺, lo que sugiere diferenciación neuroectodérmica. Además, se encontró tinción positiva para β -tubulina III y Neurofilamento-68 y -160, Oligomarcador y GFAP, lo que sugiere diferenciación para células neuronales y gliales (no mostrado).

G. Células epiteliales Los inventores trataron MASC confluentes (N = 4) con 10 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocito (HGF), solo o en combinación con factor de crecimiento de queratinocito (KGF). Después de 14 días, se pudieron observar células epitelioides grandes que expresaron el receptor HGF, citoqueratina 8, 18 y 19. La presencia de citoqueratina-19 sugiere una posible diferenciación para epitelio biliar. El cambio de matriz de fibronectina a un gel de colágeno o matrigel mejoró la generación de células que expresaban citoqueratina-18 con morfología de células epiteliales. (Fig. 17)

Origen celular individual de linajes diferenciados.

Para verificar si las MASC son clonales, los inventores han clasificado por FACS 1 y 10 células eGFP⁺ transducidas por MFG-eGFP por pocillo y han cultivado células para generar 10⁸ células. Se realizó la transducción como sigue: Se expusieron MASC replaqueadas 24h antes durante 6 h en 2 días secuenciales a MFG-eGFP o MSCV-eGFP envasado en la línea celular PG13 y 10 μ g/ml de protamina. Se transdujeron entre el 40-70 % de MASC. La expresión de eGFP persistió durante al menos 3 meses *ex vivo*, y persistió en una fracción grande de células después de la diferenciación. Cuando se clasificó una línea celular individual, no se observó crecimiento en >1.000 pocillos. Sin embargo, cuando se depositaron/pocillo 10 células, se observó crecimiento celular en el 3 % de los pocillos, se observó expansión extensiva para >10⁷ células sólo en el 0,3 % de los pocillos. Después se indujeron estas células para diferenciarse en todos los tipos celulares mesodérmicas (osteoblastos, condroblastos, adipocitos, células esqueléticas y del músculo liso y endotelio). De nuevo se mostró la diferenciación por inmunohistoquímica y transferencia de tipo Western. También se sometieron células a PCR inversa para demostrar que las secuencias en el ADN humano que flanquean la inserción vírica eran similares. Los inventores encontraron que se insertó el gen retrovírico en la misma zona en el genoma humano en MASC y se diferencia progenie en 3 clones independientes.

Injerto de MASC

Los inventores comenzaron estudios para examinar si las MASC se injertan y persisten *in vivo*.

1. Los inventores injertaron MASC de eGFP⁺ intramuscularmente en ratones NOD-SCID. Se sacrificaron animales 4 semanas después y se examinó el músculo para determinar si, como se ha descrito para células ES humanas, se desarrollan teratomas. En 5/5 de los animales, no se observaron teratomas. Se detectaron células positivas para eGFP.
2. Los inventores infundieron MASC de eGFP⁺ intramuscularmente en ratones SCID fetales. Se evaluaron los animales inmediatamente después del nacimiento. El análisis por PCR demostró la presencia de células eGFP⁺ en el corazón, el pulmón, el hígado, el bazo y la médula.
3. Los inventores trasplantaron MASC estereotáxicamente en el cerebro intacto o en el cerebro infartado de ratas, adquieren un fenotipo compatible con células neuronales, y persisten durante al menos 6 semanas.

Aplicaciones de las MASC

- 1. Osteoblastos:** Se pueden usar las MASC de la presente invención que se han inducido para diferenciarse para formar células óseas como tratamiento celular o para regeneración de tejido en osteoporosis, enfermedad de Paget, fractura ósea, la osteomielitis, osteonecrosis, acondroplasia, osteogénesis imperfecta, exostosis múltiple hereditaria, displasia apifisaria múltiple, síndrome de Marfan, mucopolisacaridosis, neurofibromatosis o escoliosis, cirugía reconstructiva para malformaciones localizadas, espina bífida, hemivértabras o vértebras fusionadas, anomalías de extremidades, reconstrucción de tejido dañado por tumor y reconstrucción después de infección, tal como infección del oído medio.
- 2. Condrocitos:** Se pueden inducir las MASC de la presente invención para diferenciarse para formar células de cartílago para tratamiento celular o regeneración e tejido en enfermedades o lesiones relacionadas con la edad, en lesiones relacionadas con el deporte, o en enfermedades específicas tales como la artritis reumatoide, artritis de psoriasis, artritis de Reiter, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, espondiloartritis anquilosante, artrosis, cirugía reconstructiva del oído externo, cirugía reconstructiva de la nariz, y cirugía reconstructiva del cartílago cricoides.
- 3. Adipocitos:** Se pueden usar loa adipocitos derivados de las MASC en remodelación durante cirugía reconstructiva o estética, así como para el tratamiento de diabetes de tipo II. En cirugía reconstructiva, se pueden usar los adipocitos diferenciados como se describe por el procedimiento de la presente invención para la

reconstrucción de mama después de una mastectomía, por ejemplo, o para reestructurar tejido perdido como resultado de otra cirugía, tal como retirada de tumor de la cara o de la mano. En cirugía estética, se pueden usar los adipocitos producidos a partir de las células de la presente invención por el procedimiento de la presente invención en diversas técnicas, tales como el aumento de pecho, o para la reducción de arrugas en la piel. Los adipocitos así derivados también puede proporcionar un sistema modelo *in vitro* eficaz para el estudio de la regulación de grasa.

4. Fibroblastos: Se pueden usar los fibroblastos derivados de las MASC para tratamiento celular o reparación de tejido para promover cicatrización de heridas o para proporcionar un soporte de tejido conectivo, tal como una estructura para cirugía estética.

5. Músculo esquelético: Se pueden inducir las MASC para diferenciarse para formar células del músculo esquelético para el tratamiento celular o reparación de tejido en el tratamiento de distrofia muscular de Duchene, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, miopatía esquelética y cirugía reconstructiva para reparar daño en el músculo esquelético.

6. Músculo liso: Se pueden inducir las MASC para diferenciarse para formar células del músculo liso para tratamiento celular o reparación de tejido en el tratamiento de anomalías en el desarrollo del sistema gastrointestinal, tales como atresia esofágica, atresia intestinal, e intususcepción, así como para el reemplazo de tejidos después de cirugía por infarto intestinal o colocolostomía.

También se pueden usar las células del músculo liso formadas a partir de las MASC de la presente invención para reconstrucción de vejiga o uterina, para neovascularización, para reparación de vasos dañados por, por ejemplo, aterosclerosis o aneurisma. Se pueden usar las células precursoras del músculo liso (células mesangiales) como un modelo *in vitro* para enfermedades glomerulares o para tratamiento celular o regeneración de tejido en neuropatía diabética. También se pueden usar los precursores del músculo liso para reparar mácula densa del túbulo contorneado distal o del tejido juxtaglomerular, lo que desempeñar un papel en la regulación de la presión arterial.

7. Cardiomiocitos: Los cardiomiocitos derivados de las MASC puede ser útiles para tratamiento celular o reparación de tejido para tratar tejido cardíaco dañado después de un infarto de miocardio, junto con la insuficiencia cardíaca congestiva, durante el reemplazo de la válvula, por anomalías cardíacas congénitas, o que resulta de cardiomiopatías o endocarditis. Se pueden administrar células localmente, especialmente por inyección, para el incremento de la eficacia. Se pueden usar células microgliales diferenciadas de MASC para tratar lesiones de la médula espinal y trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, y enfermedad de Alzheimer, así como para reparar los tejidos dañados durante una enfermedad infecciosa que afecta al sistema nervioso central. También se pueden usar células microgliales que se han alterado genéticamente para producir citocinas para trasplante para el tratamiento de enfermedades infecciosas en el sistema nervioso central donde el acceso es limitado debido a la barrera sangre-cerebro. También se pueden usar células gliales para producir factores de crecimiento o inhibidores de factores de crecimiento para regeneración de tejido nervioso después de apoplejía, como consecuencia de esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrópica, y cáncer cerebral, así como para regeneración después de lesión de la médula espinal.

8. Células estromales: Se pueden usar células estromales derivadas de las MASC de la presente invención como células de trasplante para el reemplazo de médula ósea post-quimioterapia, así como para trasplante de médula ósea. En el cáncer de mama, por ejemplo, se obtiene un aspirado de médula ósea de un paciente antes de un régimen de quimioterapia agresivo. Esta quimioterapia es perjudicial para tejidos, en particular para médula ósea. Se pueden expandir en cultivo MASC aisladas de la médula ósea del paciente para proporcionar suficientes células autólogas para la repoblación de las células de la médula ósea. Debido a que estas células puede diferenciarse a los múltiples tipos de tejidos, las células introducidas localmente o bien sistemáticamente proporcionan una ventaja añadida por migración a otros tejidos dañados, en los que los factores celulares en el entorno del tejido inducen que las células se diferencien y se multipliquen.

9. Células endoteliales: Las MASC se pueden diferenciar por los procedimientos descritas para producir células endoteliales, que se pueden usar en el tratamiento de la deficiencia del factor VIII, así como para producir angiogénesis para neovascularización. Las células endoteliales también pueden proporcionar un modelo *in vitro* para la supresión tumoral usando inhibidores angiogénicos, así como un modelo *in vitro* para vasculitis, hipersensibilidad y trastornos de coagulación. Con el uso de estas células endoteliales cultivadas y procedimientos de rastreo rápidos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden rastrear miles de compuesto terapéuticos potencialmente útiles de una forma más oportuna y rentable.

10. Células hematopoyéticas: Las MASC se pueden diferenciar en células hematopoyéticas. Por lo tanto, las células de la presente invención se pueden usar para repoblar la médula ósea después de dosis altas de quimioterapia. Antes de la quimioterapia, se obtiene un aspirado de médula ósea del paciente. Se aíslan las células madre por el procedimiento de la presente invención, y se crecen en cultivo y se inducen para que se diferencien. Después, se reintroduce una mezcla de células diferenciadas y no diferenciadas en el espacio de la

médula ósea del paciente. Se están desarrollando actualmente ensayos clínicos usando células madre hematopoyéticas con este fin. No obstante, las células madre de la presente invención proporcionan el beneficio adicional de una mayor diferenciación para formar células que pueden reemplazar aquellas dañadas por la quimioterapia en otros tejidos, así como en la médula ósea. Las células hematopoyéticas derivadas de las MASC se pueden diferenciar además para formar células sanguíneas que se van a almacenar en bancos de sangre, aliviando el problema de un suministro limitado de sangre para transfusiones.

11. Células neuroectodérmicas: Se pueden usar células microgliales diferenciadas de MASC para tratar lesiones de la médula espinal y trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, y enfermedad de Alzheimer, así como para reparar los tejidos dañados durante una enfermedad infecciosa que afecta al sistema nervioso central. También se pueden usar células microgliales que se han alterado genéticamente para producir citocinas para trasplante para el tratamiento de enfermedades infecciosas en el sistema nervioso central donde el acceso es limitado debido a la barrera sangre-cerebro. También se pueden usar células gliales para producir factores de crecimiento o inhibidores de factores de crecimiento para la regeneración de tejido nervioso después de apoplejía, como consecuencia de esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, y cáncer cerebral, así como para regeneración después de lesión de la médula espinal. Se pueden usar MASC inducidas para formar oligodendrocitos y astrocitos, por ejemplo, para trasplante en tejidos desmielinados, especialmente de la médula espinal, donde operan para mielinar los tejidos nerviosos adyacentes. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz en ratones, usando células madre embrionarias como fuente de precursores de oligodendrocitos y astrocitos (Brustle, O., y cols., Science (1999) 285: 754-756). Las MASC de la presente invención muestran el margen más amplio de características de diferenciación de células embrionarias, pero proporcionan la ventaja añadida de contribución de células autólogas para el trasplante.

Las células de la presente invención se pueden usar en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar trastornos neurodegenerativos congénitos o trastornos de almacenamiento tales como, por ejemplo, mucopolisacaridosis, leucodistrofias (leucodistrofia de células globoideas, enfermedad de Canavan), fucosidosis, gangliosidosis GM2, Niemann-Pick, síndrome de Sanfilippo, enfermedad de Wolman y Tay Sachs. También pueden usarse para trastornos traumáticos tales como apoplejía, hemorragia en el CNS, y traumatismo en el CNS; para trastornos del sistema nervioso periférico tales como lesión de la médula espinal o siringomielia; para trastornos de la retina tales como desprendimiento de retina, degeneración macular y otros trastornos degenerativos de la retina, y retinopatía diabética.

12. Células epiteliales ectodérmicas: Además, las células epiteliales de la presente invención también se pueden usar en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos cutáneos tales como alopecia, defectos cutáneos tales como heridas por quemaduras y albinismo.

13. Células epiteliales endodérmicas: Las células epiteliales derivadas de las MASC de la presente invención se pueden usar en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar los síntomas de diversas enfermedades de órganos. Se pudieron usar las células para tratar o aliviar trastornos hepáticos congénitos, por ejemplo, trastornos de almacenamiento tales como mucopolisacaridosis, leucodistrofias, gangliosidosis GM2; incremento de trastornos de bilirrubina, por ejemplo síndrome de Crigler-Najjar; trastornos de amoniaco tales como errores innatos del ciclo de la urea, por ejemplo deficiencia de ornitina descarboxilasa, citrulinemia, y argininosuccínico aciduria; errores innatos de aminoácidos y ácidos orgánicos tales como fenilcetonuria, tirosinemia hereditaria, y deficiencia de alfa1-antitripsina; y trastornos de coagulación, tales como deficiencia de factor VIII y IX. También se pueden usar las células para tratar trastornos hepáticos adquiridos debido a infecciones víricas. También se pueden usar las células de la presente invención en aplicaciones *ex vivo* tales como para generar un hígado artificial (parecido a diálisis renal), para producir factores de coagulación y para producir proteínas o enzimas generadas por el epitelio hepático. También se pueden usar estas células epiteliales de la presente invención en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos biliares tales como cirrosis biliar y atresia biliar.

También se pueden usar las células epiteliales de la presente invención en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos pancreáticos tales como atresia pancreática, inflamación de páncreas y deficiencia de alfa1-antitripsina. Además, ya que el epitelio del páncreas se puede formar a partir de células de la presente invención, y como se pueden formar células neuronales, se pueden generar células beta. Estas células se pueden usar para el tratamiento de la diabetes (implante subcutáneo o implante intrapancreático o intrahepático). Además, también se pueden usar las células epiteliales de la presente invención en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de epitelio del intestino tales como atresia intestinal, trastornos inflamatorios intestinales, infartos intestinales y resercción intestinal.

14. Modificación de MASC para asegurar la ausencia de senescencia bajo condiciones de cultivo inferiores a las óptimas:

Aunque las MASC tienen telómeros largos (12 kb) y la longitud del telómero no es distinta en células de donantes de distintas edades. Tras el cultivo *ex vivo* de las MASC, los telómeros no se acortan durante un periodo de

tiempo prolongado, es decir, durante 4 meses en cultivo ex vivo (o > de 35 divisiones celulares). Esto puede mantenerse durante más tiempo. La telomerasa está presente en las MASC provenientes de personas de todas las edades. Cuando las células MASC se cultivan en condiciones confluentes, aparece la senescencia y los telómeros comienzan a acortarse. Dado que una expansión extensiva en cultivos de densidad relativamente alta puede ser preferible para fines de producción, comerciales o de otro tipo, las MASC pueden ser transducidas/transfectadas con un constructo que contenga telomerasa, que evitará la senescencia de las células. Como estas células podrían usarse después para trasplante in vivo, sería preferible que se eliminara la telomerasa de la célula antes del trasplante. Esto puede lograrse modificando genéticamente el constructo de telomerasa de forma que se localice entre dos sitios LoxP. La recombinasa Cre podrá entonces escindir la telomerasa. La Cre puede ser transfectada/transducida en la célula diana usando un segundo vector/plásmido o como parte del constructo que contiene telomerasa. La Cre puede introducirse en una forma constitutivamente activa, o como una enzima inducible, por ejemplo, flanqueando la proteína con uno o más dominios de unión a ligandos mutados del receptor humano de estrógenos (ER) que pueden ser inducido por 4-hidroxitamoxifeno (OHT), pero no ligandos naturales del ER, o usando un sistema inducible por tetraciclina o rapamicina, u otros fármacos.

15. Estrategias de trasplante para evitar el rechazo inmunitario:

a.células donantes universales: Las MASC pueden manipularse para que sirvan como células donantes universales para terapia celular y génica para curar enfermedades genéticas u otras y para reemplazar enzimas. Aunque las MASC no diferenciadas no expresan antígenos HLA de clase I, HLA de clase II o beta-2-microglobulina, algunas progenies diferenciadas expresan al menos antígenos HLA de clase I. Las MASC puede modificarse para servir como células donantes universales eliminando los antígenos HLA de clase I y HLA de clase II, y potencialmente introduciendo antígenos los HLA del futuro receptor para evitar que las células se conviertan en dianas fáciles de la destrucción mediada por NK, o se hagan susceptibles de una replicación vírica ilimitada y/o una transformación maligna. La eliminación de los antígenos HLA puede lograrse por recombinación homóloga o mediante la introducción de mutaciones puntuales en la región del promotor, o mediante la introducción de una mutación puntual en el exón inicial del antígeno para introducir un codón de terminación, tal como con quimeroplastos. La transferencia de antígenos HLA del huésped puede lograrse mediante transducción retroviral, lentiviral, con virus adenoasociados u otra transducción vírica, o mediante transfección de las células diana con el ADNc de los antígenos HLA. Las MASC pueden usarse para establecer y fijar una cantidad o un intervalo o nivel dado de una proteína en el organismo o en la sangre.

b.Trasplante intrauterino para evitar el reconocimiento inmunitario: Las MASC pueden usarse en el marco de un trasplante intrauterino para corregir anomalías genéticas, o para introducir células que será toleradas por el huésped antes del desarrollo del sistema inmunitario. Esta puede ser una manera de fabricar células humanas en grandes cantidades, tales como la sangre, en animales, o podría usarse como forma de corregir defectos genéticos en embriones humanos trasplantando células que producen la proteína o la enzima correcta.

16. Tratamiento génico: Hasta ahora, las células humanas usadas para tratamiento génico se han limitado esencialmente a células de la médula ósea y epiteliales, porque no se podía extraer otros tipos de células del organismo, crecerlas en cultivos, alterarlas genéticamente y después reimplantarlas con éxito en el paciente del que se había tomado el tejido. (Anderson, W.F., Nature (1998) 392: 30; Anderson, W.F., Scientific American (1995) 273: 1-5; Anderson, W.F. Science (1992) 256: 808-813) Las MASC de la presente invención pueden extraerse y aislarse del organismo, crecerse en cultivo en estado no diferenciado o inducir su diferenciación en el cultivo, y alterarse genéticamente usando diversidad de técnicas, especialmente transducción vírica. La incorporación y expresión de material genético es demostrable, y la expresión de ADN exógeno es estable a lo largo del desarrollo. Los retrovíricos y otros vectores para insertar ADN exógeno en células madre son conocidos por los expertos en la técnica (Mochizuki, H., y cols., J. Virol (1998) 72(11): 8873-8883; Robbins, P., y cols., J. Virol. (1997) 71(12): 9466-9474; Bierhuizen, M., y cols., Blood (1997) 90(9): 3304-3315; Douglas, J., y cols., Hum. Gene Ther. (1999) 10(6): 935-945; Zhang, G., y cols., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1996) 227(3): 707-711). Una vez transducida usando un vector retroviral, persiste la expresión de la proteína verde fluorescente potenciada (eGFP) en células musculares, del endotelio y células positivas para c-Kit totalmente diferenciadas derivadas de las MASC aisladas, demostrando que la expresión de vectores retrovíricos introducidos en MASC persiste a lo largo de la diferenciación. La diferenciación total se indujo a partir de cultivos iniciados con 10 células eGFP⁺ previamente transducidas mediante un vector retroviral y escogidas en las primeras semanas del periodo inicial de cultivo de las MASC.

Las células madre hematopoyéticas, a pesar de tener un potencial de diferenciación limitado, han demostrado utilidad para tratamiento génico (véase Kohn, D. B., Curr. Opin. Pediatr. (1995) 7: 56-63). Las células de la presente invención proporcionan un intervalo más amplio de tipos de células diferenciadas que pueden mantener ADN transducido o transfectado cuando se diferencian totalmente, como demuestra el hecho de que las células musculares, del endotelio y células positivas para c-Kit totalmente diferenciadas mantuvieran la expresión de la proteína verde fluorescente potenciada a pesar de que el vector retroviral había sido introducido en la célula madre no diferenciada.

Asimismo, las MASC de la presente invención proporcionan otras ventajas sobre las células madre hematopoyéticas para tratamiento génico. Las células madre de la presente invención son relativamente fáciles de aislar de los aspirados de médula ósea obtenidos bajo anestesia local, fáciles de expandir en cultivo, y fáciles de transfectar con genes exógenos. Cantidades adecuadas de células madre hematopoyéticas para el mismo fin deben aislarse a partir de al menos un litro de médula y las células son difíciles de expandir en cultivo (véase Prockop, D. J., *Science* (1997) 276: 71-74).

