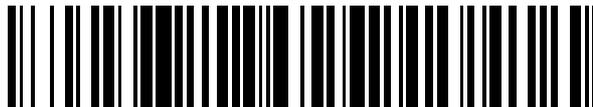


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 163**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/30** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03719290 .3**

96 Fecha de presentación: **24.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1576091**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Célula madre olfativa humana adulta**

30 Prioridad:

**28.01.2002 US 352906 P**

**29.03.2002 US 112658**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**05.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**05.12.2012**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
MED CENTER 3 201 E. JEFFERSON ST., STE 215  
LOUISVILLE, KY 40202, US**

72 Inventor/es:

**ROISEN, FRED J.;  
KLUEBER, KATHLEEN M. y  
LU, CHENGLIANG**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 392 163 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

Célula madre olfativa humana adulta

5 **[0001]** Los trasplantes de células madre han abierto un nuevo campo en la investigación de las enfermedades. Muchos opinan que las células madre son la clave capaz de desbloquear tratamientos para algunas de las enfermedades más devastadoras del mundo, entre ellas el cáncer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, las lesiones de la médula espinal y la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los beneficios y los éxitos de la investigación con células madre a menudo se ven oscurecidos por consideraciones morales y éticas debido a  
10 que las células madre más versátiles usadas en la investigación y los tratamientos proceden de embriones humanos o de tejidos de fetos abortivos. Estas cuestiones éticas a menudo se contrarrestan por la capacidad de las células madre para revolucionar la práctica de la medicina y mejorar la calidad y la duración de la vida. Las respuestas potenciales y los tratamientos que prometen las células madre han impulsado muchos esfuerzos de investigación, incluso en contra de las preocupaciones morales y éticas.

15 **[0002]** Inicialmente, se aislaron células madre pluripotentes y se desarrollaron a partir de dos fuentes: directamente de la masa celular interna de embriones humanos en la fase de blastocisto y a partir de tejido fetal obtenido de embarazos a término. Sin embargo con las importantes ventajas que se obtienen del uso de células madre, los investigadores han estado buscando una fuente de estas células, en adultos, que les permitiera eludir el debate ético asociado con el uso de células madre derivadas de embriones y tejidos fetales. No se han encontrado células madre multipotentes para todos los tipos de tejido adulto, pero los descubrimientos en este campo de investigación están en aumento. Por ejemplo, hasta fechas recientes, se pensaba que las células madre no estaban presentes en el sistema nervioso del adulto, pero en los últimos años se han aislado células madre neuronales de la los sistemas nerviosos de ratas y ratones adultos.

25 **[0003]** Mientras la posibilidad de obtener células madre de fuentes de tejidos adultos tiene visos de hacerse realidad, existen también algunas limitaciones importantes. En primer lugar, las células madre adultas están presentes a menudo sólo en cantidades minúsculas, son difíciles de aislar y de purificar, y su número puede disminuir con la edad. Además, aunque se han aislado células madre de diversas regiones del sistema nervioso central (SNC) adulto, no pueden extraerse de ninguno de estos lugares sin serias consecuencias para el donante (A. Gritti, y col., 1996; V.G. Kukekov, y col., 1997).  
30

**[0004]** Debido a las dificultades asociadas con la obtención de células madre de tejidos adultos, normalmente se han usado bulbos olfativos fetales y neonatales como fuente de células para trasplante en regiones del sistema nervioso. (Véase, por ejemplo, Njenga, M.K y M. Rodriguez, 1998; Rao, M.S., 1999; R. Tennent, y M.I. Chuah, 1996; Li, Y, y col., 2000). Por ejemplo, Archer y col. trasplantaron células gliales fetales en el SNC canino y mostraron que las células trasplantadas provocaban una remielinización a gran escala de células desmielinizadas y la supervivencia a largo plazo de estas células. Archer y col. compararon los resultados obtenidos por el trasplante de células fetales con los obtenidos mediante el trasplante de células adultas y encontraron que las células fetales eran  
40 más susceptibles de remielinización y sobrevivían durante más tiempo.