Los genes candidatos para tratamiento génico incluyen, por ejemplo, genes que codifican la apolipoproteína E (que se ha relacionado con riesgo de enfermedad de Alzheimer y enfermedad cardiovascular), MTHFR (algunas de cuyas variantes se han asociado con niveles elevados de homocisteína y riesgo de apoplejía), factor V (que se ha relacionado con riesgo de trombosis), ACE (algunas de cuyas variantes se han relacionado con riesgo de cardiopatía), CKR-5 (que se ha asociado con resistencia al VIH), HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, cuya ausencia tiene como consecuencia la enfermedad de Lesch-Nyhan) PNP (fosforilasa de nucleósidos de purina, cuya ausencia tiene como consecuencia la enfermedad de inmunodeficiencia grave), ADA (adenosina desaminasa, cuya ausencia tiene como consecuencia la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave), p21 (que se ha propuesto como gen candidato para el tratamiento de la ataxia telangiectasia), p47 (cuya ausencia se relaciona con la falta de actividad oxidasa en neutrófilos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, números de acceso de GenBank M55067 y M38755), Rb (el gen de susceptibilidad del retinoblastoma asociado con la formación de tumores, número de acceso de GenBank M15400), KVLQT1 (una proteína canal de potasio, con formas aberrantes asociadas con arritmias cardíacas, número de acceso de GenBank U40990), el gen de la distrofina (asociado con la distrofia muscular de Duchenne, números de acceso en GenBank M18533, M17154 y Mol 8026), CFTR (el regulador de la conductancia transmembrana asociado con la fibrosis quística, número de acceso de GenBank M28668), fosfatidilinositol-3-cinasa (asociadas con ataxia-telangiectasia, número de acceso de GenBank U16455) y VHL (la pérdida o mutación de la proteína se asocia con la enfermedad de Von-Hippel Lindau): Latif, F., y cols., *Science* (1993) 260: 1317-1320). Otras enfermedades que puede tratarse eficazmente usando estas células alteradas genéticamente incluyen, la deficiencia de Factor IX, la deficiencia de adenosina desaminasa (asociada con la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave, o SCIDS), y la diabetes, y deficiencias en glucocerebrosidasa, α -iduronidasa.

Estos genes novedosos pueden dirigirse mediante un promotor inducible de forma que se puedan regular los niveles de enzimas. Estos sistemas de promotor inducible pueden incluir un dominio de unión a ligando mutado del receptor de estrógenos humano (ER) unido a la proteínas que se va a producir. Esto requeriría que el individuo ingiriera tamoxifeno para permitir la expresión de la proteína. Otras alternativas son sistemas activados o inactivados por tetraciclina, RU486, y sistemas inducibles por rapamicina. Un procedimiento adicional para obtener una expresión relativamente selectiva es usar promotores específicos de tejido. Por ejemplo en el cerebro, puede introducirse un transgén dirigido por el promotor de la enolasa específica de neurona (Ad-NSE) o el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que permitirá la expresión casi exclusiva en tejido cerebral. Análogamente, la expresión sólo endotelial puede obtenerse usando el promotor Tec o el promotor de la VE-cadherina.

Las MASC genéticamente alteradas pueden introducirse localmente o infundirse sistémicamente. Las células madre humanas con potencial de diferenciación más limitado, cuando se transfectan con un gen para el factor IX, secretan la proteína durante al menos 8 semanas después de la infusión sistémica en ratones SCID. (Keating, A., y cols., *Blood* (1996) 88: 3921.) Las MASC de la presente invención, al tener un potencial de diferenciación más amplio que cualquier célula madre no embrionaria descrita hasta el momento, proporcionan una ventaja añadida para la administración sistémica o local, porque pueden migrar a diversidad de tejidos, donde las citocinas, factores de crecimiento y otros factores inducen la diferenciación de la célula. La célula diferenciada, que es parte ahora del tejido circundante, mantiene su capacidad de producir la proteína producto del gen introducido.

En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, los ensayos clínicos han mostrado que las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo obtenidas a partir de cadáveres de embriones humanos pueden sobrevivir y funcionar en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson. Los escáneres PET han indicado que la incorporación de [¹⁸F]fluorodopamina en el área alrededor del injerto celular está aumentada después del trasplante, y permanece así durante al menos seis años en algunos pacientes. (Véase Dunnett, S. y A. Bjorklund, *Nature* (1999) 399 (Suppl.) A32-A-39; Lindvall, O., *Nature Biotech.* (1999) 17: 635-636; Wagner, J., y cols., *Nature Biotech.* (1999) 17: 653-659.) A diferencia de las células embrionarias, las MASC aisladas como se describe en la presente invención proporcionan un suministro fácil de células para trasplante, además de mantener el potencial de diferenciación que convierte la terapia de trasplante de células embrionarias en una alternativa atractiva para el tratamiento de enfermedades.

Para el tratamiento del SIDA, las MASC de la presente invención pueden modificarse genéticamente para producir Rev M10, un mutante transdominante negativo de Rev que bloquea la función de una Rev de tipo salvaje producida en células infectadas con VIH. (Bevec, D. y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1992) 89: 9870-9874; Ranga, U., y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1998) 95(3): 1201-1206.) Una vez inducida la diferenciación a células de linaje hematopoyético e introducidas en el paciente, las MASC repueblan el suministro de células T reducido del paciente infectado con VIH. Dado que las células genéticamente alteradas poseen el mutante Rev M10, serán resistentes a los efectos letales de la infección por la mayoría de las cepas de VIH.

Las MASC genéticamente alteradas también pueden encapsularse en un vehículo inerte para permitir que las

células se protejan del sistema inmunitario del huésped mientras producen la proteína secretada. Las técnicas de microencapsulación de células son conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Chang, P., y cols., Trends in Biotech. (1999) 17(2): 78-83). Los materiales para la microencapsulación de células incluyen, por ejemplo, cápsulas de polímeros, microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato, cápsulas de poli-L-lisina alginato con bario, cápsulas de alginato con bario, fibras huecas de poliacrilonitrilo/polivinilcloruro (PAN/PVC), y fibras huecas de poliétersulfona (PES). La patente de EE. UU. N.º 5.639.275 (Baetge, E., y cols.), por ejemplo, describe dispositivos y procedimientos mejorados para la expresión estable a largo plazo de una molécula biológicamente activa usando una cápsula biocompatible que contenga células genéticamente modificadas. Tales cápsulas inmunoisolantes biocompatibles, en combinación con las MASC de la presente invención, proporcionan un procedimiento para tratar diversos trastornos fisiológicos, incluidos, por ejemplo, la diabetes y la enfermedad de Parkinson.

En el paciente diabético, por ejemplo, las células madre heterólogas que han sido alteradas genéticamente para producir insulina a niveles fisiológicamente terapéuticos pueden encapsularse para que se liberen en los tejidos del paciente. Alternativamente, las células madre autólogas pueden obtenerse a partir del aspirado de la médula ósea del paciente para la transducción con un vector retroviral como se describió anteriormente. Una vez alteradas genéticamente para producir niveles fisiológicamente terapéuticos de insulina, estas células pueden encapsularse como lo describen Chang o Baetge e introducirse en los tejidos del paciente, donde siguen produciendo insulina durante periodos de tiempo prolongados.

Otra ventaja de la microencapsulación de células de la presente invención es la oportunidad de incorporar en la microcápsula diversas células, produciendo cada una una molécula biológicamente terapéutica. Puede inducirse la diferenciación de las MASC de la presente invención a múltiples linajes diversos, cada uno de los cuales puede alterarse genéticamente para producir niveles terapéuticamente efectivos de moléculas biológicamente activas. Las MASC que portan los diferentes elementos genéticos pueden encapsularse juntas para producir varias moléculas biológicamente activas.

Las MASC de la presente invención pueden alterarse genéticamente *ex vivo*, eliminando una de las barreras más significativas para el tratamiento génico. Por ejemplo, se obtiene el aspirado de la médula ósea de un sujeto, y se aíslan las MASC a partir del aspirado. Las MASC se alteran entonces genéticamente para que expresen uno o más productos génicos deseados. Las MASC pueden evaluarse o seleccionarse entonces *ex vivo* para identificar aquellas células que se han alterado con éxito, y estas células pueden reintroducirse en el sujeto, localmente o sistémicamente. Alternativamente, las MASC pueden alterarse genéticamente y cultivarse para inducir la diferenciación para que formen un linaje celular específico para trasplante. En cualquier caso, las MASC trasplantadas proporcionan una fuente transfectada de forma estable que puede expresar un producto génico deseado. Especialmente cuando el propio aspirado de la médula ósea del paciente es la fuente de las MASC, este procedimiento proporciona un procedimiento inmunológicamente seguro para producir células para trasplante. El procedimiento puede usarse para el tratamiento de diabetes, miopatía cardíaca, enfermedad neurodegenerativa y deficiencia de adenosina desaminasa, por citar algunas de una multitud de ejemplos. En la diabetes, por ejemplo, las MASC pueden aislarse, alterarse genéticamente para que produzcan insulina, y después trasplantarse en el paciente que padece la enfermedad. Cuando la enfermedad está asociada con autoinmunidad, las MASC pueden alterarse genéticamente para que expresen un MHC alterado o que no expresen MHC con el fin de evitar la vigilancia inmunitaria. La supresión de la expresión del MHC en células de islotes pancreáticos trasplantadas se ha realizado con éxito usando un vector adenoviral que expresa la región E3 del genoma viral. Las células de la presente invención pueden transfectarse o inducirse de forma estable, como han demostrado los inventores, y pueden, por lo tanto, proporcionar una fuente más permanente de insulina para trasplante en un paciente diabético.

Las MASC donantes, particularmente si están genéticamente alteradas para alterar la expresión del MHC, y las MASC autólogas, si están genéticamente alteradas para que expresen los productos génicos de la hemoglobina deseados, pueden ser especialmente efectivas en terapia celular para el tratamiento de la anemia de células falciformes y la talasemia.

Procedimientos para alterar genéticamente las MASC

Las células aisladas mediante el procedimiento descrito en el presente documento pueden modificarse genéticamente introduciendo ADN o ARN en las células mediante diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos se agrupan generalmente en cuatro categorías principales: (1) transferencia viral, incluyendo el uso de vectores víricos de ADN o ARN, tales como retrovirus (incluyendo lentivirus), virus del simio 40 (SV40), adenovirus, virus Sindbis, y virus del papiloma bovino, por ejemplo; (2) transferencia química, incluyendo procedimientos de transfección con fosfato de calcio y transfección con DEAE dextrano; (3) transferencia de fusión de membrana, usando vesículas membranosas cargadas con ADN tales como liposomas, glóbulos rojos fantasmas, y protoplastos, por ejemplo; y (4) técnicas de transferencia física, tales como microinyección, electroporación, o transferencia directa de ADN "desnudo". Las MASC pueden alterarse genéticamente mediante inserción de ADN aislado preseleccionado, por sustitución de un segmento del genoma celular con ADN aislado preseleccionado, o por delección de o inactivación de al menos una parte del genoma celular de la célula. La delección o inactivación de al menos una parte del genoma celular puede lograrse por diversidad de medios, incluidos, pero sin limitarse a ellos, recombinación genética, tecnología antisentido (que puede incluir el uso de ácidos nucleicos peptídicos, o PNA), o por tecnología de ribozimas, por ejemplo. La inserción de una o más

secuencias de ADN preseleccionadas puede lograrse por recombinación homóloga o por integración vírica en el genoma de la célula huésped. La secuencia del gen deseado también puede incorporarse en la células, concretamente en su núcleo, usando un vector de expresión plasmídico y una secuencia de localización nuclear. Los procedimientos para dirigir polinucleótidos al núcleo se han descrito en la técnica. El material genético puede introducirse usando promotores que permitirán la inducción positiva o negativa del gen de interés usando determinados compuestos químicos/fármacos, que se eliminan después de la administración de un determinado fármaco/compuesto químico, o pueden marcarse para permitir la inducción por compuestos químicos (incluyendo el receptor de estrógeno mutado que responde a tamoxifeno, pero sin limitarse a él) de la expresión en compartimentos celulares específicos (incluida la membrana celular, pero sin limitarse a ella).

10 **Recombinación homóloga**

La transfección con fosfato de calcio, que se basa en precipitados de ADN plasmídico/iones de calcio, puede usarse para introducir ADN plasmídico que contenga un gen o un polinucleótido diana en MASC aisladas o cultivadas. En resumen, el ADN plasmídico se mezcla en una disolución de cloruro de calcio, que se añade después a una disolución que se ha tamponado con fosfato. Una vez que se ha formado el precipitado, la disolución se añade directamente a células cultivadas. El tratamiento con DMSO o glicerol puede usarse para mejorar la eficiencia de la transfección, y los niveles de transfectantes estables pueden mejorarse usando etanosulfonato de bis-hidroxiethylamino (BES). Los sistemas de transfección con fosfato de calcio están comercialmente disponibles (por ejemplo, ProFection® de Promega Corp., Madison, WI).

La transfección con DEAE-dextrano, que también se conoce por los expertos en la técnica, puede preferirse por encima de la transfección con fosfato de calcio cuando se desee la transfección transitoria, ya que frecuentemente es más eficiente.

Dado que las células de la presente invención son células aisladas, la microinyección puede ser particularmente efectiva para transferir material genético en las células. En resumen, se colocan las células en la platina de un microscopio óptico. Con la ayuda del aumento proporcionado por el microscopio, se guía una micropipeta de vidrio hacia el interior del núcleo para inyectar ADN o ARN. Este procedimiento es ventajoso porque permite el suministro del material genético deseado directamente al núcleo, evitando la degradación tanto citoplásmica como lisosómica del polinucleótido inyectado. Este técnica se ha empleado de forma eficaz para lograr una modificación de la línea germinal en animales transgénicos.

Las células de la presente invención también pueden modificarse genéticamente usando electroporación. El ADN o ARN diana se añade a una suspensión de células cultivadas. La suspensión de ADN/ARN-células se coloca entre dos electrodos y se somete a un pulso eléctrico, provocando una permeabilidad transitoria en la membrana celular externa que se manifiesta con la aparición de poros a través de la membrana. El polinucleótido diana entra en la célula a través de los poros abiertos de la membrana, y cuando el campo eléctrico se hace discontinuo, los poros se cierran en aproximadamente de uno a 30 minutos.

El suministro liposomal del ADN o ARN para modificar genéticamente las células puede realizarse usando liposomas catiónicos, que forman un complejo estable con el polinucleótido. Para la estabilización del complejo de liposoma, pueden añadirse dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC). Un reactivo recomendado para transferencia liposomal es Lipofectin® (Life Technologies, Inc.), que está comercialmente disponible. El Lipofectin®, por ejemplo, es una mezcla de los lípidos catiónicos N-[1-(2,3-dioleiloil)propil]-N,N-N-trimetilcloruro de amonio y DOPE. El suministro de ADN lineal, ADN plasmídico o ARN puede lograrse tanto *in vitro* como *in vivo* usando la administración liposomal, que puede ser un procedimiento preferido debido al hecho de que los liposomas pueden transportar porciones grandes de ADN, generalmente pueden proteger el polinucleótido de la degradación y pueden dirigirse hacia células o tejidos específicos. Numerosos sistemas de suministro diferentes que basados en tecnología de liposomas están también comercialmente disponibles, incluidos Effectene™ (Qiagen), DOTAP (Roche Molecular Biochemicals), FuGene 6™ (Roche Molecular Biochemicals), y Transfectam® (Promega). La eficiencia de la transferencia génica mediada por lípidos catiónicos puede potenciarse incorporando componentes purificados de envoltura vírica o celular, tales como la glicoproteína G purificada de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), del procedimiento de Abe, A., y cols. (J. Virol. (1998) 72: 6159-6163).

Las técnicas de transferencia génica que se han mostrado efectivas para el suministro de ADN en líneas celulares de mamíferos primarias y establecidas usando ADN recubierto con lipopoliamina pueden emplearse para introducir AND diana en MASC. Esta técnica se describe de forma general por Loeffler, J. y Behr, J., Methods in Enzymology (1993) 217: 599-618.

El ADN plasmídico desnudo puede inyectarse directamente en una masa de tejido formada de células diferenciadas a partir de las MASC aisladas. Esta técnica se ha mostrado efectiva para transferir ADN plasmídico a tejido musculoesquelético, donde la expresión en músculo esquelético de ratón se ha observado durante más de 19 meses después de una sola inyección intramuscular. Las células que se dividen más rápido incorporan el ADN plasmídico desnudo de forma más eficiente. Por tanto, es ventajoso estimular la división celular antes del tratamiento con ADN plasmídico.

También puede usarse la transferencia génica por microproyectiles para transferir genes en las MASC, tanto *in vitro* como *in vivo*. El procedimiento básico para la transferencia génica por microproyectiles fue descrita por J. Wolff en *Gene Therapeutics* (1994) en la página 195. En resumen, el ADN plasmídico que codifica un gen diana está recubriendo microesferas, normalmente partículas de oro o volframio con un tamaño de 1-3 micras. Las partículas recubiertas se colocan sobre una lámina transportadora por encima de una cámara de descarga. Una vez aplicada la descarga, la lámina transportadora se acelera hacia una pantalla de contención. La pantalla de contención forma una barrera que detiene el movimiento adicional de la lámina transportadora, al mismo tiempo que permite la propulsión de las partículas recubiertas de polinucleótidos, normalmente mediante una corriente de helio, hacia una superficie diana, tal como una masa de tejido formada de MASC diferenciadas. Las técnicas de inyección de micropartículas se han descrito anteriormente, y los procedimientos son conocidos por los expertos en la técnica (véase Johnston, S.A., y cols., *Genet. Eng. (NY)* (1993) 15: 225-236; Williams, R.S., y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1991) 88: 2726-2730; Yang, N.S., y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1990) 87: 9568-9572).

Pueden unirse péptidos señale al ADN plasmídico, como describen Sebestyen, y cols. (*Nature Biotech.* (1998) 16: 80-85), para dirigir el AND hacia el núcleo para una expresión más eficiente.

Los vectores víricos se usan para alterar genéticamente las MASC de la presente invención y su progenie. Los vectores víricos se usan, como lo son los procedimientos físicos anteriormente descritos, para suministrar uno o más genes, polinucleótidos, moléculas antisentido o secuencias de ribozima diana, por ejemplo, a las células. Los vectores víricos y procedimiento para usarlos para suministrar ADN a las células son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplo de vectores víricos que pueden usarse para alterar genéticamente las células de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores retrovíricos (incluidos vectores lentivíricos), vectores alfavíricos (por ejemplo, vectores Sindbis), y vectores de virus del herpes.

Los vectores retrovíricos son efectivos para transducir células que se dividen rápidamente, aunque también se han desarrollado diversidad de vectores retrovíricos para transferir ADN de forma efectiva en células que no se dividen (Mochizuki, H., y cols., *J. Virol.* (1998) 72: 8873-8883). Las líneas celulares de empaquetamiento para vectores retrovíricos son conocidas por los expertos en la técnica. Las líneas celulares de empaquetamiento proporcionan las proteínas víricas requeridas para la producción de la cápsida y la maduración de los viriones del vector vírico. Generalmente, éstas incluyen los genes retrovíricos gag, pol, y env. Se escoge una línea celular de empaquetamiento adecuada de entre las líneas celulares conocidas para producir un vectores retrovírico que se ecotrópico, xenotrópico o anfotrópico, proporcionando un grado de especificidad para los sistemas de vectores retrovíricos.

Generalmente, se usa un vector de ADN retrovírico con la línea celular de empaquetamiento para producir la combinación de secuencia/vector diana deseada dentro de las células. En resumen, un vector de ADN retrovírico es un ADN plasmídico que contiene dos LTR retrovíricas situadas en torno a un sitio de multiclonación y un promotor de SV40, de forma que una primera LTR se localiza en 5 respecto del promotor de SV40, que está unido de forma operable a una secuencia génica diana clonada en el sitio de multiclonación, seguido de una segunda LTR en 3. Una vez formado, el vector de ADN retrovírico puede transferirse en la línea celular de empaquetamiento usando transfección con fosfato de calcio, como se ha descrito anteriormente. Después de aproximadamente 48 horas de producción de virus, el vector vírico, que contiene ahora la secuencia génica diana, se recoge.

El direccionamiento de vectores retrovíricos hacia tipos celulares específicos fue demostrado por Martin, F., y cols., (*J. Virol* (1999) 73: 6923-6929), quien usó fragmentos variables de anticuerpo de cadena sencilla dirigidos contra la glicoproteína de superficie antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma unido a la envoltura del virus de la leucemia murina para dirigir el vector para suministrar el gen diana a las células de melanoma. Cuando se desee un suministro dirigido, como, por ejemplo, cuando las células diferenciadas sean los objetivos deseados para la alteración genética, pueden usarse los vectores retrovíricos unidos a fragmentos de anticuerpos dirigidos a los marcadores específicos expresados por cada linaje celular diferenciado a partir de las MSC de la presente invención para el suministro a esas células.

También se usan los vectores lentivíricos para alterar genéticamente células de la invención. Muchos de tales vectores se han descrito en la bibliografía y son conocidos por los expertos en la técnica. Salmons, B. y Gunzburg, W.H., "Targeting of Retroviral Vectors for Gene Therapy," *Hum. Gene Therapy* (1993) 4: 129-141. Estos vectores han sido efectivos para alterar genéticamente células madre hematopoyéticas humanas (Sutton, R., y cols., *J. Virol.* (1998) 72: 5781-5788). Se han descrito líneas celulares de empaquetamiento para vectores lentivíricos (véase Kafri, T., y cols., *J. Virol.* (1999) 73: 576-584; Dull, T., y cols., *J. Virol.* (1998) 72: 8463-8471).

Se han usado con éxito virus del herpes recombinantes, tales como el virus herpes simplex de tipo I (HSV-1) para dirigir el suministro de ADN a células que expresan el receptor de eritropoyetina (Laquerre, S., y cols., *J. Virol.* (1998) 72: 9683-9697). Estos vectores también pueden emplearse para alterar genéticamente las células de la presente invención, las cuales los inventores han demostrado que se transducen de forma estable mediante vectores víricos.

Los vectores adenovíricos tienen una eficiencia de transducción elevada, pueden incorporar insertos de ADN de hasta 8 Kb y pueden infectar tanto células que se están dividiendo como diferenciadas. Se han descrito diversidad

de vectores adenoviricos en la bibliografía y son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Davidson, B.L., y cols., *Nature Genetics* (1993) 3: 219-223; Wagner, E., y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1992)89: 6099-6103). Los procedimientos para insertar ADN diana en un vector adenovirico son conocidos por lo expertos en la técnica del tratamiento génico, ya que son procedimiento para usar vectores adenoviricos recombinantes para introducir ADN diana en tipos celulares específicos (véase Wold, W., *Adenovirus Methods and Protocols, Humana Methods in Molecular Medicine* (1998), Blackwell Science, Ltd.). La afinidad de unión por ciertos tipos celulares se ha demostrado por modificación de la secuencia de la fibra del vector vírico. Se han descrito sistemas de vectores adenoviricos que permiten la expresión proteica regulada en transferencia génica (Molin, M., y cols., *J. Virol.* (1998) 72: 8358-8361). También se ha descrito un sistema para propagar vectores adenoviricos con especificidades de receptor modificadas genéticamente para proporcionar un direccionamiento transduccional hacia tipos celulares específicos (Douglas, J. y cols., *Nature Biotech.* (1999) 17: 470-475). Vectores adenoviricos ovinos recientemente descritos incluso dirigen el potencial de interferencia con la transferencia génica exitosa mediante inmunidad humoral preexistente (Hofmann, C., y cols., *J. Virol.* (1999) 73: 6930-6936).

También están disponibles vectores adenoviricos que proporcionan transferencia génica dirigida y expresión génica estable usando vectores conjugados moleculares, construidos condensando ADN plasmídico que contiene el gen diana con polilisina, con la polilisina unida a un adenovirus incapaz de duplicarse. (Schwarzenberger, P., y cols., *J. Virol.* (1997) 71: 8563-8571.)

Los vectores alfaviricos, concretamente los vectores de virus Sindbis, también están disponibles para transducir las células de la presente invención. Estos vectores están comercialmente disponibles (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se han descrito, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5.843.723, así como por Xiong, C. y cols., *Science* (1989) 243: 1188-1191; Bredenbeek, P.J., y cols., *J. Virol.* (1993) 67: 6439-6446; y Frolov, I., y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1996) 93: 11371-11377.

Los inventores han mostrado que las MASC poseen un buen potencial de transducción usando el vector lentivirico eGFP-MND descrito por Robbins, y cols. (*J. Virol.* (1997) 71(12): 9466-9474) y el vector eGFP-MGF. usando este procedimiento, pueden transducirse el 30-50 % de las MASC después de una exposición corta de 4,6 horas a un vector de proteína verde fluorescente potenciada (eGFP) que contenga sobrenadantes producidos en células de empaquetamiento PA3-17 (una línea celular de empaquetamiento anfitrión derivada de fibroblastos NIH 3T3 y descrita por Miller, A.D., y Buttimore en *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6: 2895-2902), combinada con protamina (8 mg/ml). Las expresión de eGFP se mantiene a lo largo del cultivo de MASC no diferenciadas. Además, la transfección usando lipofectamina se ha empleado con éxito para introducir transgenes en MAPC.

La transfección o transducción exitosa de células diana puede demostrarse usando marcadores genéticos, en una técnica conocida por los expertos en la técnica. La proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*, por ejemplo, se ha mostrado como marcador efectivo para identificar y seguir el rastro genético de células hematopoyéticas genéticamente modificadas (Persons, D., y cols., *Nature Medicine* (1998) 4: 1201-1205). Los marcadores alternativos que pueden seleccionarse incluyen el gen β -Gal, el receptor truncado del factor de crecimiento nervioso, marcadores que pueden seleccionarse por fármacos (incluidos, pero sin limitarse a ellos, NEO, MTX, higromicina).

17. Las MASC son útiles para la reparación tisular: Las células madre de la presente invención también pueden usarse para la reparación tisular. Los inventores han demostrado que las MASC de la presente invención se diferencian para formar diversidad de tipos celulares, incluidos fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, músculo esquelético, endotelio, células estromales, músculo liso, músculo cardíaco y células hematopoyéticas. Por ejemplo, las MASC inducidas para diferenciarse a osteoblastos, por el procedimiento descrito anteriormente en el presente documento, pueden implantarse en hueso para potenciar el proceso de reparación, para reforzar hueso debilitado, o para renovar la superficie de articulaciones. Las MASC inducidas para diferenciarse a condrocitos, por el procedimiento descrito anteriormente, pueden inyectarse en articulaciones para renovar la superficie de cartílago de la articulación. Caplan, y cols. (patente de EE. UU. 5.855.619) describen un implante de matriz biológica que incluye una matriz de gel contraída en la que se han incorporado células madre mesenquimales. El implante está diseñado para la reparación de un defecto tisular, especialmente para daños en tendón, ligamento, menisco o músculo. El cartílago, por ejemplo, puede formarse por la adición de condrocitos en el área inmediatamente circundante a un armazón tridimensional poroso hecho, por ejemplo, de colágeno, fibras ácidas poliglicólicas sintéticas, o fibras polilácticas sintéticas. Los inventores han demostrado que las MASC de la presente invención se diferencia para formas condrocitos, por ejemplo, que pueden depositarse en y alrededor de un material de armazón de colágeno, poliglicólico sintético o poliláctico sintético u otro para proporcionar un implante para facilitar la reparación tisular.

También se usan matrices para suministrar células de la presente invención a sitios anatómicos específicos, donde factores de crecimiento concretos incorporados en la matriz, o codificados en plásmidos incorporados en la matriz para que los incorporen las células, pueden usarse para dirigir el crecimiento de la población celular inicial. El ADN puede incorporarse en los poros de la matriz, por ejemplo, durante el proceso de espumado usado en la formación de determinadas matrices poliméricas. A medida que el polímero usado en el proceso de espumado se expande, atrapa al ADN dentro de los poros, permitiendo la liberación controlada y mantenida del ADN plasmídico. Un procedimiento de este tipo de preparación de una matriz lo describen Shea, y cols., en *Nature Biotechnology* (1999) 17: 551-554.

El ADN plasmídico que codifica citocinas, factores de crecimiento u hormonas puede atraparse dentro de un transportador de matriz polimérico activado por genes, como lo describen Bonadio, J., y cols., *Nature Medicine* (1999) 5: 753-759. El polímero biodegradable se implanta después cerca de un hueso roto, por ejemplo, donde se implantan las MASC e incorporan el ADN, que hace que las MASC produzcan una elevada concentración local de la citocina, el factor de crecimiento o la hormona, acelerando la curación del tejido dañado.

Las células proporcionadas por la presente invención, o las MASC aisladas por el procedimiento descrito en la presente solicitud, pueden usarse para producir tejidos u órganos para trasplantes. Oberpenning, y cols. (*Nature Biotechnology* (1999) 17: 149-155) informaron sobre la formación de una vejiga funcional mediante el cultivo de células musculares del exterior de una vejiga canina y células de la túnica interna del interior de una vejiga canina, la preparación de tejido a partir de estos cultivos, y el recubrimiento de una pequeña esfera polimérica con células musculares en el exterior y células de la túnica interna en el interior. La esfera se insertó después en el aparato urinario de un perro, donde comenzó a funcionar como una vejiga. Nicklason, y cols., *Science* (1999) 284: 489-493, informaron sobre la producción de extensiones de material de injerto vascular a partir de cultivos de músculo liso y células endoteliales. Otros procedimientos para formar capas de tejido a partir de células cultivadas son conocidos por expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Vacanti, y cols., patente de EE. UU. N.º 5.855.610). Estos procedimientos pueden ser especialmente efectivos cuando se usan en combinación con células de la presente invención, que tienen un margen de diferenciación más amplio que cualquiera de las células madre no embrionarias anteriormente descritas.

Las MASC de la presente invención pueden usarse para repoblar células de músculo cardíaco por inyección directa en el área de daño tisular o mediante inyección sistémica, permitiendo que las células se dirijan hacia los tejidos cardíacos. Este procedimiento puede ser particularmente efectivo si se combina con angiogénesis. Tanto los procedimientos de inyección como los procedimientos para promover la angiogénesis son conocidos por los expertos en la técnica. Las MASC de la presente invención proporcionan un margen de diferenciación más amplio para proporcionar una fuente de células más variada para la reparación de tejido cardíaco o de otro tipo usando estas técnicas.

Las MASC de la presente invención también son útiles, por ejemplo, para el fin de repoblar la médula ósea tras una quimioterapia con dosis elevadas. Antes de la quimioterapia, se obtiene un aspirado de médula ósea del paciente. Se aíslan las células madre por el procedimiento de la presente invención, y se crecen en cultivo y se inducen para que se diferencien. Se reintroduce entonces una mezcla de células diferenciadas y no diferenciadas en el espacio de la médula ósea del paciente. Se están desarrollando actualmente ensayos clínicos usando células madre hematopoyéticas con este fin. No obstante, las MASC de la presente invención proporcionan el beneficio adicional de una mayor diferenciación para formar células que pueden reemplazar aquellas dañadas por la quimioterapia en otros tejidos, así como en la médula ósea.

Alternativamente, el procedimiento descrito por Lawman, y cols. (documento WO 98/42838) puede usarse para cambiar el antígeno de histocompatibilidad de células madre de un donante o donantes alogénicos. Usando este procedimiento, pueden generarse grupos de trasplantes de médula ósea disponibles para la preparación de disoluciones congeladas, almacenamiento y administración a pacientes que no son capaces, como en pacientes con leucemia, por ejemplo, de proporcionar su propia médula ósea para la reconstitución.

La repoblación de las células del sistema inmunitario de un paciente puede lograrse, por ejemplo, aislando células madre autólogas del paciente, cultivando esas células para expandir la población y reintroduciendo después las células en el paciente. Este procedimiento puede ser particularmente efectivo cuando las células del sistema inmunitario o de la médula ósea se hayan eliminado por radiación y/o quimioterapia con fines terapéuticos, tal como en el caso, por ejemplo, de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad autoinmunitaria o cánceres con tumores sólidos.

Para el tratamiento de leucemias, enfermedad autoinmunitaria o enfermedades genéticas tales como anemia de células falciformes o talasemia, puede realizarse la repoblación de las células sanguíneas o del sistema inmunitario del paciente con células alogénicas de la presente invención, o aisladas por el procedimiento de la presente invención, particularmente cuando el antígeno de histocompatibilidad se ha alterado de la forma descrita por Lawman, y cols. (WO 98/42838).

Para los fines descritos en el presente documento, pueden administrarse tanto las MASC autólogas como alogénicas de la presente invención a un paciente, tanto en forma diferenciada como no diferenciada, genéticamente alteradas o no alteradas, mediante inyección directa en un sitio tisular, sistémicamente o en torno a la superficie de una matriz aceptable, o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Las MASC proporcionan un sistema modelo para estudiar las vías de diferenciación: Las células de la presente invención también son útiles para la investigación adicional en procesos de desarrollo. Ruley, y cols. (documento WO 98/40468), por ejemplo, han descrito vectores y procedimientos para inhibir la expresión de genes específicos, así como la obtención de secuencias de ADN de dichos genes inhibidos. Las células de la presente invención pueden tratarse con los vectores tales como los descritos por Ruley, que inhiben la expresión de genes que pueden identificarse por análisis de secuencias de ADN. Puede inducirse entonces la diferenciación de las

células y pueden caracterizarse los efectos del genotipo/fenotipo alterado.

Hahn, y cols. (Nature (1999) 400: 464-468) demostraron, por ejemplo, que los fibroblastos epiteliales humanos normales pueden inducirse para que sufran una conversión tumorigénica cuando una combinación de genes, previamente relacionados con cáncer, se introducía en las células.

5 El control de la expresión génica usando vectores que contienen elementos de expresión inducibles proporciona un procedimiento para estudiar los efectos de determinados productos génicos tras la diferenciación celular. Los sistemas de expresión inducibles son conocidos por los expertos en la técnica. Un sistema de ese tipo es el sistema inducible por ecdisona descrito por No, D., y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1996) 93: 3346-3351.

10 Las MASC pueden usarse para estudiar los efectos de alteraciones genéticas específicas, sustancias tóxicas, agentes terapéuticos u otros agentes sobre las vías de desarrollo. Las técnicas de cultivo tisular conocidas por los expertos en la técnica permiten el cultivo en serie de cientos de miles de muestras celulares de distintos individuos, proporcionando una oportunidad de realizar un análisis rápido de los compuestos que se sospecha que son, por ejemplo, teratogénicos o mutagénicos.

15 Para el estudio de las vías de desarrollo, pueden tratarse las MASC con factores de crecimiento específicos, citocinas u otros agentes, incluidos compuestos químicos sospechosos de ser teratogénicos. Las MASC también pueden modificarse genéticamente usando procedimientos y vectores previamente descritos. Además, las MASC pueden alterarse usando tecnología antisentido o tratamiento con proteínas introducidas en la célula para alterar la expresión de secuencias génicas originales. Las secuencias de péptidos señal, por ejemplo, pueden usarse para introducir los péptidos o polipéptidos deseados en las células. Una técnica especialmente efectiva para introducir polipéptidos y proteínas en la células ha sido descrita por Rojas, y cols., en Natura Biotechnology (1998) 16: 370-375. Este procedimiento produce un producto de polipéptido o proteína que puede introducirse en el medio de cultivo y translocarse a través de la membrana celular al interior de la célula. Puede usarse cualquier número de proteínas de esta manera para determinar el efecto de la proteína diana tras la diferenciación de la célula. Alternativamente, la técnica descrita por Phelan y cols. (Nature Biotech. (1998) 16: 440-443) puede usarse para unir la proteína VP22 del virus del herpes a una proteína funcional para importarla dentro de la célula.

Las células de la presente invención también pueden modificarse genéticamente, mediante la introducción de ADN exógeno o silenciando o escindiendo ADN genómico, para producir células diferenciadas con un fenotipo defectuoso con el fin de probar la efectividad de agentes potencialmente quimioterapéuticos o vectores de tratamiento génico.

20 **Las MACS proporcionan diversos tipos celulares cultivados y no cultivados para un análisis de alto rendimiento:** Las MASC de la presente invención pueden cultivarse, por ejemplo, en placas de 96 pocillos u otras placas multipocillo para proporcionar un sistema para un análisis de alto rendimiento, por ejemplo, de citocina, quimiocinas, factores de crecimiento o composiciones farmacéuticas específicas en farmacogenómica o en farmacogenética. Las MASC de la presente invención proporcionan un sistema único en el que las células pueden diferenciarse para formar linajes celulares específicos a partir del mismo individuo. A diferencia de la mayoría de los cultivos primarios, estas células pueden mantenerse en cultivo y pueden estudiarse a lo largo del tiempo. Pueden tratarse múltiples cultivos de células del mismo individuo y de individuos diferentes con el factor de interés para determinar si las diferencias existen en el efecto del factor celular sobre determinados tipos de células diferenciadas con la misma estructura genética o sobre tipos similares de células de individuos genéticamente diferentes. Por lo tanto, las citocinas, quimiocinas, composiciones farmacéuticas y factores de crecimiento, por ejemplo, pueden analizarse de una manera eficaz en cuanto al tiempo y al coste para elucidar más claramente sus efectos. Las células aisladas a partir de una población grande de individuos y caracterizadas en términos de la presencia o ausencia de polimorfismos genéticos, particularmente polimorfismos de nucleótido simple, pueden repartirse en bancos de cultivo celular para usarlas en diversidad de técnicas de análisis. Por ejemplo, las células madre adultas multipotentes de una población estadísticamente significativa, que puede determinarse de acuerdo con procedimiento conocidos por los expertos en la técnica, proporcionan un sistema ideal para el análisis de alto rendimiento para identificar polimorfismos asociados con una respuesta positiva o negativa aumentada a un grupo de sustancias tales como, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, preparaciones de vacuna, compuestos químicos citotóxicos, mutágenos, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas, compuestos inhibidores, agentes quimioterapéuticos y multitud de otros compuestos o factores. La información obtenida a partir de tales estudios tiene una amplia implicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer y diversidad de enfermedades metabólicas.

En el procedimiento en el que se usan MASC para caracterizar las repuestas celulares frente a agentes biológicos o farmacológicos, o bibliotecas combinatorias de tales agentes, las MASC se aíslan a partir de una población estadísticamente significativa de individuos, se expanden en cultivo, y se ponen en contacto con uno o más agentes biológicos o farmacológicos. Puede inducirse la diferenciación de las MASC, cuando las células diferenciadas con la diana deseada para un determinado agente biológico o farmacéutico, antes o después de la expansión en cultivo. Comparando la una o más respuestas celulares de los cultivos de MASC de individuos de la población estadísticamente significativa, pueden determinarse los efectos del agente biológico o farmacológico. Alternativamente, las MASC genéticamente idénticas, o células diferenciadas a partir de ellas, pueden emplearse para analizar compuestos se parados, tales como compuesto de una biblioteca combinatoria. Se han descrito

sistemas de expresión génica para su uso en combinación con análisis de alto rendimiento basado en células (véase Jayawickreme, C. y Kost, T., *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997) 8: 629-634). Una técnica de análisis de gran volumen usada para la identificación de inhibidores de la activación de células endoteliales ha sido descrita por Rice, y cols., que emplea un sistema de cultivo celular para células endoteliales venosas umbilicales humanas primarias. (Rice, y cols., *Anal. Biochem.* (1996) 241: 254-259.) Las células de la presente invención proporcionan diversidad de tipos celulares, tanto completamente diferenciadas como sin diferenciar, para técnicas de análisis de alto rendimiento usadas para identificar multitud de agentes diana biológicos o farmacéuticos. Lo más importante, las células de la presente invención proporcionan un fuente de células cultivadas de diversidad de individuos genéticamente distintos que pueden responder de forma diferente frente a agentes biológicos y farmacéuticos.

Las MASC pueden proporcionarse como soluciones congeladas, solas o en combinación con medio pre-empaquetado y suplementos para su cultivo, y pueden proporcionarse adicionalmente en combinación con concentraciones efectivas empaquetadas por separado de factores apropiados para inducir la diferenciación de tipos celulares específicos. Alternativamente, las MASC pueden proporcionarse como soluciones congeladas, preparadas por procedimiento conocidos por los expertos en la técnica, que contienen células en las que se ha inducido la diferenciación por los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento.

21. Las MASC y el trazado de perfiles genéticos: La variación genética puede tener efectos directos e indirectos sobre la susceptibilidad a enfermedades. En un caso directo, incluso un sólo cambio de nucleótido, que tenga como consecuencia un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), puede alterar la secuencia de aminoácidos de una proteína y contribuir directamente a la enfermedad o a la susceptibilidad a la enfermedad. La alteración funcional de la proteína resultante puede detectarse frecuentemente *in vitro*. Por ejemplo, cierto genotipos de APO-lipoproteína E se han asociado con la aparición y la progresión de la enfermedad de Alzheimer en algunos individuos.

Las anomalías en la secuencia de ADN pueden detectarse mediante hibridación dinámica específica de alelo, tecnologías de chip de ADN, y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Se ha estimado que las regiones codificantes de proteínas representan sólo aproximadamente el 3 % del genoma humano, y se ha estimado que puede haber de 200.000 a 400.000 SNP comunes localizados en regiones codificantes.

Diseños de investigación anteriores usando análisis genético asociado con SNP han implicado la obtención de muestras para análisis genéticos de un gran número de individuos para los que puede realizarse la caracterización fenotípica. Desafortunadamente, las correlaciones genéticas obtenidas de esta manera se limitan a la identificación de polimorfismos específicos asociados con fenotipos fácilmente identificables, y no proporcionan información adicional sobre la causa subyacente de la enfermedad.

Las MASC de la presente invención proporcionan el elemento necesario para superar la distancia existente entre la identificación de un elemento genético asociado con una enfermedad y la expresión fenotípica final observada en una persona que padece la enfermedad. En resumen, las MASC se aíslan a partir de una población de individuos estadísticamente significativa de los que pueden obtenerse datos fenotípicos (véase Collins, y cols., *Genome Research* (1998) 8: 1229-1231). Estas muestras de MASC se expanden después en cultivo y se almacenan subcultivos de las células como disoluciones congeladas, que pueden usarse para proporcionar cultivos para estudios de desarrollo posteriores. A partir de la población de células expandida, pueden realizarse múltiples análisis genéticos para identificar polimorfismos genéticos. Por ejemplo, los polimorfismos de nucleótido simple puede identificarse en una población de muestras grande en un periodo de tiempo relativamente corto usando técnicas actuales, tales como tecnologías de chip de ADN, conocidas por los expertos en la técnica (Wang, D., y cols., *Science* (1998) 280: 1077-1082; Chee, M., y cols., *Science* (1996) 274: 610-614; Cargill, M., y cols., *Nature Genetics* (1999) 22: 231-238; Gilles, P., y cols., *Nature Biotechnology* (1999) 17: 365-370; Zhao, L.P., y cols., *Am. J. Human Genet.* (1998) 63: 225-240). También se han descrito técnicas de análisis para SNP por Syvänen (Syvänen, A., *Hum. Mut.* (1999) 13: 1-10), Xiong (Xiong, M. y L. Jin, *Am. J. Hum. Genet.* (1999) 64: 629-640), Gu (Gu, Z., y cols., *Human Mutation* (1998) 12: 221-225), Collins (Collins, F., y cols., *Science* (1997) 278: 1580-1581), Howell (Howell, W., y cols., *Nature Biotechnology* (1999) 17: 87-88), Buetow (Buetow, K., y cols., *Nature Genetics* (1999) 21: 323-325), y Hoogendoorn (Hoogendoorn, B., y cols., *Hum. Genet.* (1999) 104: 89-93).

Cuando se asocian determinados polimorfismos con un fenotipo de enfermedad concreto, las células de individuos identificados como portadores del polimorfismo pueden estudiarse para analizar anomalías de desarrollo, usando células de no portadores como control. Las MASC de la presente invención proporcionan un sistema experimental para estudiar las anomalías de desarrollo asociadas con presentaciones de enfermedades genéticas concretas, particularmente, debido a que puede inducirse su diferenciación, usando ciertos procedimientos descritos en el presente documento y ciertos procedimientos distintos conocidos por los expertos en la técnica, para formar tipos celulares concretos. Por ejemplo, cuando un SNP específico está asociado con un trastorno neurodegenerativo, tanto las MASC no diferenciadas como las MASC diferenciadas para formar precursores neuronales, células gliales u otras células de origen neural, pueden usarse para caracterizar los efectos celulares del polimorfismo. Las células que muestran determinado polimorfismos pueden seguirse durante el proceso de diferenciación para identificar elementos genéticos que afectan a la sensibilidad a los fármacos, a la respuesta a quimiocinas y citocinas, a la respuesta a factores de crecimiento, hormonas e inhibidores, así como a las respuestas a cambios en la expresión y/o función de receptores. Esta información puede ser de inestimable valor en el diseño de metodologías de tratamiento para enfermedades de origen genético o para las que hay una predisposición genética.