**[0005]** Otros investigadores han evitado el debate ético del uso de células madre embrionarias y fetales usando otras células y tejidos, y más específicamente usando tejido de bulbo olfativo adulto, aislado del encéfalo, para reparación de la médula espinal. Por ejemplo, Li y col. injertaron células envolventes del bulbo olfativo en una médula espinal dañada y facilitaron la regeneración de neuronas del tracto corticoespinal en la región del injerto (Li, Y., y col., 2000). Ramon-Cueto y col. han mostrado que las células envolventes del bulbo olfativo, extraídas del bulbo, ayudan a regenerar los axones de la médula espinal que atraviesan una distancia en la médula espinal (Ramon-Cueto y col., 1998). Doucette encontró que las células envolventes pueden adoptar varios roles diferentes cuando surge la necesidad. Específicamente son capaces de cambiar de fenotipo desde uno que se asemeja a un astrocito al de una célula de Schwann mielinizante (R. Doucette, 1995).  
50

**[0006]** La singular capacidad regeneradora del neuroepitelio olfativo (NeO), presente en la cavidad nasal, ha sido bien documentada en numerosos informes. La presencia de una población de células madre en NeO con la capacidad de producir neuronas y sus células envolventes y de soporte es bien conocida (A.L. Calof, y col., 1998).  
55 Aun así, la dificultad no ha residido en saber dónde están las células madre adultas sino en localizar y aislar en la práctica las células madre adultas, y en mantenerlas en un estado activo mitóticamente. Otros han establecido cultivos de células madre viables a partir de diversas fuentes que incluyen ratones embrionarios (A.L. Calof y col., 1989, 1998), ratas embrionarias (A. Kalyani, y col., 1997; T. Mujaba y col., 1998; M.S. Rao y col., 1998; y L.S. Shihabuddin y col., 1997) y ratones y ratas neonatales (N.K. Mahanthappa y col., 1993; J.K. McEntire y col., 2000; S.K. Pixley, 1992, 1994; y M. Satoh y M. Takeuchi, 1995). Los cultivos de ratones y ratas adultos (A.L. Calof, y col., 1998, 1989; F. Feron, y col., 1999; A. Gritti, y col., 1996; E.D. Laywell, y col., 1999; N. Liu, y col., 1998; K.P.A. Mac Donald, y col., 1996; y J.S. Sosnowski, y col., 1995), embriones humanos (A.L. Vescovi y col., 1999), biopsias de  
60

pacientes con enfermedad de Alzheimer (B. Wolozin y col., 1993) y adultos humanos normales (F. Feron, y col., 1999; W. Murrell, y col., 1996; y B. Wolozin, y col., 1992) han producido cultivos viables de NeO pero ninguno ha producido células madre o formadoras de neuroesferas. En cambio, cada uno de estos cultivos contenía neuronas, glía y células epiteliales comprometidas.

5

**[0007]** Por tanto, la identificación de una fuente de células madre neurales autólogas adultas accesibles que puedan obtenerse sin daño permanente para el individuo donante sería de gran ayuda no sólo porque evita las cuestiones éticas asociadas al uso de células madre embrionarias y fetales, sino también porque proporciona poderosas herramientas para desarrollar tratamientos, aumentar los éxitos de las técnicas de trasplante y proporcionar procedimientos para evaluaciones de diagnóstico y desarrollo de fármacos.

10

**[0008]** Roisen FJ y col., Brain Research, Vol. 890(1), 1 de enero de 2001, páginas 11-22, describe células madre olfativas adultas, obtenidas de cadáveres.

15 **[0009]**

El documento US-5.851.832 describe el crecimiento y proliferación *in vitro* de células madre neurales multipotentes y su progenie.

**[0010]** El documento US-5.869.266 describe el uso de cultivos de neuronas olfativas humanas para diagnosticar enfermedad de Alzheimer.

20

**[0011]** La invención proporciona un procedimiento de aislamiento de una pluralidad de células, que comprende: cultivo de tejido humano a partir de neuroepitelio olfativo recogido de un donante vivo adulto para formar un cultivo; y recogida de una pluralidad de células inmunorreactivas para la nestina a partir del cultivo.

25 **[0012]**

La invención proporciona también un procedimiento *in vitro* de evaluación de un compuesto en cuanto a efectos neurológicos, que comprende: cultivo de tejido humano adulto a partir de neuroepitelio olfativo, para formar un cultivo; recogida de una pluralidad de células inmunorreactivas para la nestina a partir del cultivo; y puesta en contacto de la pluralidad de células con el compuesto.

30 **[0013]**

La invención proporciona también un procedimiento *in vitro* de determinación de un marcador para un trastorno neurológico, que comprende: formación de un primer cultivo a partir de células que se han obtenido del epitelio olfativo de un sujeto sano; recogida de una pluralidad de células del primer cultivo, en la que la pluralidad de células comprende células inmunorreactivas para la nestina, para formar una primera población de células; formación de un segundo cultivo a partir de células que se han obtenido de epitelio olfativo de un individuo afectado por un trastorno neurológico, para formar un segundo cultivo; y recogida de una pluralidad de células del segundo cultivo, en el que la pluralidad de células comprende células inmunorreactivas para la nestina, para formar una segunda población de células; y comparación de la expresión de al menos un gen entre las poblaciones de células primera y segunda, en la que una diferencia en la expresión de al menos un gen es un marcador del trastorno.

35

40 **[0014]**

La invención proporciona además el uso de una célula madre olfativa humana aislada obtenida de un individuo afectado por un trastorno neurológico, en el que se ha introducido un transgén que codifica al menos un polipéptido útil para tratar el trastorno neurológico en la célula madre, para la fabricación de un medicamento para tratar el trastorno neurológico en dicho individuo.

45 **[0015]**

La presente invención proporciona así un procedimiento de aislamiento de células, mediante el cultivo de tejido humano a partir de neuroepitelio olfativo según se define en las reivindicaciones

**[0016]** La presente invención proporciona también un procedimiento de formación de células diferenciadas aislando células obtenidas del cultivo de tejido humano a partir del neuroepitelio olfativo según se expone anteriormente y a continuación poniendo en contacto las células aisladas con un factor de diferenciación, según se define en las reivindicaciones.

50

**[0017]** La presente invención proporciona así un procedimiento de formación de células diferenciadas, mediante la puesta en contacto de una célula madre olfativa humana aislada con un factor de diferenciación, según se define en las reivindicaciones.

55

**[0018]** La presente invención proporciona también el uso de una pluralidad de células madre olfativas humanas aisladas para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico, según se define en las reivindicaciones.

60

**[0019]** La presente invención proporciona también el uso de una pluralidad de células diferenciadas por puesta en contacto de una célula madre olfativa humana aislada con un factor de diferenciación, para la fabricación

de un medicamento para tratar un trastorno neurológico según se define en las reivindicaciones.

**[0020]** La presente memoria descriptiva describe el tratamiento de un trastorno neurológico mediante el aislamiento de una pluralidad de células por cultivo de tejido humano a partir de neuroepitelio olfativo para formar neuroesferas y el trasplante de una pluralidad de estas células madre olfativas humanas aisladas.

**[0021]** La presente invención proporciona también un procedimiento *in vitro* de evaluación de un compuesto en cuanto a efectos neurológicos mediante la puesta en contacto de una célula madre humana aislada con el compuesto, según se define en las reivindicaciones.

**[0022]** La presente memoria descriptiva describe también un kit con una pluralidad de células madre olfativas humanas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

**[0023]**

Fig. 1. Neuroesferas de NeO humano.

Fig. 2a-2b. Células formadoras de neuroesferas inmunopositivas para isotipo III de la  $\beta$ -tubulina.