En el presente procedimiento de usar MASC para identificar polimorfismos genéticos asociados con anomalías fisiológicas, las MASC se aíslan a partir de una población de individuos estadísticamente significativa de los que pueden obtenerse datos fenotípicos (definiéndose una población estadísticamente significativa por los expertos en la técnica como una población de un tamaño suficiente para incluir miembros con al menos un polimorfismo genético) y se expenden en cultivo para establecer cultivos de MASC. El ADN de las células cultivadas se usa entonces para identificar polimorfismos genéticos en las MASC cultivadas a partir de la población, y se induce la diferenciación de las células. Los procesos metabólicos aberrantes asociados con polimorfismos genéticos concretos se identifican y caracterizan comparando los patrones de diferenciación mostrados por las MASC que tienen un genotipo normal con los patrones de diferenciación mostrados por las MASC que tienen un polimorfismo genético identificado o responden a fármacos putativos.

22. Las MASC proporcionan un suministro de vacuna más seguro: Las células MASC de la presente invención también puede usarse como células presentadoras de antígeno cuando se alteran genéticamente para que produzcan una proteína antigénica. Usando células progenitoras autólogas o alogénicas con múltiples alteraciones, por ejemplo, y proporcionando las células progenitoras de la presente invención en combinación con plásmidos incluidos en una matriz biodegradable para una liberación extendida para transfectar las células que las acompañan, puede desencadenarse una respuesta inmunitaria frente a uno o varios agentes, mejorando potencialmente el efecto final de la respuesta inmunitaria mediante la liberación secuencial de células presentadoras de antígeno. Se sabe en la técnica que las administraciones múltiples de algunos antígenos a lo largo de un periodo de tiempo prolongado produce una respuesta inmunitaria aumentada tras la exposición antigénica final. Alternativamente, las MASC pueden usarse como células presentadoras de antígeno, en el procedimiento de Zhang, y cols. (Nature Biotechnology (1998) 1: 1045-1049), para inducir la tolerancia de células T a antígenos específicos.

Muchas preparaciones de vacuna actuales incorporan compuestos químicos añadidos y otras sustancias, tales como antibióticos (para evitar el crecimiento de bacterias en cultivos de vacunas), aluminio (adyuvante), formaldehído (para inactivar los productos bacterianos para vacunas de toxoide), glutamato monosódico (estabilizante), proteína de huevo (componente de vacuna preparados usando huevos de gallina embrionados), sulfitos (estabilizante) y timerosal (un conservante). En parte debido a estos componentes añadidos, actualmente hay una preocupación pública de carácter amplio sobre la seguridad de las preparaciones de vacuna. El timerosal, por ejemplo, contiene mercurio y está hecho de una combinación de cloruro etílico de mercurio, ácido tiosalicílico, hidróxido sódico y etanol. Además, algunos estudios, aunque no concluyentes, han sugerido una posible relación entre algunos componentes de vacuna y complicaciones potenciales tales como las enfermedades comúnmente asociadas con la autoinmunidad. Por tanto, se necesitan terapias de vacuna más efectivas y la cooperación pública con las iniciativas de vacuna será más sencilla de promover si hay un grado mayor de comodidad con el procedimiento de vacunación.

Las MASC de la presente invención pueden diferenciarse para formar células dendríticas, que presentan antígenos a células T y, de esta manera, las activan para que respondan frente a organismos exógenos. Estas células dendríticas pueden alterarse genéticamente para que expresen antígenos exógenos, usando técnicas previamente descritas. Una ventaja particular de este procedimiento de suministro de vacuna reside en el hecho de que más de un antígeno puede ser presentado por una sola célula genéticamente alterada.

Los vectores de vacuna de MASC diferenciadas o no diferenciadas de origen heterólogo proporcionan la ventaja añadida de que estimulan el sistema inmunitario a través de marcadores de superficie celular exógenos. Los experimentos de diseño de vacunas han mostrado que la estimulación de la respuesta inmunitaria usando antígenos múltiples pueden desencadenar una respuesta inmunitaria elevada frente a determinados antígenos individuales dentro de la preparación de vacuna.

Se han identificado antígenos inmunológicamente efectivos para la hepatitis A, hepatitis B, varicela, polio, difteria, tos ferina, tétanos, enfermedad de Lyme, sarampión, parotiditis, rubéola, Haemophilus influenzae de tipo B (Hib), BCG, encefalitis japonesa, fiebre amarilla y rotavirus, por ejemplo.

El procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria a un agente infeccioso en un sujeto humano usando MASC de la presente invención puede realizarse expandiendo una población clonal de células madre adultas multipotentes en cultivo, alterando genéticamente las células expandidas para que expresen una o más moléculas de antígeno preseleccionadas para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora frente a un agente infeccioso, e introduciendo en el sujeto una cantidad eficaz de las células genéticamente alteradas para inducir la respuesta inmunitaria. Los procedimientos para administrar células genéticamente alteradas son conocidos por los expertos en la técnica. Una cantidad de células genéticamente alteradas efectiva para inducir una respuesta inmunitaria es una cantidad de células que produce la expresión suficiente del antígeno deseado para producir una respuesta de anticuerpos medibles, como se determina mediante los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la respuesta de anticuerpos es una respuesta de anticuerpos protectora que puede detectarse mediante la resistencia a la enfermedad tras la exposición al agente infeccioso apropiado.

23. Las MASC y el tratamiento del cáncer: Las MASC de la presente invención proporcionan un vehículo novedoso para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, puede inducirse la diferenciación de las MASC para que formen células endoteliales o precursores que se dirigirán a tejidos endoteliales cuando se suministran localmente o sistémicamente. Las células participan en la formación de vasos sanguíneos para el suministro a tumores de nueva

formación (angiogénesis), y se dividen y proliferan en consecuencia en el tejido endotelial. Modificando genéticamente estas células para que sufran apoptosis tras la estimulación con un elemento administrado desde el exterior, los vasos sanguíneos de nueva formación pueden alterarse y puede eliminarse el flujo de sangre hacia el tumor. Un ejemplo de un elemento administrado desde el exterior sería el antibiótico tetraciclina, cuando las células han sido transfectadas o transducidas con un gen que promueve la apoptosis, tal como Caspasa o BAD, bajo el control de un elemento de respuesta a tetraciclina. Los elementos de respuesta a tetraciclina ha sido descritos en la bibliografía (Gossen, M. y Bujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1992) 89: 5547-5551), proporcionan control de la expresión de los transgenes *in vivo* en células endoteliales (Sarao, R. y Dumont, D., Transgenic Res. (1998) 7: 421-427), y están comercialmente disponibles (CLONETECH Laboratories, Palo Alto, CA).

Alternativamente, las MASC no diferenciadas o las MASC diferenciadas para formas linajes celulares específicos de tejido pueden alterarse genéticamente para producir un producto, para exportarlo al entorno extracelular, que es tóxico para las células tumorales o que altera la angiogénesis (tal como el factor derivado del epitelio pigmentario), descrito por Dawson, y cols., Science (1999) 285: 245-248). Por ejemplo, Koivunen, y cols., describen péptidos cíclicos que contienen una secuencia de aminoácidos que inhibe selectivamente MMP-2 y MMP-9 (metaloproteinasas de la matriz asociadas con tumorigénesis), evitando el crecimiento y la invasión tumoral en modelos animales y, específicamente, dirigiéndose a vasos sanguíneos angiogénicos *in vivo* (Koivunen, E., Nat. Biotech. (1999) 17: 768-774). Cuando se desea que las células se dirijan al sitio del tumor, produzcan un producto inhibidor tumoral y luego se destruyan, las células pueden alterarse genéticamente adicionalmente para que incorporen una proteína promotora de la apoptosis bajo el control de un promotor inducible.

Las MASC también proporcionan un vector para la administración de vacunas contra el cáncer, ya que pueden aislarse del paciente, cultivarse *ex vivo*, alterarse genéticamente *ex vivo* para que expresen los antígenos apropiados, particularmente en combinación con receptores asociados con una respuesta inmunitaria a antígenos aumentada, y reintroducirse en el sujeto para provocar una respuesta inmunitaria a la proteína expresada sobre las células tumorales.

24. Kits que contienen MASC o componentes de aislamiento y cultivo de MASC: Las MASC de la presente invención pueden proporcionarse en kits, con un material de empaquetado adecuado. Por ejemplo, las MASC pueden proporcionarse como disoluciones congeladas, acompañadas por factores y medios apropiados empaquetados por separado, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, para cultivarlas en el estado no diferenciado. Además, también pueden proporcionarse factores empaquetados por separado para la inducción de la diferenciación, como se ha descrito anteriormente.

También se proporcionan por la presente invención kits que contienen cantidades efectivas de factores apropiados para el aislamiento y cultivo de células madre del paciente. Tras obtener un aspirado de médula ósea del paciente, el técnico de laboratorio clínico sólo necesita seleccionar las células madre, usando el procedimiento descrito en el presente documento, con el anti-CD45 y el anti-glicoforina A proporcionados en el kit, después cultivar las células como se describe por el procedimiento de la presente invención, usando el medio de cultivo suministrado como un componente del kit. La composición del medio de cultivo básico se ha descrito anteriormente en el presente documento.

La presente invención describe un kit para el aislamiento de MASC a partir de un sujeto humano en un ámbito clínico. Usando los componentes del kit empaquetados juntos, las MASC pueden aislarse a partir de un aspirado de médula ósea simple. Usando componentes adicionales del kit, incluyendo factores de diferenciación, medios de cultivo e instrucciones para inducir la diferenciación de MASC en cultivo, un técnico de laboratorio clínico puede producir una población de células presentadoras de antígeno (APC) a partir de la propia muestra de médula ósea del paciente. Materiales adicionales del kit pueden proporcionar vectores para la administración de polinucleótidos que codifican antígenos apropiados para la expresión y presentación por parte de las APC diferenciadas. Pueden suministrarse, por ejemplo, plásmidos que contengan la secuencia genética de, por ejemplo, el antígeno de superficie de la hepatitis B o los antígenos protectores de la hepatitis A, *Plasmodium falciparum*, u otros organismos infecciosos. Estos plásmidos puede introducirse en las APC cultivadas usando, por ejemplo, materiales de transfección con fosfato de calcio, e instrucciones de uso, suministradas con el kit. Los materiales adicionales pueden ser suministrados por inyección de APC genéticamente alteradas de vuelta en el paciente, proporcionando un sistema autólogo de administración de vacuna.

La invención se describirá con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos detallados:

Ejemplos

Ejemplo 1. Aislamiento de MASC a partir de células mononucleares de médula ósea

Se obtuvieron células mononucleares de médula ósea a partir de aspirados de médula ósea de la cresta ilíaca posterior de >80 voluntarios humanos sanos. Se obtuvieron de diez a 100 centímetros cúbicos de médula ósea de cada sujeto, como se muestra en la Tabla 2, lo que indica el número aproximado de células mononucleares aisladas de cada sujeto. Las células mononucleares (MNC) se obtuvieron de la médula ósea por centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll-Paque (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). Se incubaron MNC de médula ósea con

microesferas de CD45 y glicoforina A (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) durante 15 minutos y las células CD45⁺/GlyA⁻ se retiraron colocando la muestra enfrente de un imán SuperMACS. Las células eluidas son 99,5 % CD45⁻/GlyA⁻.

Como se indica en la Tabla 2, la eliminación de las células CD45⁺ GlyA⁺ tuvo como consecuencia la recuperación de las células CD45⁻ GlyA⁻ que constituían aproximadamente del 0,05 al 0,10 % del total de las células mononucleares de la médula ósea.

5

Tabla 2

Volumen de Médula Ósea (cc)	Número de células BM mononucleares post ficoll	Número de células 45- /GlyA- post-MACS	Número de MASC (estimado por ensayo de dilución límite, LDA)
50	100 millones	100.000	50
25	80	60.000	35
25	50	14.000	10
50	100	50.000	30
10	150	75.000	30
30	100	100.000	25
25	80	75.000	35
100	190	78.000	25
100	150	60.000	15
100	160	160.000	85
100	317	400.000	50
100	200	150.000	70
50	160	160.000	85
50	115	150.000	70
25	60	60.000	30
100	307	315.000	100
100	216	140.000	80
50	130	150.000	40
100	362	190.000	60
50	190	150.000	40
100	200	185.000	100
100	387	300.000	170
50	100	130.000	20
150	588	735.000	300

Seleccionamos células que no expresan el antígeno leucocitario común, CD45, o el precursor del marcador eritroide, glicoforina A (Gly-A). Las células CD45⁻GlyA⁻ constituyen 1/10 células³ células mononucleares de la médula. Las células CD45⁻GlyA⁻ se plaquearon en pocillos recubiertos con fibronectina con FCS al 2 %, y EGF, PDGF-CC, dexametasona, insulina, ácido linoleico y ácido ascórbico. Después de 7-21 días, se desarrollan pequeñas agrupaciones de células adherentes. Usando ensayos de dilución límite, se determinó que la frecuencia de células que daban lugar a estas agrupaciones adherentes era de 1/5x10³ células CD45⁻GlyA⁻.

10

Cuando aparecieron las colonias (aproximadamente 10³ células) se recuperaron las células por tripsinización y se replaquearon cada 3-5 días a una dilución 1:4 bajo las mismas condiciones de cultivo. Las densidades celulares se mantuvieron entre 2-8x10³ células/cm². El tiempo de división de las células fue de 48-60h. Los análisis inmunofenotípicos por FACS de las células obtenidas tras 10-12 divisiones celulares mostraron que las células no expresaban CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD50, CD62E y CD62-P, Muc18, cKit, Tie/Tek, y CD44. Las células no expresaban HLA-DR o HLA de clase I y expresaban niveles bajos de β2-microglobulina. Las células se teñían intensamente dando positivo contra CD10, CD13, CD49b, CD49e, CDw90, Flk1. El fenotipo MASC permaneció sin cambios durante >30 divisiones (n=15). Los cultivos de MASC con células capaces de proliferar más allá de 30 divisiones y de diferenciarse a todos los tipos celulares mesodérmicos (véase más adelante) se han establecido a partir del >85 % de los donantes, de 2-50 años de edad. En 10 donantes, se expandieron MASC durante >50 divisiones celulares. Cuando se cultivaron las células en medio libre de suero, también suplementado con 10 ng/ml de IGF, la división celular fue más lenta (>60h), pero pudieron obtenerse >40 divisiones celulares. Como se observó para las células cultivadas con FCS al 2 % sin IGF, las células cultivadas en medio libre de suero eran negativas para HLA de clase I y CD44, y podían diferenciarse a todos los fenotipos mesodérmicos, como se describe más adelante.

15

20

25

Cuando se plaquearon las células sobre colágeno de tipo I o laminina en lugar de fibronectina, expresaron CD44 y HLA-DR, y no pudieron expandirse más allá de 30 divisiones celulares. Cuando se omitieron el EGF o el PDGF las

células no proliferaron y murieron, mientras que concentraciones aumentadas de estas citocinas permitieron el crecimiento inicial de las MASC pero provocaron pérdida de proliferación más allá de 20-30 divisiones celulares. La adición de concentraciones mayores de dexametasona también provocó la pérdida de proliferación más allá de 30 divisiones celulares. Cuando se cultivaron las células con >2 % de FCS en el medio de cultivo expresaron CD44, HLA-DR y HLA de clase I. Del mismo modo, el cultivo a alta densidad ($>8 \times 10^3$ células/cm²) se asoció con la adquisición de CD44, HLA-DR y HLA de clase I y Muc-18, similar al fenotipo descrito para MASC. El cultivo a alta densidad o con concentraciones mayores de FCS también se asoció con la pérdida de capacidad de expansión, y las células no proliferaron más allá de 25-30 divisiones celulares.

Se intentaron clonar MASC replaqueando MASC a 1 célula/pocillo una vez se habían establecido los cultivos. De 3 donantes, se plaquearon >2000 células solas en placas de 96 pocillos recubiertas con FN con el mismo medio de cultivo. No se detectó crecimiento celular en ningún pocillo. Cabe destacar que, cuando las células se depositaron a 10 células/pocillo se encontró crecimiento celular en aproximadamente el 4 % de los pocillos. La progenie del 5 % de estos pocillos pudo expandirse a $>10^7$ células.

La longitud de los telómeros de las MASC de 5 donantes (2-50 años de edad) cultivadas durante 15 divisiones celulares estaba entre 11-16 kB. En 3 donantes, esta fue 3 kB más larga que la longitud del telómero de linfocitos sanguíneos obtenidos de los mismos donantes. La longitud del telómero de células de 1 donante evaluada tras 15 divisiones celulares, 30 divisiones celulares, 45 divisiones celulares, permaneció sin cambios. El análisis citogenético de las MASC recuperadas tras 30 divisiones celulares mostró un cariotipo normal.

Ejemplo 2. Diferenciación de MASC

Para inducir la diferenciación de osteoblastos, se suplementó medio libre de suero con 10^{-7} M de dexametasona, ácido ascórbico 10 mM y glicerofosfato 10 mM. La diferenciación de osteoblastos se confirmó mediante detección de mineralización de calcio, expresión de fosfatasa alcalina, y producción de sialoproteína ósea, osteopontina, osteocalcina y osteonectina, que son relativamente específicas para el desarrollo óseo (véase la Fig. 7).

Para inducir la diferenciación a cartílago, el medio libre de suero, como se ha descrito anteriormente, se suplementó con 100 ng/ml de TGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se indujo la diferenciación de las células mientras estaban adheridas a la fibronectina o en cultivo en suspensión, con ambos procedimientos produciendo células de cartílago diferenciadas. La diferenciación para formar células de cartílago se confirmó por detección de colágeno de tipo II, así como del glicosaminoglicano agregano (véase la Fig. 7).

Para inducir la diferenciación a adipocitos, se añadieron dexametasona 10^{-7} M y 100 µg/ml de insulina al medio de cultivo. La diferenciación a adipocitos también se indujo reemplazando el medio libre de suero con medio que contenía un 20 % de suero de caballo. La diferenciación a adipocitos se detectó por detección de LPL y aP2.

Para inducir la diferenciación a miocitos esqueléticos, >80 % de las MASC confluentes se trataron con 5-azacitidina 3µM durante 24h y después se mantuvieron en medio MASC con EGF y PDGF-BB. Se observó la expresión de proteínas musculares específicas tan pronto como 5 días después de cambiar las condiciones de cultivo. Dos días después de la inducción, se detectaron los factores de transcripción Myf5, Myo-D y Myf6. Después de 14-18 días, Myo-D se expresó en niveles significativamente menores, mientras que Myf5 y Myf6 se mantuvieron. Se detectó desmina y actina sarcomérica tan pronto como 4 días después de la inducción, y miosina de contracción rápida y de contracción lenta a los 14 días (véase la Fig. 7). Mediante inmunohistoquímica, el 70-80 % de las células expresaron proteínas musculares maduras después de 14 días. Cuando se añadió un 20 % de suero de caballo se demostró la fusión de mioblastos para formar miotubos que eran multinucleados (véase la Fig. 7). Cabe destacar que el tratamiento con 5-azacitidina también introdujo la presentación de Gata4 y Gata6 durante la primera semana de cultivo, y troponina-T cardíaca después de 14 días. Además, se detectó actina del músculo liso a los 2 días después de la inducción y persistió hasta los 14 días.

La diferenciación a músculo liso se produjo cuando se añadieron 100 ng/ml de PDGF como citocina sola para MASC confluentes mantenidas en medio de MASC libre de suero durante 14 días. Las células expresaron marcadores de músculo liso (Fig. x). Se encontró presencia de miogenina desde el día 4 en adelante y de desmina después de 6 días. Se detectó actina del músculo liso desde el día 2 en adelante y miosina del músculo liso después de 14 días. Después de 14 días, aproximadamente un 70 % de las células se tiñeron como positivas con anticuerpos anti-actina y miosina de músculo liso. También se pudieron detectar las proteínas Myf5 y Myf6, pero no Myo-D después de 2-4 días, que persistieron hasta el día 15 (Fig. 7).

La diferenciación a músculo cardíaco se indujo añadiendo 100 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) al medio de cultivo libre de suero estándar previamente descrito en el presente documento. Las células eran confluentes al inicio del tratamiento con bFGF. Para inducir desarrollo adicional de tejidos cardíacos, se añadieron 100 ng/ml de 5-azacitidina, 100 ng/ml de bFGF, y 25 ng/ml de proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2 y BMP-4) al medio de cultivo. Las células eran confluentes en >80 % al inicio del tratamiento para inducir la diferenciación a tejido cardíaco. Gata4 y Gata6 se expresaron tan pronto como el día 2 y persistieron hasta el día 15. La expresión de Myf6 y desmina se observó después del día 2 y la miogenina después del día 6. La troponina-T cardíaca se expresó después del día 4 y la troponina-I cardíaca y la ANP después del día 11. Estas proteínas cardíacas maduras se

detectaron en >70 % de las células por inmunohistoquímica en el día 15. Cuando los cultivos se mantuvieron durante >3 semanas, las células formaron sincitios y se observaron contracciones espontáneas poco frecuentes que tenían lugar en los cultivos, que se propagaban a lo largo de varios mm de distancia. (Fig. 7) De nuevo, también se detectaron Myf5 y myf6 y actina de músculo liso después del día 6.

- 5 Se añadió factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a una concentración de 20 ng/ml al medio libre de suero menos otros factores de crecimiento para inducir la diferenciación a células endoteliales para el día 15-20 *ex vivo*. La diferenciación a células endoteliales se confirmó por tinción inmunofluorescente para detectar proteínas celulares y receptores asociados con la diferenciación celular endotelial. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

10 La diferenciación hematopoyética se indujo cultivando MASC en pocillos recubiertos con colágeno de tipo IV en medio MASC que contenía PDGF-BB-y EGF con FCS al 5 % y 100 ng/ml de SCF que se condicionó por el alimentador AFT024, una línea mesenquimal derivada de hígado fetal que soporta células madre de repoblación murinas y humanas *ex vivo*. Las células recuperadas de estos cultivos expresaron cKit, cMyb, Gata2 y G-CSF-R, pero no CD34 (RT-PCR). Debido a que la hemopoyesis está inducida por factores que se liberan por endodermo visceral embrionario, se cultivaron conjuntamente MASC humanas con EB murinas β Gal⁺ en presencia de SCF humana, Flt3-L, Tpo y Epo. En 2 estudios separados, se detectó una pequeña población de células que expresaron CD45 humana.