Fig. 2c. Células formadoras de neuroesferas inmunopositivas para NCAM.

Fig. 2d. Células formadoras de neuroesferas inmunopositivas para MAP2ab

Fig. 3a-3b. Células de neuroesferas inmunonegativas para marcadores neuronales de isotipo III de la  $\beta$ -tubulina, NCAM y MAP2ab, pero inmunopositivas para A2B5 y GFAP.

Fig. 4a-4b. Subcultivo de células formadoras de neuroesferas.

Fig. 4c-4d. Subcultivo de células formadoras de neuroesferas suplementado con dibutilil-AMPc 2,5 mM.

Fig. 5. Localización de receptores de Trk en células formadoras de neuroesferas en subcultivo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0024]** El hecho de que el NeO humano puede ser manipulado *in vitro* para formar neuroesferas a partir de donantes de hasta 95 años de edad revela un grado notable de neuroplasticidad en estas células. Además, la accesibilidad quirúrgica directa mínimamente invasiva de NeO humano, unida a su pluripotencia, hace de él una buena fuente autóloga de células madre. Es posible extraer, hacer proliferar y manipular estas células *ex vivo* antes de su retorno, por medio de un trasplante al donante para regeneración de tejido neural dañado. Estas células madre pluripotentes pueden usarse también para generar evaluación diagnóstica y tratamiento genéticos específicos para el paciente.

**[0025]** El NeO proporciona una fuente de células madre pluripotentes adultas viables, susceptibles de uso en investigación, tratamientos, desarrollo de fármacos y trasplantes, que evita las cuestiones éticas asociadas al uso de células madre embrionarias y fetales. Más aún, el uso de NeO evita las cuestiones éticas asociadas al uso de modelos animales y puede usarse incluso cuando no existen modelos animales. El NeO tiene una capacidad de regeneración durante toda la vida; las células madre situadas en el NeO sustituyen las neuronas envejecidas y dañadas y sus células sustentaculares. La accesibilidad del NeO y la capacidad proliferativa hacen de él una fuente específica de células progenitoras. Además, la capacidad de obtener células madre pluripotentes de NeO a partir de la cavidad nasal elimina la necesidad de usar procedimientos altamente invasivos y dañinos que están disponibles actualmente para obtener células madre postembrionarias. Además, dado que uno de los mayores problemas que se encuentran en los trasplantes es el rechazo del tejido, al proporcionar células madre para trasplante autólogo se elimina la necesidad de esperar a un donante histocompatible y, con ello, se reduce enormemente tanto la frecuencia como la gravedad del rechazo. La presente invención puede proporcionar también una fuente de células madre de individuos con trastornos específicos del sistema nervioso como trastorno bipolar, esquizofrenia o esclerosis lateral amiotrófica para su uso en el desarrollo de fármacos o tratamientos. La presente invención tiene también la ventaja de generar poblaciones celulares específicas del paciente para evaluaciones inmunológicas, farmacológicas y de diagnóstico genético.

II. Definiciones

A. Tipos de células

5 **[0026]** Una célula que es "totipotente" es aquella que puede diferenciarse en cualquier tipo de célula y formar así un nuevo organismo o regenerar cualquier parte de un organismo.

**[0027]** Una célula "pluripotente" es aquella que tiene una vía de desarrollo no fija, y en consecuencia puede diferenciarse en varios tipos de células diferenciados, por ejemplo, neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, células  
10 envolventes o células gliales. Las células pluripotentes se asemejan a las células totipotentes en que son susceptibles de desarrollarse en otros tipos de células; sin embargo, las diversas células pluripotentes pueden estar limitadas en el número de vías de desarrollo que pueden recorrer.

**[0028]** Una "célula multipotente" es una célula que procede de un precursor pluripotente y puede  
15 diferenciarse en menos tipos de células que este precursor pluripotente.

**[0029]** Una "célula madre" describe a cualquier célula precursora, capaz de la autorrenovación, cuyas células hijas pueden diferenciarse en otros tipos de células. En general, una célula madre es capaz de una proliferación extensa, para generar más células madre (autorrenovación), así como progenie más diferenciada. Así, una sola  
20 célula madre puede generar millones de células diferenciadas, así como otras células madre. Las células madre proporcionan una fuente continua de células precursoras de tejidos.

**[0030]** Las células madre pueden dividirse de forma asimétrica, de manera que una célula hija conserve el estado troncal y la otra exprese alguna función y fenotipo específicos distintos. Alternativamente, algunas de las  
25 células madre de una población pueden dividirse simétricamente en dos troncos, manteniendo así algunas células madre en la población en su conjunto, mientras otras células de la población dan lugar sólo a progenie diferenciada. Los investigadores han observado que las células que empiezan como células madre pueden avanzar hacia un fenotipo diferenciado, como, por ejemplo, una neurona, para a continuación "invertirse" y reexpresar el fenotipo de la célula madre tras la implantación.

**[0031]** "Célula madre olfativa humana" significa una célula que es humana, según se determina por la estructura cromosómica o la reacción con anticuerpos específicos humanos, y tiene al menos dos de las siguientes características, y preferentemente tiene al menos tres de las siguientes características, más preferentemente tiene al menos cuatro de las siguientes características, más preferentemente todavía tiene al menos cinco de las siguientes  
35 características y con la máxima preferencia tiene todas las características siguientes:

se divide cada 18-24 horas durante más de 200 pasos;

la inmunorreactividad para el marcador isotipo III de la  $\beta$ -tubulina es significativamente elevada cuando la célula se  
40 hace proliferar en diversos sustratos, como, por ejemplo, una matriz recubierta con una mezcla de entanina, laminina y colágeno IV (matriz ECL); alternativamente puede usarse también laminina o fibronectina;

la inmunorreactividad para el isotipo III de la  $\beta$ -tubulina es muy superior a la inmunorreactividad para este marcador de otros tipos de células;

45 la adición de dibutilil-AMPc al cultivo que crece en matriz ECL hace que las células formen protuberancias;

es inmunopositiva para marcador NCAM; o

50 no necesita una capa de alimentación para su crecimiento y proliferación.

**[0032]** La célula madre olfativa humana puede no tener todas las características mencionadas anteriormente, aunque tendrá al menos dos de estas características simultáneamente.

55 **[0033]** Preferentemente las células madre olfativas humanas se propagarán en cultivo y pueden diferenciarse en uno o más de los siguientes tipos de células: neuronas, células envolventes, células epiteliales o astrocitos.

**[0034]** Una "neuroesfera" es un grupo de aproximadamente 20 a 80 células precursoras gliales o mitóticamente activas. Generalmente, las neuroesferas representan una población de células neurales en diferentes  
60 fases de maduración formadas por un único precursor que prolifera clonalmente y que forma estructuras celulares esféricas y densamente empaquetadas.

**[0035]** Una "oligoesfera" es un grupo de células precursoras de oligodendrocitos activas mitóticamente. Generalmente, las oligoesferas representan una población de oligodendrocitos en diferentes fases de maduración formados por un único precursor que prolifera clonalmente y que forma estructuras celulares densamente empaquetadas. (V. Avellana-Adalid, y col., 1996; S.C. Zhang, y col., 1998).

5

**[0036]** Entre las células "postembrionarias" se incluye cualquier célula presente en un vertebrado en cualquier fase después del nacimiento.

#### B. Caracterización de los tipos de células

10

**[0037]** "Aisladas" significa fuera del cuerpo o *ex vivo* y que contienen al menos el 10% de la célula madre olfativa humana, incluyendo células que pueden ser congeladas individualmente o que son congeladas en un aglomerado o grupo.