20 Se indujo la diferenciación "estromal" incubando MASC con IL-1 α , FCS y suero de caballo. Para demostrar que estas células puede soportar la hemopoyesis, se irradiaron los alimentadores a 2Gy y se plaquearon células sanguíneas del cordón umbilical CD34⁺ en contacto con el alimentador. Después de 2 semanas, se replaqueó la progenie en un ensayo con metilcelulosa para determinar el número de células formadoras de colonias (CFC). Se observó una expansión de 3-5 veces de CFC.

Los cultivos de MASC confluentes se trataron con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y KGF. Después de 14 días, las células expresaron MET (el receptor del HGF), asociado con el desarrollo de células epiteliales hepáticas, citoqueratina 18 y 19.

25 **Ejemplo 4. Transducción de MASC de médula adulta**

Una vez establecidos los cultivos después de aproximadamente 3-10 subcultivos, las MASC se transdujeron retrovíricamente con un vector que contenía una proteína verde fluorescente potenciada (eGFP) en dos días consecutivos. Los vectores retrovíricos que se usaron fueron los constructos MFG-eGFP o MND-eGFP-SN, proporcionados amablemente por el doctor Donald Kohn (M.D.), del LA Childrens Hospital, Los Angeles, CA. Ambos vectores se empaquetaron en la línea celular anfitrión PA317 o la línea celular de empaquetamiento de leucemia del Gibón PG13. El sobrenadante retrovírico se produjo incubando el alimentador productor con medio de expansión de MASC durante 48 horas. El sobrenadante se filtró y se congeló a -80°C hasta su uso. Las MASC semiconfluentes se subcultivaron en medio de cultivo de expansión de MASC. Después de 24 horas, el medio se reemplazó con sobrenadantes con que contenían retrovirus y 8 g/ml de protamina (Sigma) durante 5 horas. Esto se repitió 24 horas después. De dos a tres días después de la última transducción, se seleccionaron células eGFP⁺ en un citómetro de flujo FACS Star Plus con un ordenador Consort (todo de Becton Dickinson Inc) a 10 células/pocillo de placas de 96 pocillos recubiertas con 5 ng/ml de FN, y el 40-85 % de las células adherentes expresaron el gen eGFP. Usando la unidad automática de deposición de células (ACDU) del clasificador activado por fluorescencia, se clasificaron 10 células eGFP⁺ por pocillo de placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina. Se mantuvieron las células en medio de expansión de MASC durante 1-7 meses. Después de 3-4 semanas, las células adherentes habían alcanzado la confluencia en el 3-4 % de los pocillos. Las células se expandieron por cultivo de nuevo. La progenie de <1 pocillo por placa pudo expandirse para generar >10⁷ células (48 divisiones celulares adicionales). Por tanto, 1/10⁷-1/10⁸ células de la médula ósea tienen potencial de proliferación extenso.

45 Las poblaciones celulares expandidas por clonación se dividieron entonces en 5-10 poblaciones. Algunas células se crioconservaron sin diferenciar, mientras que en otras células se indujo la diferenciación a osteoblastos, condrocitos, células estromales, mioblastos de músculo liso y esquelético y células endoteliales. Para demostrar la diferenciación a lo largo de una vía dada, y para confirmar la identidad de tejido, se examinaron células por inmunohistoquímica y/o transferencia Western para proteínas que se sabe que están presentes en los tipos celulares diferenciados.

50 Se ha usado la clasificación de células sueltas o la clonación con anillos para mostrar el origen de células sueltas de una población celular. Sin embargo, debido a que las MASC son células adherentes es posible que se seleccionen dos en lugar de una célula suelta mediante FACS o mediante clonación con anillos. El hecho de que la integración de retrovirus sea aleatoria se usó para probar el origen clonal de todas las células diferenciadas. Debido a la integración vírica aleatoria, el ADN de la célula huésped que flanquea las LTR retrovíricas es específico de célula. Tras la división celular, todas las células hijas pueden identificarse basándose en la presencia del retrovirus en la localización idéntica en el genoma de la célula huésped.

Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN de la célula huésped que flanquea el 3 y el 5 de las LTR del inserto retrovírico. La PCR inversa se realizó usando un protocolo amablemente proporcionado por el doctor Jan Nolte (Ph.D.), del LA Children Hospital, Los Angeles, CA. En resumen, se extrajo el ADN de MASC

no diferenciadas así como de progenie diferenciada, se cortaron con *Taq1* (Invitrogen) los fragmentos ligados y se realizó una PCR inversa para obtener la secuencia del ADN de la célula huésped del flanco 5'. Esta técnica de PCR inversa o el análisis e transferencia Southern se han usado de forma extensa en biología de células madre hematopoyéticas para demostrar que cada linaje diferenciado deriva de una sola célula. Una vez amplificado el ADN flaqueante, se secuenciaron 200-300 bases y se diseñaron cebadores que reconocen específicamente el ADN flaqueante. Las células no diferenciadas y diferenciadas se sometieron entonces a PCR usando un cebador específico para el ADN flaqueante y un cebador que reconoce la repetición terminal larga (LTR) de 5' para amplificar el ADN de la progenie diferenciada. Para cada una de las 3 muestras que se examinaron, se identificó una sola secuencia de ADN específica de célula que flanqueaba la LTR en 5', que era idéntica para las células no diferenciadas y diferenciadas. Esto prueba el origen celular único de todas las células de origen "mesodérmico".

Usando esta técnica, los presentes estudios confirman que las células osteoprogenitoras existen en la médula y estas células pueden diferenciarse a osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos y células estromales de la médula. Los presente inventores también demuestran que una sola células derivada de médula puede dar lugar a células a partir del mesodermo tanto espláncnico como visceral. Además el cariotipo de células que se han cultivado durante más de nueve meses es normal, indicando que su capacidad de expansión en serie se debe a su naturaleza de células madre o no debido a génesis tumoral o inmortalización.

Ejemplo 5. Generación de células gliales y neuronales a partir de células madre mesenquimales de médula ósea adulta

Las neuronas diferenciadas son post-mitóticos y se observa muy poca o ninguna regeneración neuronal *in vivo*. Los tratamientos para trastornos neurodegenerativos y traumáticos del cerebro podrían avanzar significativamente si se pudieran introducir células madre neurales (NSC) proliferantes nuevas en las áreas defectuosas del cerebro que adquirirían la función del tejido defectuoso. Se ha descubierto ahora que las MASC seleccionadas a partir de médula ósea post-natal que se diferencian a todos los tipos celulares mesodérmicos también pueden diferenciarse a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.

Los cultivos de MASC se establecieron como se describe en el ejemplo 1. El desarrollo neural se indujo como sigue. La generación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos se realizó en medio consistente en medio de diferenciación neural. Este medio comprendía lo siguiente: 10-95 % de DMEM-LG (preferiblemente aproximadamente un 60 %), 5-90 % de MCDB-201 (preferiblemente aproximadamente un 40 %), 1X ITS, 1X LA-BSA, dexametasona 10^{-7} a 10^{-9} M (preferiblemente aproximadamente 10^{-8} M), ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-3} a 10^{-5} M (preferiblemente aproximadamente 10^{-4} M) y 0,5-100 ng/ml (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml). El medio también puede contener una o más de las siguientes citocinas con el fin de inducir la diferenciación en determinados tipos celulares:

5-50 ng/ml de bFGF (preferiblemente aproximadamente 100 ng/ml) -- astrocito, oligodendrocito, neurona (tipo desconocido));

5-50 ng/ml de FGF-9 (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- astrocito, oligodendrocito, neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas

5-50 ng/ml de FGF-8 (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y GABAérgicas, no células gliales

5-50 ng/ml de FGF-10 (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- astrocitos, oligodendrocitos, no neuronas

5-50 ng/ml de FGF-4 (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- astrocitos, oligodendrocitos, pero no neuronas

5-50 ng/ml de BDNF (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- sólo neuronas Dopaminérgicas)

5-50 ng/ml de GDNF (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas

5-50 ng/ml de CDTF (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) -- sólo neuronas GABAérgicas

La elección de factores de crecimiento para inducir la diferenciación de MASC a células neurales se basó en lo que se sabe sobre desarrollo embrionario del sistema nervioso o en estudios que evaluaban la diferenciación del NSC *in vitro*. Todo el medio de cultivo era libre de suero y suplementado con EGF, que es un fuerte inductor ectodérmico. Los FGF juegan un papel clave en el desarrollo neuronal. Cuando se cultivaron las MASC derivadas de médula humana post-natales tanto con 100 ng/ml de bFGF como con 10 ng/ml, se observó la diferenciación a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Los astrocitos se identificaron como células positivas para proteína ácida glial fibrilar (GFAP), los oligodendrocitos se identificaron como positivos para glucocerebrosidos (GalC) y las neuronas se identificaron como células que expresan de forma secuencial NeuroD, Tubulina-III B (Tuji), sinaptofisina y neurofilamento 68, 160 y 200. Las células no expresaron marcadores de neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas o serotoninérgicas.

El FGF-9, aislado en primer lugar de una línea celular de glioblastoma, induce la proliferación de células gliales en

cultivo. En FGF-9 se encuentra *in vivo* en neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, sustancia negra, núcleos motores del tronco encefálico y la capa de células de Purkinje. Cuando se cultivaron durante 3 semanas con 10 ng/ml de FGF-9 y EGF, las MASC generaron astrocitos, oligodendrocitos y GABAérgicas y dopaminérgicas. Durante el desarrollo del SNC, FGF-8, expresado en el límite mesencéfalo/rombencéfalo por el prosencéfalo rostral, en combinación con el erizo sónico, induce la diferenciación de neuronas dopaminérgicas en mesencéfalo y prosencéfalo. Se encontró que cuando se cultivaron MASC con 10 ng/ml de FGF-8 y EGF durante 3 semanas, se produjeron neuronas tanto dopaminérgicas como GABAérgicas. FGF-10 se encuentra en el cerebro en cantidades muy bajas y su expresión está restringida al hipocampo, tálamo, mesencéfalo y tronco encefálico donde se expresa de forma preferente en neuronas pero no en células gliales. El cultivo de MASC en 10 ng/ml de FGF-10 y EGF durante tres semanas generó astrocitos y oligodendrocitos, pero no neuronas. FGF-4 se expresa por el notocordio y se requiere para la regionalización del mesencéfalo. Cuando se trataron con 10 ng/ml de FGF-4 y EGF durante 3 semanas, las MASC se diferenciaron a astrocitos y oligodendrocitos, pero no a neuronas.

Otros factores de crecimiento que se expresan específicamente en el cerebro y que afectan a desarrollo neuronal *in vivo* e *in vitro* incluyen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de glial (GDNF) y factor neurotrófico ciliar (CNTF). El BDNF es un miembro de la familia de los factores de crecimiento nervioso que promueve la diferenciación *in vitro* del NSC, células subependimales humanas, y precursores neuronales para neuronas y promueve la excrecencia de neuritas de células madre hipocámpicas *in vivo*. De acuerdo con la función conocida del BDNF de soportar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, cuando se trataron MASC con 10 ng/ml de BDNF y EGF se observó diferenciación exclusiva en neuronas positivas para tirosina hidroxilasa. El GDNF es un miembro de la superfamilia TGF. En neurogénesis temprana, el GDNF se expresa en el neuroectodermo anterior lo que sugiere que puede desempeñar un papel clave en el desarrollo neuronal. GDNF promueve la supervivencia de neuronas motoras en el nervio y el músculo periférico y tienen capacidades neurotróficas y de diferenciación. Se observó que el GDNF inducía la diferenciación de MASC a neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas. El CNTF, aislado en primer lugar a partir de ganglio ciliar, es un miembro de la familia de gp130 de citocinas. El CNTF promueve la supervivencia neuronal temprana en el desarrollo. En cultivos hipocámpicos de ratas embrionarias, el CNTF incrementó el número de neuronas GABAérgicas y colinérgicas. Además, evitó la muerte celular de neuronas GABAérgicas y promovió la incorporación de GABA. El CNTF ejerció la misma inducción GABAérgica sobre MASC ya que éstas se diferenciaban exclusivamente a neuronas GABAérgicas después de tres semanas de la exposición a CNTF.

Se ha demostrado que algunas citocinas hematopoyéticas son factores tróficos del NSC, tales como IL-11 y LIF, como se menciona anteriormente. Además, los estudios *in vitro* sobre células precursoras neuronales han mostrado que SCF, Flt3L, EPO, TPO, G-CSF, y CSF-1 actúan temprano en la diferenciación de las células neurales, mientras que IL5, IL7, IL9, e IL11 actúan después en la maduración neuronal. Las MASC inducidas con una combinación de citocinas de acción temprana (10 ng/ml de trombopoyetina (amable donación de Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), 10 ng/ml de factor de estimulación de colonias de granulocitos (Amgen), 3U de eritropoyetina (Amgen) y 10 ng/ml de interleucina-3 (R&D Systems), seguido de cultivo durante 1 mes en un medio condicionados por la capa alimentadora de hígado fetal murino (una amable donación del Dr. Ihor Lemishka, Universidad de Princeton, NJ) suplementado con 14/ml de ligando de tirosina cinasa 3 de hígado fetal (una amable donación de Immunex Inc, Seattle, WA) y 15 ng/ml de SCF (una amable donación de Amgen), se diferenciaron en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. Las neuronas colinérgicas generadas bajo estas condiciones eran inmaduras, ya que expresaban neurofilamento 68 pero no 200.

En algunos cultivos, las MASC se habían transducido retrovéricamente con un vector que contenía eGFP (descrito en el ejemplo 4 anteriormente). Las células gliales y neuronales diferenciadas continuaron expresando eGFP. Esto indica que estas células puede modificarse genéticamente sin interferir con su diferenciación. Por tanto, las MASC no diferenciadas pueden generar una células madre neural que después da lugar a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas.

La facilidad con la que las MASC pueden aislarse a partir de médula post-natal, expandirse *ex vivo* a inducir su diferenciación *in vitro* en células gliales o tipos celulares neuronales específicos evita uno de los problemas clave en los trasplante en el NSC, a saber, la disponibilidad de tejido de donante adecuado.

Las células de la presente invención pueden usarse en tratamientos de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos neurodegenerativos congénitos o trastornos de almacenamiento tales como, por ejemplo, mucopolisacaridosis, leucodistrofias (leucodistrofia de células globoides, enfermedad de Canavan), fucosidosis, gangliosidosis GM2, Niemann-Pick, síndrome de Sanfilippo, enfermedad de Wolman y Tay Sachs. También pueden usarse para tratar o aliviar síntomas de trastornos neurodegenerativos adquiridos tales como Huntington, Parkinson, esclerosis múltiple y Alzheimer. También pueden usarse para trastornos traumáticos tales como apoplejía, hemorragia en el CNS, y traumatismo en el CNS; para trastornos del sistema nervioso periférico tales como lesión de la médula espinal o siringomielia; para trastornos de la retina tales como desprendimiento de retina, degeneración macular y otros trastornos degenerativos de la retina, y retinopatía diabética.

Ejemplo 6. Desarrollo hematopoyético

Las células madre hematopoyéticas (HSC) tienen un origen mesodérmico. Durante mucho tiempo se pensó que las HSC provenían del mesodermo del saco vitelino. Existe amplia evidencia de que las células eritroides primitivas se originan en el saco vitelino. Está menos claro si la hematopoyesis definitiva se origina también a partir de células del saco vitelino. Una serie de estudios recientes en embriones de pollo, murino y humanos han sugerido que la hematopoyesis definitiva puede derivar a partir de células mesodérmicas presentes en el propio embrión, a saber, en la región AGM. En seres humanos, entre los días 22 y 35, se desarrolla una pequeña población de células Flk1⁺ en la aorta dorsal que se diferencia en células CD34⁺ endoteliales o hematopoyéticas. Se cree que estas son las células que colonizan el hígado fetal. Aunque las células con potencial hematopoyético se originan en la aorta dorsal, su diferenciación y su destino como células hematopoyéticas maduras requiere que migren al hígado, donde el entorno endodérmico es propicio para el desarrollo hematopoyético. En cambio, las células que permanecen en la región AGM no se desarrollarán a células hematopoyéticas.

Algunos de los clones de los presentes cultivos de MASC tienen potencial hematopoyético. Las MASC se diferencian en células endoteliales y forman lo que se parece a cuerpos embrionarios. Estos mismos agregados celulares se diferencian en células hematopoyéticas. Los pequeños agregados suspendido se tripsinizaron y se replaquearon sobre FN, colágeno de tipo IV o ECM. El medio consistía en medio de MASC con contenía 0,5-1.000 ng/ml de PDGF-BB (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) y 0,5-1.000 ng/ml de EGF (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) suplementado con 5-1.000 ng/ml de SCF (preferiblemente aproximadamente 20 ng/ml) o en una combinación de IL3, G-CSF, Flt3-L y SCF (2-1000 ng/ml, preferiblemente aproximadamente 10-20 ng/ml). Alternativamente, se usó un medio MASC que contenía 0,5-1.000 ng/ml de PDGF-BB (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) y 0,5-1.000 ng/ml de EGF (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) con FCS al 5 % y 1-1.000 ng/ml de SCF (preferiblemente aproximadamente 100 ng/ml) que estaba condicionado con células AFT024. Las células recuperadas de cualquiera de estos cultivos expresaron cKit, cMyb, Gata2 y G-CSF-R (RT-PCR/inmunoquímica), indicando que la diferenciación hematopoyética puede lograrse.

Ejemplo 7. Desarrollo epitelial

Los solicitantes también han podido demostrar el desarrollo epitelial. En resumen, se recubrió un recipiente con 1-100 ng/ml de fibronectina junto con otros productos de ECM tales como 1-100 ng/ml de laminina, colágenos o IV y matrigel. El medio usado comprendía lo siguiente: 10-95 % de DMEM-LG, 5-90 % de MCDB-201, 1X ITS, 1X 10 LA-BSA, dexametasona 10⁻⁷ -10⁻⁹ M (preferiblemente 10⁻⁸), ácido ascórbico 2-fosfato 10⁻³ a 10⁻⁵ M (preferiblemente 10⁻⁴). El medio también puede contener una o más de las siguientes citocinas

0,5-100 ng/ml de EGF (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) 0,5-1000 ng/ml de PDGF-BB (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) 0,5-1000 ng/ml de HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml) 0,5-1000 ng/ml de KGF (factor de crecimiento de queratinocitos) (preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml)

Algunas de las células fueron positivas para pancitoqueratina, y positivas para citoqueratina 18 y 19, lo que sugeriría que estas células tienen origen endodérmico (es decir, epitelio hepático, epitelio biliar, células pancreáticas acinares, o epitelio intestinal). Algunas de las células demostraron la presencia de *oH-Met*, o del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, que son específicos para epitelio hepático y epitelio renal. Otras células demostraron la presencia de queratina, lo que es compatible con epitelio de la piel.

Las células de la presente invención se pueden usar en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar los síntomas de diversas enfermedades de órganos. Se podrían usar las células para tratar o aliviar trastornos hepáticos congénitos, por ejemplo, trastornos de almacenamiento tales como mucopolisacaridosis, leucodistrofias, gangliosidosis GM2; incremento de trastornos de bilirrubina, por ejemplo síndrome de Crigler-Najjar; trastornos de amoníaco tales como errores innatos del ciclo de la urea, por ejemplo deficiencia de ornitina descarboxilasa, citrulinemia, y argininosuccínico aciduria; errores innatos de aminoácidos y ácidos orgánicos tales como fenilcetonuria, tirosinemia hereditaria, y deficiencia de alfa1-antitripsina; y trastornos de coagulación, tales como deficiencia de factor VIII y IX. También se pueden usar las células para tratar trastornos hepáticos adquiridos debido a infecciones víricas. También se pueden usar las células de la presente invención en aplicaciones *ex vivo* tales como para generar un hígado artificial (parecido a diálisis renal), para producir factores de coagulación y para producir proteínas o enzimas generadas por el epitelio hepático.

También se pueden usar las células de la presente invención en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos biliares tales como cirrosis biliar y atresia biliar.

También se pueden usar las células epiteliales de la presente invención en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos pancreáticos tales como atresia pancreática, inflamación de páncreas y deficiencia de alfa1-antitripsina. Además, como se puede producir epitelio pancreático a partir de células de la presente invención, y como pueden producirse células neurales, pueden generarse células beta. Estas células pueden usarse para el tratamiento de la diabetes (implante subcutáneo o implante intrapancreático o intrahepático).

Además, se pueden usar las células de la presente invención en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos del epitelio intestinal tales como atresia intestinal, trastornos inflamatorios del intestino, infartos intestinales y resección intestinal.

5 Además, las células de la presente invención también se pueden usar en tratamiento de reemplazo celular y/o tratamiento génico para tratar o aliviar síntomas de trastornos cutáneos tales como alopecia, defectos cutáneos tales como heridas por quemaduras y albinismo.

Ejemplo 8: Perfil génico expresado de MASC. cartílago y hueso

10 Usando ensayos de ADNc Clontech e Invitrogen, los inventores evaluaron el perfil génico expresado de MASC humanas cultivadas a densidades de siembra de $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ para 22 y 26 divisiones celulares. Además, los inventores evaluaron los cambios en la expresión génica cuando se indujo la diferenciación de las MASC en cartílago y hueso durante 2 días.