15

**[0038]** Un "marcador" se usa para determinar el estado diferenciado de una célula. Los marcadores son característicos, ya sean por motivos morfológicos o bioquímicos (enzimáticos), particulares de un tipo de célula, o moléculas expresadas por el tipo de célula. Preferentemente, dichos marcadores son proteínas, y más preferentemente poseen un epítipo para anticuerpos u otras moléculas de unión disponibles. Sin embargo, un marcador puede comprender cualquier molécula encontrada en una célula, incluyendo pero sin limitarse a, proteínas (péptidos y polipéptidos), lípidos, polisacáridos, gangliósidos, ácidos nucleicos, esteroides y derivados de los mismos.

20

**[0039]** Los marcadores pueden ser detectados por cualquier procedimiento disponible para el experto en la materia. Además de anticuerpos (y todos los derivados de anticuerpos) que reconocen y se unen a al menos un epítipo en una molécula de marcador, los marcadores pueden ser detectados usando técnicas analíticas, como mediante inmunotransferencias de proteínas, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), o cualquier otro sistema en gel que separe proteínas, con la posterior visualización del marcador (por ejemplo, transferencias Western), filtración en gel, purificación en columna de afinidad; morfológicamente, como, por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia (FACS), tinción con tintes que tienen una reacción específica con una molécula de marcador (como rojo de rutenio y moléculas de matriz extracelular), características morfológicas específicas (como la presencia de microvellosidades en epitelios, o los seudópodos/filópodos en células migrantes, como, por ejemplo, fibroblastos y mesénquima); y bioquímicamente, como, por ejemplo, ensayo para un producto enzimático o producto intermedio, o la composición global de una célula, como la proporción entre proteínas y lípidos, o entre lípidos y azúcares, o incluso la proporción de dos lípidos específicos entre sí, o polisacáridos. En el caso de marcadores de ácidos nucleicos, puede usarse cualquier procedimiento conocido. Si dicho marcador es un ácido nucleico, puede usarse PCR, RT-PCR, hibridación *in situ*, hibridación de inmunotransferencia, transferencias Northern, transferencias Southern y similares, junto con procedimientos de detección adecuados.

25

30

35

40

**[0040]** Un marcador o una combinación de marcadores mostrará especificidad para un tipo de célula. Las miofibrillas, por ejemplo, son características exclusivamente de células musculares; los axones sólo se encuentran en el tejido nervioso, las cadherinas son típicas de los epitelios, las integrinas  $\beta_2$  de los leucocitos del sistema inmunitario, y un alto contenido en lípidos característico de oligodendrocitos mientras que las gotículas de lípidos son especiales de los adipocitos. Véase en la Tabla 1 mostrada a continuación una lista de los Marcadores que pueden

45

usarse en la presente invención.

Tabla 1. Marcadores para su uso en la identificación de tipos de células

Anticuerpos y receptores de factores de crecimiento	Diluciones útiles cuando el diluyente es el anticuerpo o factor de crecimiento descrito	Diana	Fuente*
Trk A, B, C o pan	1:100	Receptores de neurotrofina	Santa Cruz BioTech, Santa Cruz, CA
Receptor NGF p75 <sup>NGFR</sup> , monoclonal humano	1:50	Neuronas y glía	Sigma, St. Louis, MO
GFAP, policlonal	sin dilución	Progenitor envolvente	INCSTAR, Stillwater, MN
GFAP, monoclonal	1:40	Progenitor envolvente, astrocitos, glía olfativa	Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN
A2B5, monoclonal	1:100	Glía, algunas neuronas	Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN
Isotipo III de la $\beta$ -tubulina	clon	Neuronas, células progenitoras	Sigma, St. Louis, MO
MAP2ab monoclonal	1:250	Neuronas	Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN
Citoqueratina, CK5/6	1:20	Epitelial	Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN
E-NCAM (5A5), monoclonal	dilución no determinada	Neuronas	DSHB, Universidad de Iowa, IA
NCAM, monoclonal	1:50	Neuronas	Chemicon International, Temecula, CA
Alfa-internexina	1:50	Neuronas inmaduras	Chemicon International, Temecula, CA
Nestina, monoclonal	1:50	Células madre embrionarias	Chemicon International, Temecula, CA
Nestina, policlonal	1:40	Células madre neuronales	(R. McKay, 1997)
AcM frente a actina	1:100	Microfilamentos	Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN
AcP frente a tubulina	1:20	Microtúbulos	ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA
AcM frente a tubulina	1:500	Microtúbulos	Amersham, Arlington Heights, IL
RIP, policlonal	1:20	Oligodendrocitos maduros	Zymed, San Francisco, CA