- Las MASC no expresan CD31, CD36, CD62E, CD62P, CD44-H, cKit, Tie, receptores para IL1, IL3, IL6, IL11, G-CSF, GM-CSF, Epo, Flt3-L, o CNTF, y bajos niveles de ARNm de HLA-clase-I, CD44-E y Muc-18.
- Las MASC expresan ARNm para las citocinas BMP1, BMP5, VEGF, HGF, KGF, MCP1; los receptores de citocina F1k1, EGF-R, PDGF-R1a, gp130, LIF-R, activina-R1 y R2, TGFR-2, BMP-R1A; los receptores de adhesión CD49c, CD49d, CD29; y CD10.
- Las MASC expresan ARNm para hTERT, oct-4, sox-2, sox-11, sox-9, hoxa4, -5, -9, D1x4, MSX1, PDX1
- Tanto el cartílago como el hueso perdieron/redujeron la expresión de oct-4, sox-2, Hoxa4, 5, 9; D1x4, PDX1, hTERT, TRF1, ciclinas, cdk, sindecano-4; distroglicano, integrina $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, FLK1, LIF-R, RAR- α , RAR γ , EGF-R, PDGF-R1a y -B, TGF-R1 y -2, BMP-R1A, BMP1 y 4, HGF, KGF, MCP1
- La diferenciación de osteoblastos se asoció con la adquisición de/aumento de la expresión de Hox7, hox11, sox22, cdk, sindecano-4, decorina, lumicano, fibronectina, sialoproteína ósea, TIMP-1, CD44, $\beta 8$, integrina $\beta 5$, PTHr-P, Leptina-R, VitD3-R, FGF-R3, FGF-R2, Estrógeno-R, wnt-7a, VEGF-C, BMP2
- La diferenciación de cartílago se asoció con la adquisición de Sox-9, FREAC, hox-11, hox7, CART1, Notch3, cdk, colágeno II, fibronectina, decorina, glicoproteína de cartílago, proteína de la matriz oligomérica de cartílago, MMP y TIMP, N-cadherina, CD44, integrina α y $\alpha 6$, VitD3-R, BMP2, BMP7

Ejemplo 9 Caracterización de genes expresados diferencialmente en MASC frente a osteoblastos mediante hibridación sustractiva

30 Los inventores de la presente invención usaron un enfoque de sustracción para identificar diferencias genéticas entre MASC no diferenciadas y progenie asignada. Se extrajo ARNm de Poli-A de MASC no diferenciadas y se indujo la diferenciación de las células en el linaje de osteoblastos durante 2 días. Se realizó la sustracción y la amplificación de los ADNc expresados diferencialmente usando el kit PCR-Select de Clontech, con la recomendación del fabricante sin modificación. Se analizaron las secuencias génicas expresadas en los cultivos de osteoblastos de 2 días, pero no las de las MASC no diferenciadas.

35 Se secuenciaron ochenta y seis secuencias de ADNc expresadas diferencialmente. Se confirmó por Northern que los ARNm estaban de hecho expresados específicamente en progenitores de osteoblastos de 2 días y no en MASC. Se compararon las secuencias (usando el algoritmo BLAST) para las siguientes bases de datos: colecciones de proteínas y nucleótidos SwissProt, GenBank, EST, contigs. de EST murina y humana.

40 Se categorizaron las secuencias por homología: 8 son factores de transcripción, 20 están implicadas en el metabolismo celular; 5 en reparación de cromatina; 4 en la vía de apoptosis; 8 en la función mitocondrial; 14 son receptores de adhesión / componentes de ECM; 19 son secuencias de EST publicadas con función desconocida y 8 son novedosas.

45 Para 2 de las secuencias novedosas, se realizó Q-RT-PCR sobre MASC en la que se indujo la diferenciación en hueso durante 12 h, 24 h, 2 días, 4 días, 7 días y 14 días a partir de 3 donantes individuales. Se expresaron los genes durante don 2 y 4 días iniciales de diferenciación respectivamente, y después se regularon por disminución.

Los genes presentes en MASC no diferenciadas, pero que no eran osteoblastos de 2 días, también se analizaron. Se han secuenciado treinta genes expresados diferencialmente y 5 de ellos son secuencias EST o secuencias desconocidas. La presencia de estos en genes en MASC pero no en osteoblastos de 2 días se confirma por transferencia Northern.

Ejemplo 10. Injerto de MASC

55 Se iniciaron estudios para examinar si las MASC se injertan y persisten *in vivo*. Se inyectaron MASC eGFP⁺ por vía intramuscular en ratones NOD-SCID. Se sacrificaron los animales 4 semanas después y se examinó el músculo para determinar si, como se ha descrito para células ES humanas, se desarrollan teratomas. En 5/5 de los animales, no se observaron teratomas. Se detectaron células positivas para eGFP. Asimismo, se infundieron MASC IV eGFP⁺ por vía intrauterina en ratones SCID fetales. Se evaluaron los animales inmediatamente después del nacimiento. El análisis por PCR demostró la presencia de células eGFP⁺ en el corazón, el pulmón, el hígado, el bazo y la médula.

Cuando se trasplantan MASC estereotáxicamente en el cerebro intacto o en el cerebro infartado de ratas, adquieren un fenotipo compatible con células neuronales, y persisten durante al menos 6 semanas. Estos estudios muestran que las MASC humanas pueden injertarse *in vivo* y diferenciarse en forma de un órgano específico sin evolucionar hacia teratomas.

- 5 Los estudios también muestran que las MASC son claramente diferentes de las células madre embrionarias o células germinales. Las MASC representan una nueva clase de células madre multipotentes que puede obtenerse de múltiples órganos de adultos y niños.

Ejemplo 11: Demostración de la capacidad para seleccionar, expandir y caracterizar MASC de origen murino.

Se pueden generar MASC de médula de ratón y se pueden presentar en órganos aparte de la médula.

10 **1. Identificación de MASC en médula de ratón**

Los investigadores seleccionaron MASC de médula de ratón. Se obtuvo médula de ratones C57/BL6 y se plaquearon células mononucleares o células deplecionadas de células positivas para CD45 y GlyA (n=6) bajo las mismas condiciones de cultivo usadas para MASC humanas (10 ng/ml de PDGF-BB y EGF humana). Cuando se plaquearon las células mononucleares de médula, se deplecionaron células CD45⁺ 14 días después del inicio de cultivo para retirar las células hemopoyéticas. Como para MASC humanas, se sembraron los cultivos a 2.000 células/cm² cada 2 divisiones celulares.

Al contrario de lo que se observó con células humanas, cuando se plaquearon células mononucleares de médula murina deplecionadas el día 0 de células CD45⁺ en el cultivo de MASC, no se observó crecimiento. Cuando se plaquearon células mononucleares de médula murina, y se cultivaron células 14 días después de la depleción de células CD45⁺, aparecieron células con la morfología y el fenotipo similares a las de MASC humanas. Esto sugiere que se pueden necesitar factores secretados por células hematopoyéticas para soportar el crecimiento inicial de MASC murinas. Cuando se cultivaron con PDGF-BB y EGF solo, la división celular fue lenta (>6 días) y no se pudieron mantener los cultivos por encima de 10 divisiones celulares. La adición de 10 ng/ml de LIF mejoró el crecimiento celular y se han obtenido > 70 divisiones celulares. Cuando se cultivó sobre laminina, colágeno de tipo IV o matrigel, se observó crecimiento celular, pero las células fueron positivas para CD44+ y HLA-clase-I. Al igual que las células humanas, las MASC de C57/BL6 cultivadas con LIF sobre placas recubiertas con fibronectina son negativas para CD44 y HLA-clase-I, positivas en tinción con SSEA-4, y expresan transcritos para oct-4, LIF-R y sox-2.

Se puede inducir MASC derivadas de médula de ratón para diferenciarse en células del músculo cardíaco, células de endotelio y neuroectodérmicas usando procedimientos también usados para inducir diferenciación de MASC humanas. Por lo tanto, las MASC derivadas de médula de ratón C57B16 son equivalentes a las obtenidas de médula humana.

2. Las MASC están presentes en tejidos distintos de médula

Los inventores examinaron si las MASC están presentes en otros órganos tales como hígado y cerebro. Se plaquearon células mononucleares de médula, cerebro o hígado mononuclear a partir de ratones FVB/N de 5 días de vida, disociadas con colagenasa y tripsina, en cultivos de MASC con EGF, PDGF-BB y LIF sobre fibronectina. 14 días después, se retiraron las células CD45⁺ y se mantuvieron las células en condiciones de cultivo de MASC, como se ha descrito anteriormente. Las células con morfología similar a la de la MASC humana y MASC murina derivada de médula de ratones C57B16 crecieron en cultivos iniciados con células de médula, cerebro o hígado. Las células expresaron ARNm de oct-4. Los inventores también examinaron ratones transgénicos para un gen de eGFP promotora de oct-4. En estos animales, la expresión de eGFP se observa en células germinativas primigenias así como en células germinativas después del nacimiento. Como las MASC expresan oct-4, se sometió a prueba si las células positivas para eGFP se podían encontrar en la médula, el cerebro y el hígado de estos animales después del nacimiento. Se clasificaron células eGFP⁺ (1 % de la población más brillante) de médula, cerebro e hígado de ratones de 5 días de vida. Cuando se evaluó por microscopía de fluorescencia, <1 % de las células clasificadas a partir de cerebro y médula fueron eGFP⁺. Se pudo detectar ARNm de oct-4 por Q-RT-PCR en la población clasificada. Se han plaqueado células clasificadas bajo condiciones que soportan las MASC murinas (pocillos recubiertos de fibronectina con EGF, PDGF, LIF). Las células sobrevivieron pero no se expandieron. Cuando se transfirieron a fibroblastos embrionarios murinos, se observó crecimiento celular. Cuando se transfirieron posteriormente a cultivos de MASC, se obtuvieron células con morfología y fenotipo similares a los de las MASC derivadas usando selección de MASC clásica y procedimientos de cultivo de médula humana o de médula de ratones C57/B16 o FVB/N.

Referencias

1. Thomson J, Kalishman J, Golos T, Durning M, Harris C, Becker R; Hearn J: Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 92:7844-8,1995
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell

- lines derived from human blastocysts. *Science* 282:114-114, 1998
3. Shambloott M, Axelman J, Wang S, Bugg E, Littlefield J, Donovan P, Blumenthal P, Huggins G, Gearhart J: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13726-31, 1998
- 5 4. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-7, 1988
5. Orkin S: Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol* 42:927-34, 1998
- 10 6. Weissman IL: Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287:1442-6, 2000
7. Gage FH: Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 287:1433-1438., 2000
8. Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T: Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Path* 9:499-513, 1999
- 15 9. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59:89-102, 1996
10. Potten C: Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-30, 1998
11. Watt F: Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:831, 1997
- 20 12. Alison M, Sarraf C: Hepatic stem cells. *J Hepatol* 29:678-83, 1998
13. Haynesworth SE, Barber MA, Caplan IA: Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13:69-80, 1992
14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999
- 25 15. Gronthos S, Zannettino AC, Graves S, Ohta S, Hay SJ, Simmon PJ: Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14:47-56, 1999
16. Prockop D: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-4, 1997
- 30 17. Jackson K, Mi T, Goodell MA: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14482-6, 1999
18. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:528-30, 1998
19. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C, Buzney E, Khan M, Flint A, Kunkel L, Mulligan R: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-4, 1999
- 35 20. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8, 1999
21. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP: Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71-7,2000
- 40 22. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170, 1999
23. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS: Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-40, 2000
- 45 24. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32:11-6, 2000
25. Frankel MS: In Search of Stem Cell Policy. *Science* 298:1397., 2000

26. Greider C: Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr Biol* 8:178-81, 1998
27. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotech* 18:399-404, 2000
- 5 28. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A: Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-91, 1998
29. Rosfjord E, Rizzino A: The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1795-802, 1997
- 10 30. Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y: Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18:1866-78, 1998
31. Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, Pearl G, Healy C, Scotting PJ, Sharpe PT: Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox1 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* 49:23-36, 1995
- 15 32. Baum C, Weissman I, Tsukamoto A, Buckle A, Peault B: Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2804, 1992
33. Jordan C, McKearn J, Lemischka I: Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* 61:953-963, 1990
34. Bhatia M, Wang J, Knapp U, Bonnet D, Dick J: Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5320, 1997
- 20 35. Goodell M, Rosenzweig M, Kim H, Marks D, DeMaria M, Paradis G, Grupp S, Sieff C, Mulligan R, Johnson R: Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of 34 antigen exist in multiple species. *Nature Medicine* 3:1337-1345, 1997
- 25 36. Zijlmans JM, Visser JW, Kleiverda K, Kluin PM, Willemze R, Fibbe WE: Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8901-8905, 1995
37. Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, Ivanova N, Mahan MA, Deanehan JK, Moore KA, Overton GC, Lemischka IR: The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 288:1635-40, 2000
38. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634-8, 1981
- 30 39. Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J: Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 52:212-9, 1984
- 40 40. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB, Solter D: Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J* 2:2355-61, 1983
- 35 41. Scholer HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P: A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8:2543-50, 1989
42. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L: Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9:2635-45, 1995
- 40 43. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM: A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345:686-92, 1990
44. Pikarsky E, Sharir H, Ben-Shushan E, Bergman Y: Retinoic acid represses Oct-3/4 gene expression through several retinoic acid-responsive elements located in the promoter-enhancer region. *Mol Cell Biol* 14:1026-38, 1994
- 45 45. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG: Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6, 2000
46. Cooke JE, Godin I, French-Constant C, Heasman J, Wylie CC: Culture and manipulation of primordial germ cells. *Methods Enzymol* 255:37-58, 1993
47. Hodes RJ: Telomere length, aging, and somatic cell turnover. *J Exper Med* 190:153-156, 1999
48. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G: A common precursor for hematopoietic and en-

- dothelial cells. *Development* 125:725-732, 1998
49. Medvinsky A, Dzierzak E: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86:897, 1996
50. Yoder M, Hiatt K, Mukherjee P: In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6776, 1997
51. Spangrude G, Heimfeld S, Weissman I: Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58, 1988
52. Tricot G, Gazitt Y, Leemhuis T, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Fassas A, Tindle S, Nelson J, Juttner C, Tsukamoto A, Hallagan J, Atkinson K, Reading C, Hoffman R, Barlogie B: Collection, tumor contamination, and engraftment kinetics of highly purified hematopoietic progenitor cells to support high dose therapy in multiple myeloma. *Blood* 91:4489-95, 1998
53. Gothot A, Pyatt R, McMahan J, Rice S, Srour EF: Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0/G1 phase of the cell cycle. *Blood* 90:4384-4393, 1997
54. Goodell M, Brose K, Paradis G, Conner A, Mulligan R: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183:1797-1806, 1996
55. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 24:1632-1639, 1988
56. Moore KA, Hideo E, Lemischka IR: In vitro maintenance of highly purified transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89:4337-437, 1997
57. Fraser C, Szilvassy S, Eaves C, Humphries R: Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells culture at limiting dilution on supportive marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1968-1972, 1992
58. McKay R: Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71, 1997
59. Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE: Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neuronal cells. *J Comp Neurol* 400:469-486, 1998
60. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH: The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404, 1997
61. Lois C, Alvarez-Buylla A: Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-7, 1993
62. Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA: In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 5:271-7, 2000
63. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *1998* 96:25-34, 1999
64. Fridenshtein A: Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* 44:3-11, 1982
65. Wakitani S, Saito T, Caplan A: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1417-26:18, 1995
66. Gronthos S, Graves S, Ohta S, Simmons P: The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164-73, 1994
67. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *roc Natl Acad Sci U S A* 97:3213-8, 2000
68. Yui J, Chiu C, Lansdorp P: Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood* 91:91(9):3255-62, 1998
69. Bjornson C, Rietze R, Reynolds B, Magli M, Vescovi A: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *science* 283:354-7, 1999
70. Almeida Porada G, Crapnell H, Porada C, Benoit H, Quesenberry P, Zanjani ED: In vivo hematopoietic potential of human neuronal stem cells. *Exp Hematol* 28, Supplement 1:61 (abstract), 2000
71. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J: Generalized

- potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660-3, 2000
72. Rideout WM, 3rd., Wakayama T, Wutz A, Eggan K, Jackson-Grusby L, Dausman J, Yanagimachi R, Jaenisch R: Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet* 24:109-10, 2000
- 5 73. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-3, 1997
74. Tsonis PA: Regeneration in vertebrates. *Dev Biol* 221 :273-84, 2000
75. Lemischka I: The power of stem cells reconsidered? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1493-5, 1999
76. Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C: Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126:1655-64, 1999
- 10 77. Keller G, Snodgrass HR: Human embryonic stem cells: the future is now. *Nat Med* 5:151-152, 1999
78. Lefebvre V, de Crombrughe B: Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* 16:529-40, 1998
79. Yoshida K, Chambers I, Nichols J, Smith A, Saito M, Yasukawa K, Shoyab M, Taga T, Kishimoto T: Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev* 45:163-71, 1994
- 15 80. Ma YG, Rosfjord E, Huebert C, Wilder P, Tiesman J, Kelly D, Rizzino A: Transcriptional regulation of the murine k-FGF gene in embryonic cell lines. *Dev Biol* 154:45-54, 1992
81. Anderson R, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C: The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* 91:61-8, 2000
- 20 82. Gerstenfeld LC, Shapiro FD: Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 62: 1-9, 1996
83. Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R: Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 16:207-16, 1998
- 25 84. Cai RL: Human CART1, a paired-class homeodomain protein, activates transcription through palindromic binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 250:305-11, 1998
85. Dietz UH, Sandell LJ: Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem* 271:3311-6, 1996
- 30 86. Konieczny SF, Emerson CPJr: Differentiation, not determination, regulates muscle gene activation: transfection of troponin I genes into multipotential and muscle lineages of 10T1/2 cells. *Mol Cell Biol* 5:2423-32, 1985
87. Dinsmore J, Ratliff J, Deacon T, Pakzaban P, Jacoby D, Galpern W, Isacson O: Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 5:131-143, 1996
- 35 88. Chen J, Goldhamer D: Transcriptional mechanisms regulating MyoD expression in the mouse. *Cell Tissue Res* 296:213-9, 1999
89. Wasserman S: FH proteins as cytoskeletal organizers. *Cell Biology* 8:111-115, 1998
90. Mesnard L, Samson F, Espinasse I, Durand J, Neveux JY, Mercadier JJ: Molecular cloning and developmental expression of human cardiac troponin T. *FEBS Lett* 328:139-44, 1993
- 40 91. Doumit ME, Merkel RA: Conditions for isolation and culture of porcine myogenic satellite cells. *Tissue Cell* 24: 253-62, 1992
92. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA: PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 141: 805-14, 1998
- 45 93. Miano J, Cserjesi P, Ligon K, Periasamy M, Olson E: Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ Res* 75:803-12, 1994
94. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz

- WM: Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29:1525-39, 1998
95. Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T: GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-84, 1994
- 5 96. Bhavsar PK, Dhoot GK, Cumming DV, Butler-Browne GS, Yacoub MH, Barton PJ: Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart. *FEBS Lett* 292:5-8, 1991
97. Forssmann W, Richter R, Meyer M: The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol* 110:335-57, 1998
- 10 98. Punzel M, Wissink S, Miller J, Moore K, Lemischka I, Verfaillie C: The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *blood* 93:3750-6, 1999
99. Thiemann FT, Moore KA, Smogorzewska EM, Lemischka IR, Crooks GM: The murine stromal cell line AFT024 acts specifically on human CD34+CD38- progenitors to maintain primitive function and immunophenotype in vitro. *Exp Hematol* 26:612-619, 1998
- 15 100. Rosenberg JB, Foster PA, Kaufman RJ, Vokac EA, Moussalli M, Kroner PA, Montgomery RR: Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. *J Clin Invest* 101:613-24, 1998
101. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky L: Global vascular expression of murine CD34 a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84:2554, 1994
- 20 102. Hamagushi I, Huang XL, Takakura N, Tada J, Yamagushi Y, Kodama H, Suda T: In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* 93:1549-1556, 1999
103. Shalaby F, Ho J, Stanford W, Fischer K, Schuh A, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J: A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89:981-90, 1997
104. Newman P: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99:3, 1997
105. Tedder T, Steeber D, Chen A, Engel P: The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9:866, 1995
- 25 106. Nishikawa S, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125:1747-57, 1998
107. Belaoussoff M, Farrington SM, Baron MH: Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development* 125:5009-18, 1998
- 30 108. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA: Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16:7599-609, 1996
109. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH: FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 148:577-86, 1997
- 35 110. Ciccolini F, Svendsen CN: Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: Identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neuroscience* 18(19):7869-7880, 1998
111. Julien J, Mushynski W: Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61:1-23, 1998
112. Schaafsma H, Ramaekers F: Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: basic principles and diagnostic applications. *Pathol Annu* 29:21-62, 1994
- 40 113. Lazaro CA, Rhim JA, Yamada Y, Fausto N: Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res* 58:5514-22, 1998
114. Kiem H, Heyward P, Winkler A, Potter J, Allen J, Miller A, Andrew R: Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 90:4638-45, 1997
- 45 115. Nolte J, Dao M, Wells S, Smogorzewska E, Kohn D: Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2414-9, 1996
116. Huibregtse BA, Johnstone B, Goldberg VM, Caplan AI: Effect of age and sampling site on the chondro-oste-

- ogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Orthop Res* 18:18-24, 2000
117. Bandyopadhyay P, Ma X, Linehan-Stieers C, Kren B, Steer C: Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* :10163-72, 1999
- 5 118. Sielaff TD, Nyberg SL, Rollins MD, Hu MY, Amiot B, Lee A, Wu FJ, Hu WS, Cerra FB: Characterization of the three-compartment gel-entrapment porcine hepatocyte bioartificial liver. *Cell Biol Toxicol* 13:357-64, 1997
119. Peshwa MV, Wu FJ, Sharp HL, Cerra FB, Hu WS: Mechanistics of formation and ultrastructural evaluation of hepatocyte spheroids. *32:197-203*, 1996
- 10 120. Rogler LE: Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro. *Am J Pathol* 150: 591-602, 1997
121. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK: Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 132:1133-49, 1996
- 15 122. Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzewska EM, Crooks GM: Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* 88:3306-3313, 1996
123. Visser JW, Bol SJ, van den Engh G: Characterization and enrichment of murine hemopoietic stem cells by fluorescence activated cell sorting. *Exp Hematol* 9:644-55, 1981
124. Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF: Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 92: 2641-9, 1998
- 20 125. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98:216-24, 1996
126. Kipriyanov SM, Little M: Generation of recombinant antibodies. *Mol Biotechnol* 12:173-201, 1999
127. Shinohara N, Demura T, Fukuda H: Isolation of a vascular cell wall-specific monoclonal antibody recognizing a cell polarity by using a phage display subtraction method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2585-90, 2000
- 25 128. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson JJ, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO: The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83-7, 1999
129. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Biotech* 24:236-44, 2000
- 30 130. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson JJ, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-11, 2000
- 35 131. Diehn M, Eisen MB, Botstein D, Brown PO: Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Biotech* 25:58-62, 2000
132. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM: High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 18:457-9, 2000
- 40 133. Somia NV, Schmitt MJ, Vetter DE, Van Antwerp D, Heinemann SF, Verma IM: LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12667-72, 1999
134. Elefanty AG, Begley CG, Metcalf D, Barnett L, Kontgen F, Robb L: Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11897-902, 1998
- 45 135. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner J: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964-72, 1999
136. Robbins P, Skelton D, Yu X, Halene S, Leonard E, Kohn D: Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95:10182-87, 1998

137. Case S, Price M, Jordan C, Yu X, Wang L, Bauer G, Haas D, Xu D, Stripecke R, Naldini L, Kohn D, Crooks G: Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2988-93, 1999
- 5 138. Uchida N, Sutton R, Frier A, He D, Reitsma M, Chang W, Veres G, Scollay R, IL. W: HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11939-44, 1998
139. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T: Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5:434-8, 1999
- 10 140. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ: Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72:570-85, 1999
141. Svendsen CN, Skepper J, Rosser AE, ter Borg MG, Tyres P, Ryken T: Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 99:253-8, 1997
- 15 142. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL: In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3120-5, 1999
143. Homer PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH: Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218-28, 2000
144. Randall TD, Weissman IL: Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* 89:3596-606, 1997

20

REIVINDICACIONES

1. Una célula de línea celular no germinativa, no embrionaria, multipotente humana aislada, en la que la célula expresa los factores de transcripción oct 4, REX-1 y ROX-1 y en la que se puede inducir la célula para diferenciarse en tipos celulares de origen endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
- 5 2. La célula de la reivindicación 1,
 - (a) en la que el tipo de célula mesodérmica es osteoblasto, condrocito, adipocito, fibroblasto, estroma de la médula, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, endotelial, epitelial, hematopoyético u óseo; y/o
 - (b) en la que el tipo de célula ectodérmica es glial, neuronal u oligodendrocito.
3. La célula de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la célula se deriva de un órgano.
- 10 4. La célula de la reivindicación 3, en la que el órgano es médula, hígado o cerebro.
5. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en medicina.
6. La célula de la reivindicación 5, para su uso para corregir un proceso de enfermedad genética, enfermedad degenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad de almacenamiento metabólico, enfermedad neuronal o de cáncer o en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria.

15

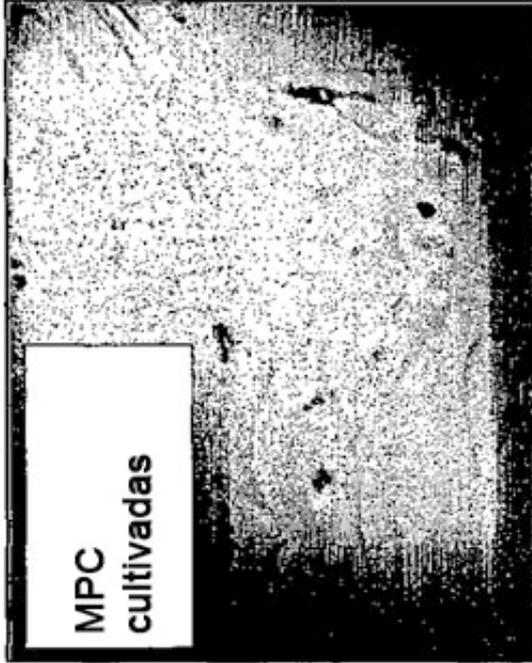


FIG. 1b

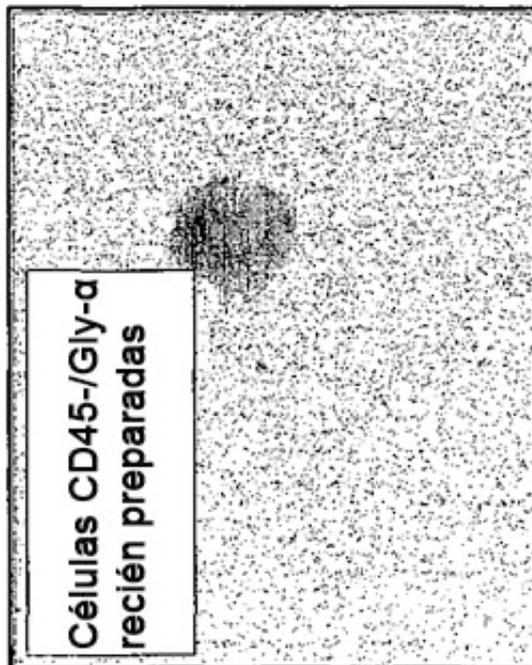


FIG. 1a

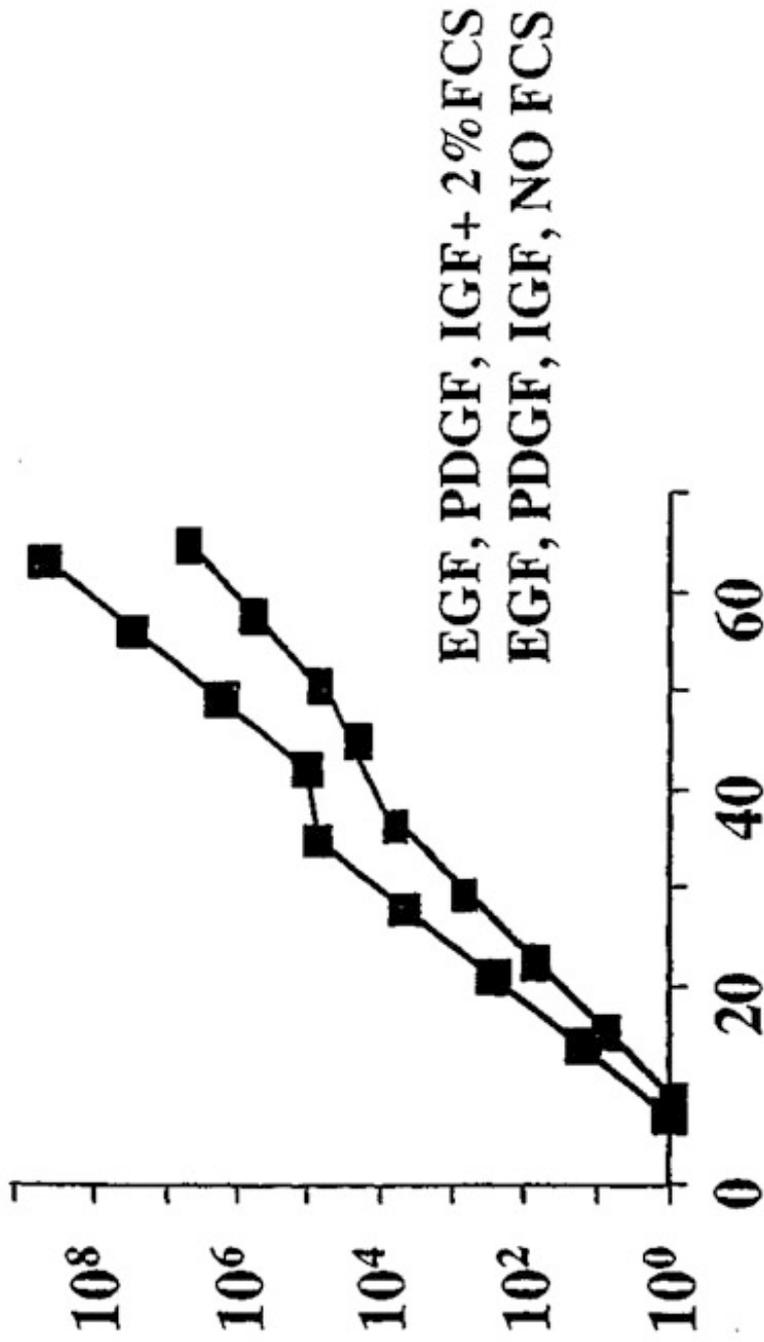


FIG. 2

Longitud de telómero de
MAPC cultivada

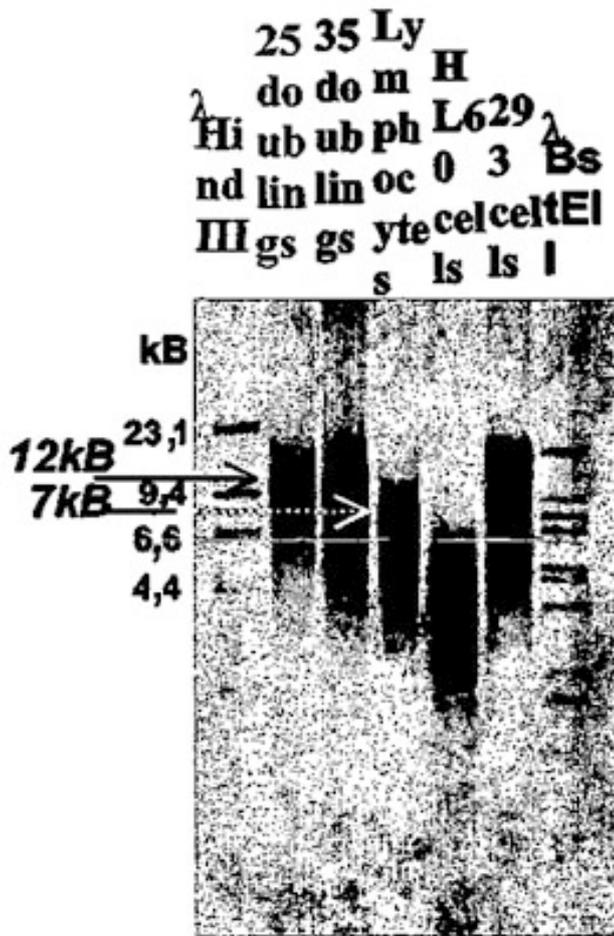


FIG. 3

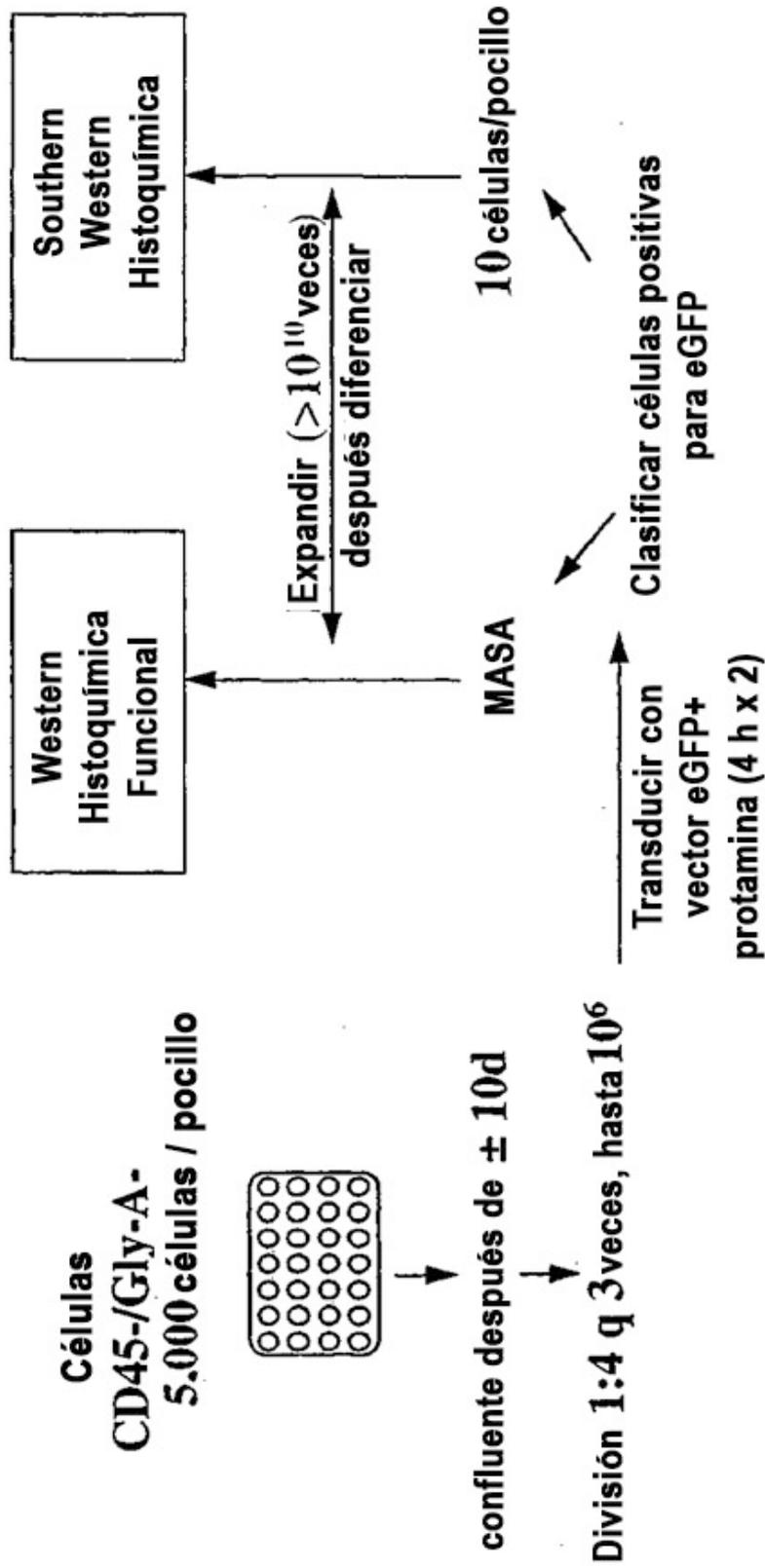


FIG. 4

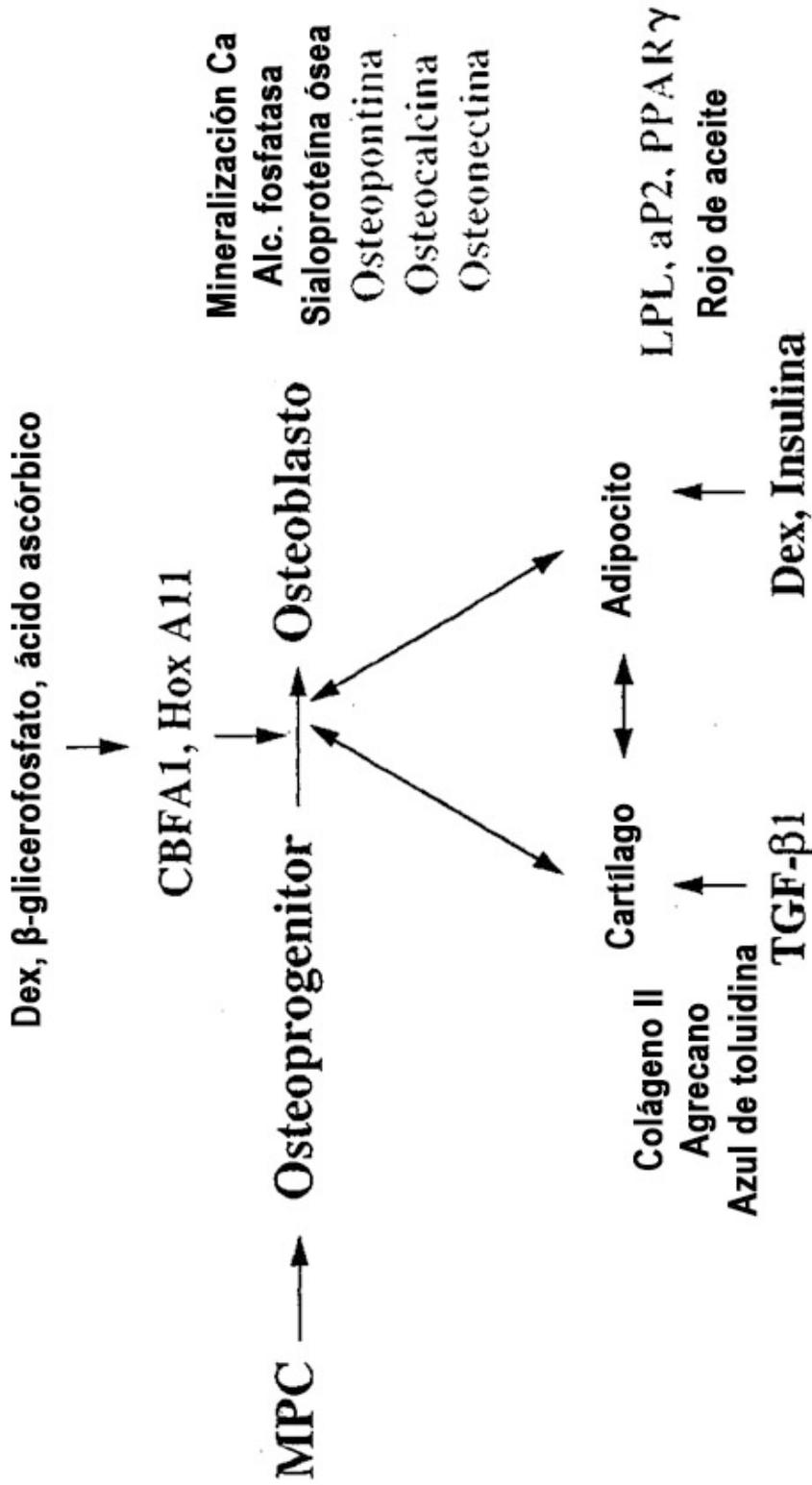
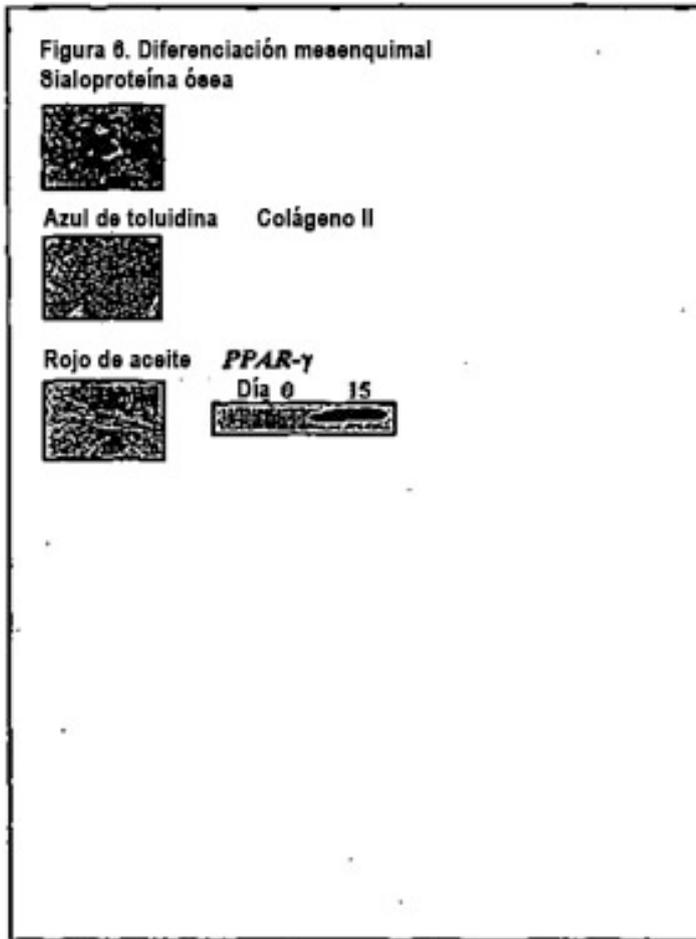
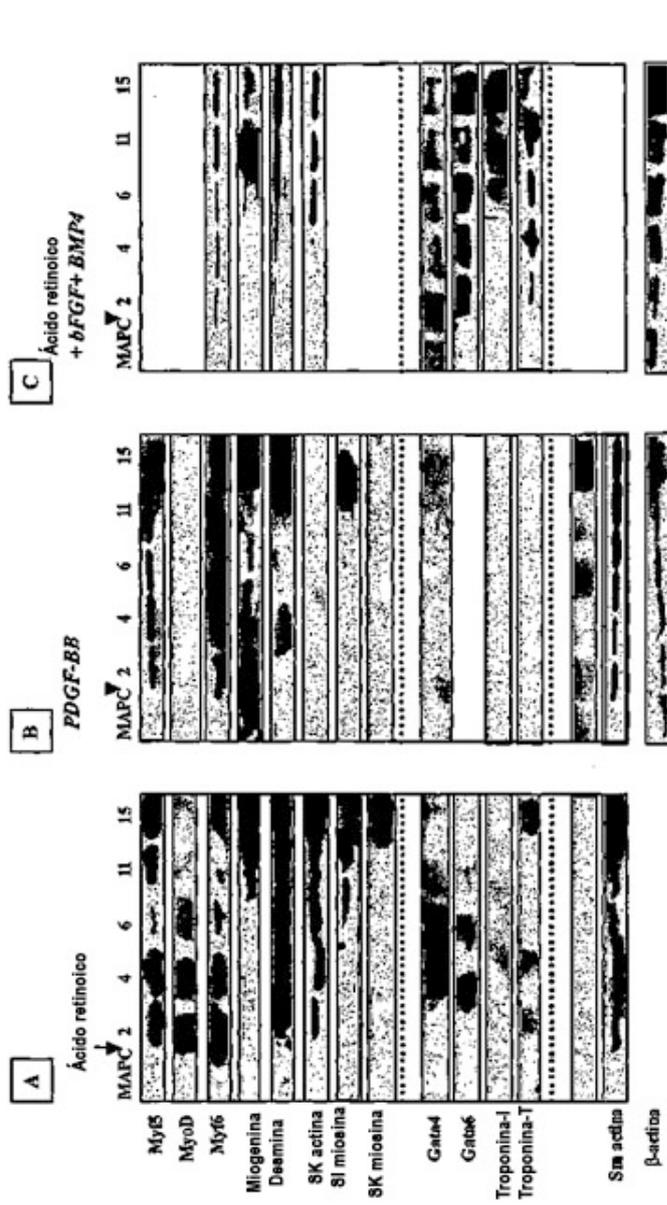


FIG. 5



DIFERENCIACIÓN DE MÚSCULO A PARTIR DE MASC



ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE MÚSCULO USADOS MOSTRADOS A LA DERECHA
 PANEL IZQUIERDO: DIFERENCIACIÓN DE MÚSCULO ESQUELÉTICO. PANEL DEL MEDIO: DIFERENCIACIÓN DE MÚSCULO LIISO,
 PANEL DERECHO: DIFERENCIACIÓN DE MÚSCULO CARDÍACO
 ETIQUETAS EN LA FIGURA: CÉLULAS NO DIFERENCIADAS, DÍAS DESPUÉS DE INDUCCIÓN CON AGENTES ENUMERADOS

FIG. 7

FORMACIÓN DE MIOTUBOS



**SE MARCARON LOS MIOTUBOS CON EL COLORANTE DE MEMBRANA PKH26 (ROJO).
LOS MIOBLASTOS SE DERIVARON DE MPC TRANSDUCIDAS DE eGFP (VERDE). SE
CULTIVARON CONJUNTAMENTE LAS CÉLULAS DURANTE 2 DÍAS Y DESPUÉS
SE EXAMINARON POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

FIG. 8

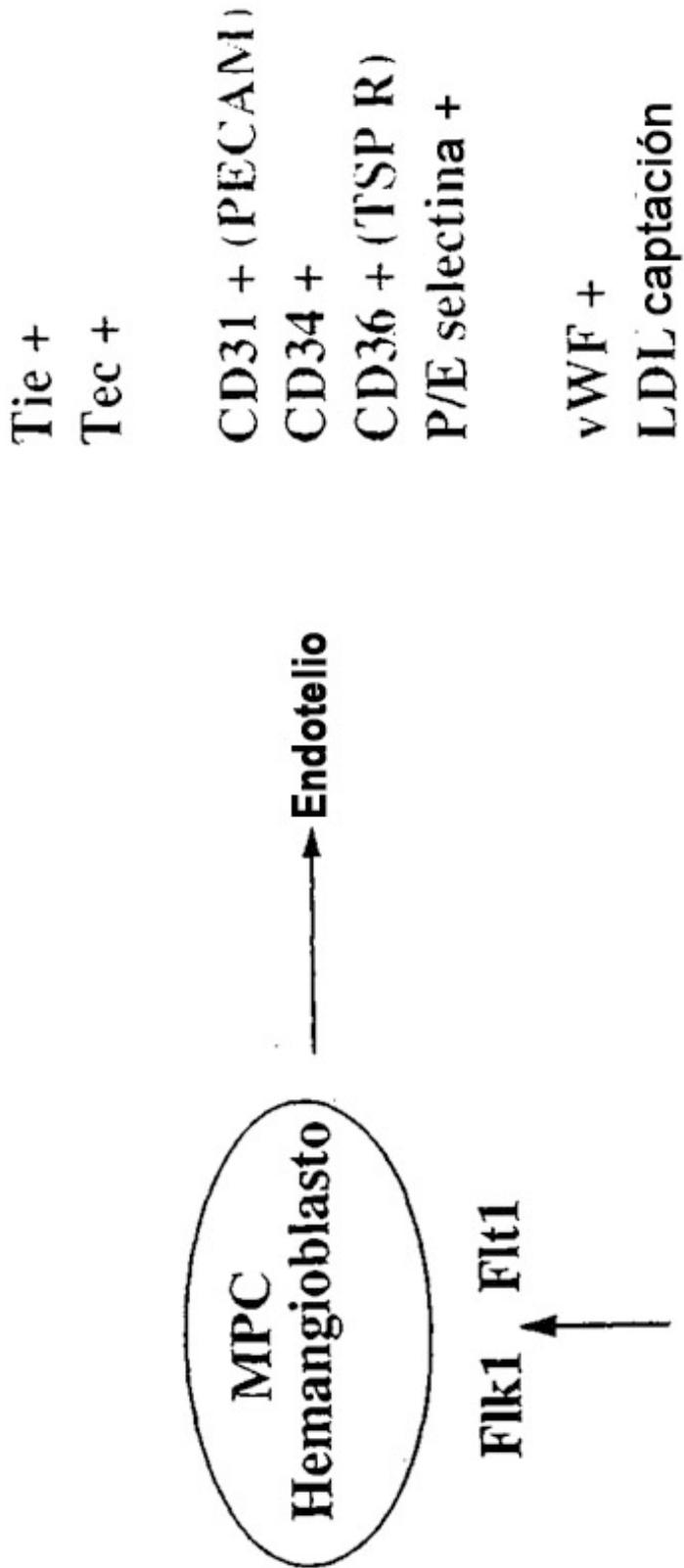
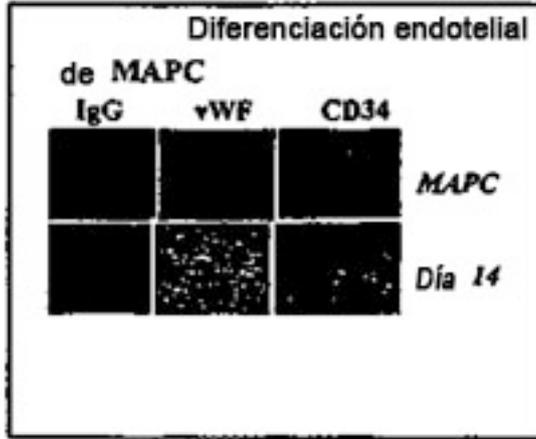


FIG. 9



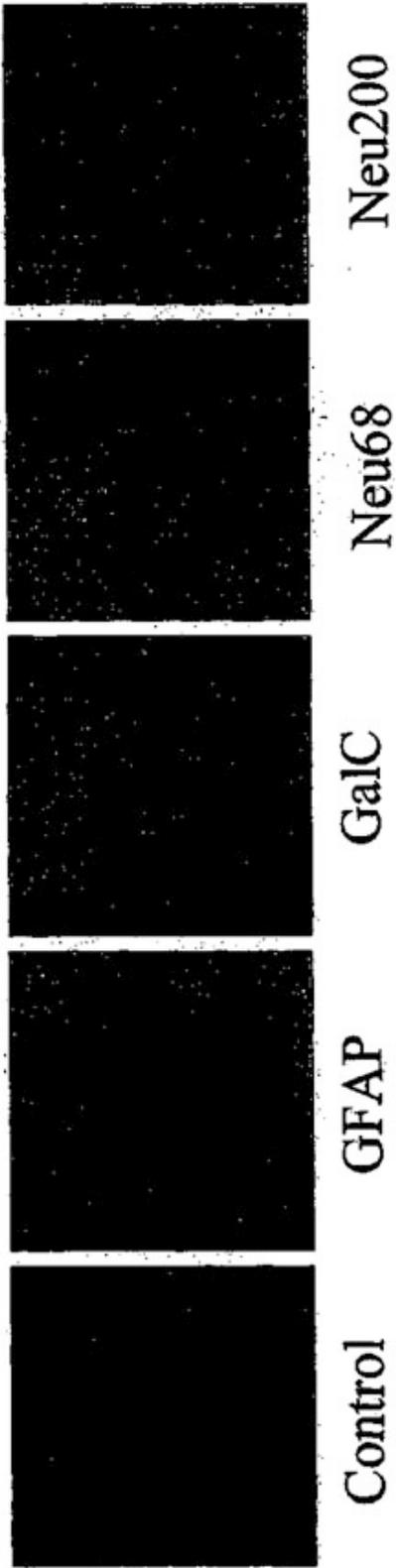


FIG. 11

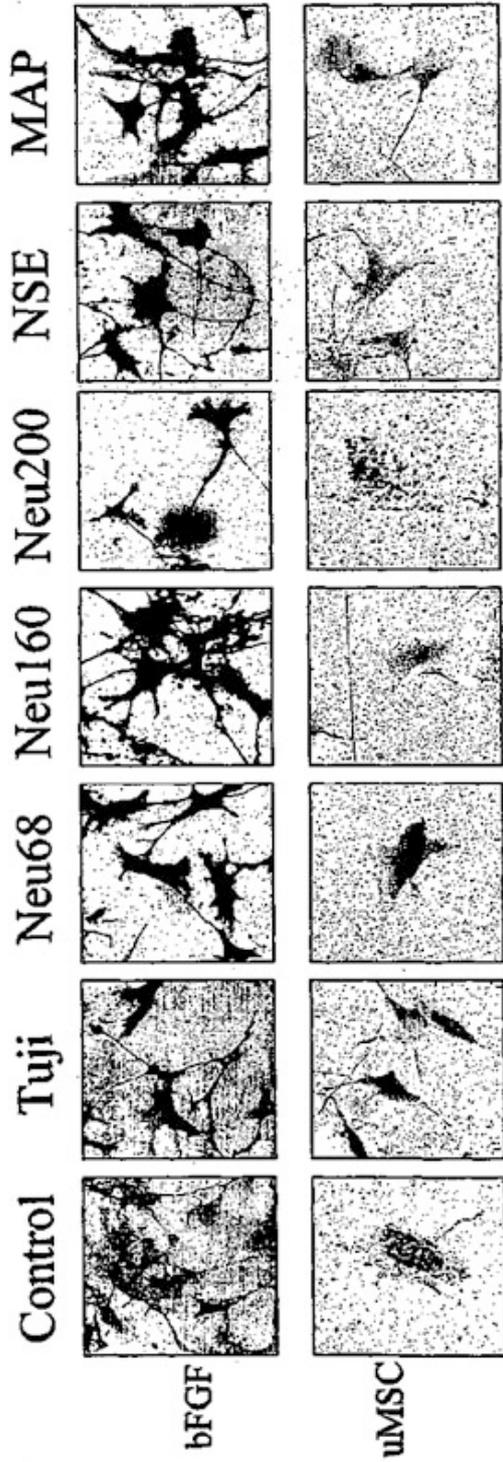


FIG. 12

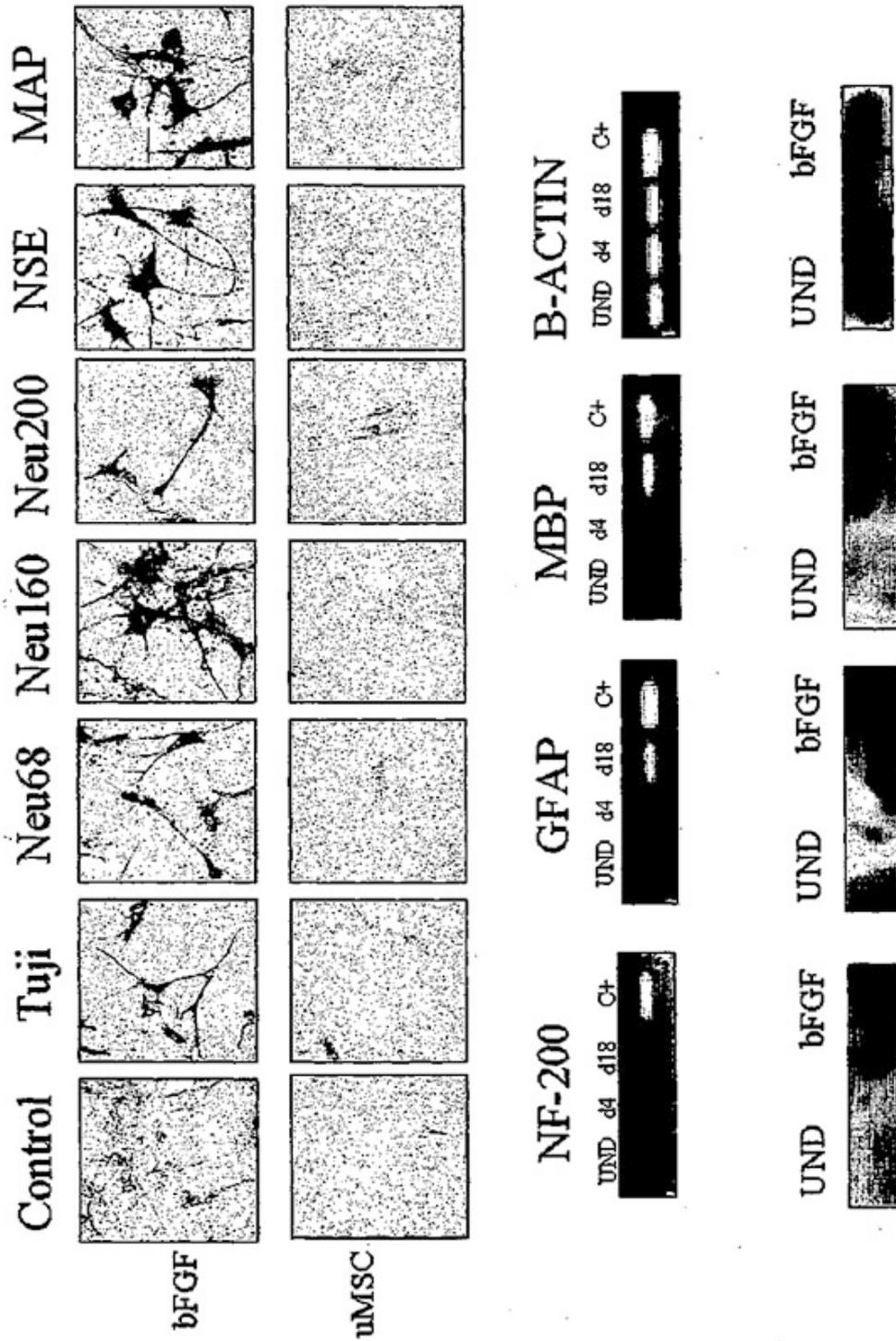


FIG. 13

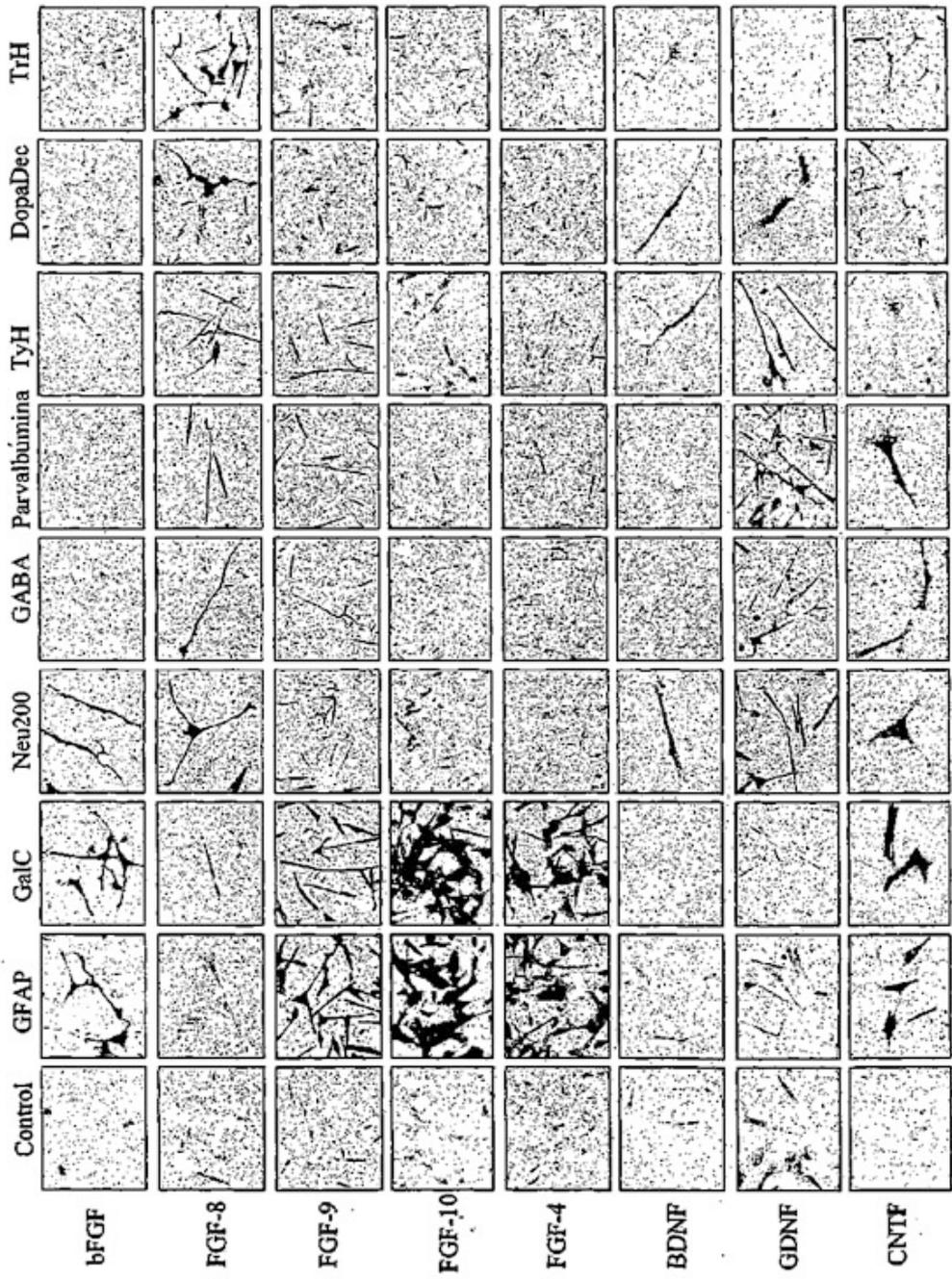
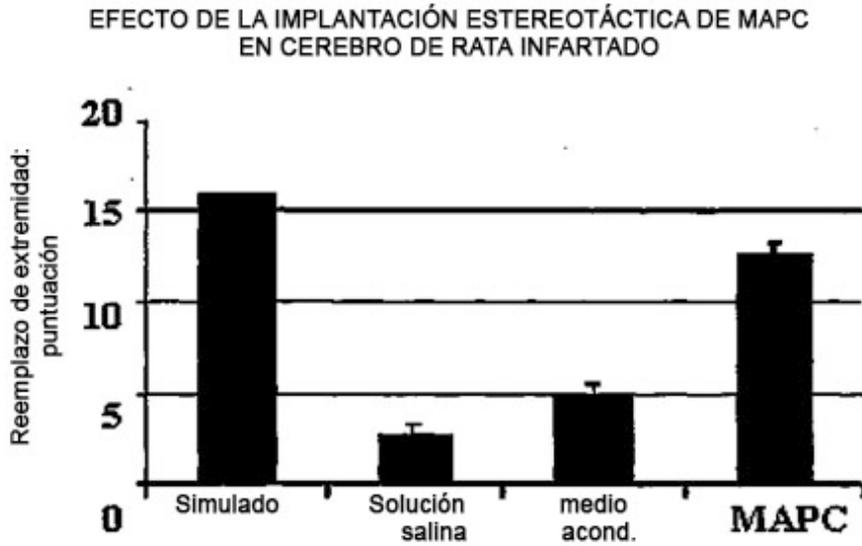


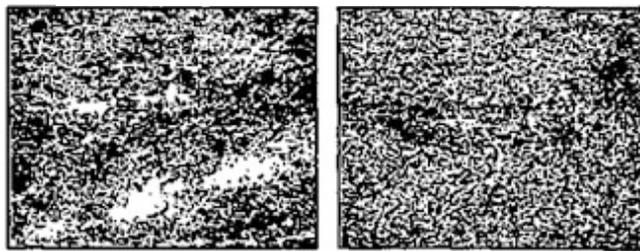
FIG. 14



SOMETIDO A PRUEBA 6 SEMANAS DESPUÉS DE INYECCIÓN ESTEREOTÁCTICA DE 50.000 MAPC

FIG. 15

EFFECTO DE IMPLANTACIÓN ESTEREOTÁCTICA DE MAPC EN CEREBRO DE RATA INFARTADA
2 SEMANAS 6 SEMANAS



2 Y 6 SEMANAS DESPUÉS DE INYECCIÓN ESTEREOTÁCTICA DE 50.000 MAPC CON TINCIÓN CON ANTICUERPO DE NESTINA ANTI-HUMANA

FIG. 16

DIFERENCIACIÓN EPITELIAL
DE MAPC

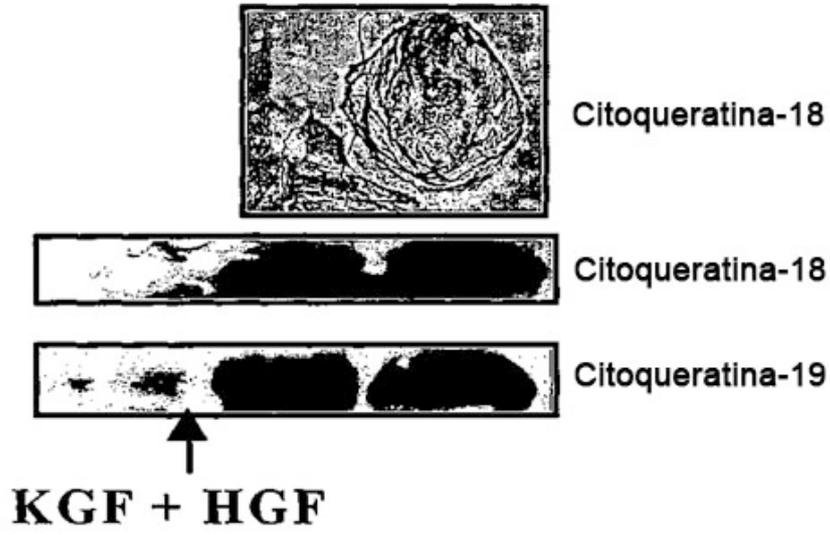


FIG. 17