**[0041]** \*Alternativamente si estos anticuerpos comerciales no están disponibles, un experto en la materia 5 sabrá cómo preparar anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo puede prepararse de la manera siguiente.

**[0042]** Los anticuerpos policlonales pueden prepararse frente a un hospedador mamífero mediante una o más inyecciones de un inmunógeno y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el inmunógeno (y adyuvante) se inyecta en el mamífero mediante una inyección subcutánea o intraperitoneal. El inmunógeno puede incluir moléculas como polipéptidos, células enteras o fracciones de células y puede producirse de forma recombinante o de forma no recombinante. Entre los ejemplos de adyuvantes se incluyen adyuvante completo de Freund y Lípido A monofosforílico sintético-dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM). Para mejorar la respuesta inmunológica, un inmunógeno puede conjugarse con un polipéptido que sea inmunogénico en el hospedador, como, por ejemplo, hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los 10 15 protocolos para producción de anticuerpos son bien conocidos (Harlow y Lane, 1988). Alternativamente, los AcP pueden prepararse en pollos, para producir moléculas IgY (Schade y col., 1996).

**[0043]** Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse también por inmunización de un hospedador, o linfocitos de un hospedador, mediante la recogida del AcM que secreta (o secreta potencialmente) linfocitos, fusión 20 de los linfocitos en células inmortalizadas y selección de aquellas células que secretan el AcM deseado. Los AcM pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o líquido de ascitis por procedimientos convencionales como polipéptido A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, precipitación de sulfato de amonio o cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999.)

**[0044]** La "plasticidad" describe la capacidad de una célula de variar el patrón de desarrollo, es decir, la 25 capacidad de ser moldeada o alterada. Preferentemente una célula que muestra "plasticidad" muestra capacidad para diferenciarse en varios tipos de células.

**[0045]** "Diferenciación" describe la adquisición o posesión de una o más características o funciones diferentes de la del tipo de célula predecesor. Una célula diferenciada es aquella que tiene un carácter o función diferente con respecto a las estructuras circundantes o con respecto al precursor de esa célula (incluso la misma célula). La diferenciación da lugar a partir de un conjunto limitado de células (por ejemplo, en los vertebrados, las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo) a diversidad celular, para crear todos los numerosos tipos de células especializadas que comprenden un individuo.

**[0046]** La diferenciación es un proceso de desarrollo en el cual las células adoptan un fenotipo especializado, es decir, adquieren una o más características o funciones distintas de los otros tipos de células. En la mayoría de los usos, el fenotipo diferenciado se refiere a un fenotipo celular al que se asigna el criterio de valoración de maduro en alguna vía de desarrollo. En muchos, pero no en todos los tejidos, el proceso de diferenciación está acoplado con la salida del ciclo celular; en estos casos, la célula pierde o ve enormemente restringida su capacidad de proliferación.

**[0047]** Un "factor de diferenciación" es cualquier sustancia química u objeto que provocará diferenciación. Incluye, por ejemplo, sustratos y factores de crecimiento.

**[0048]** En general, un "factor de crecimiento" es una sustancia que promueve el crecimiento y desarrollo celular dirigiendo la maduración y la diferenciación de las células. Los factores de crecimiento también pueden mediar en el mantenimiento y la reparación de los tejidos. Los factores de crecimiento están ligados por receptores específicos y actúan en concentraciones muy bajas. Muchos factores de crecimiento están mediados, al menos parcialmente, por segundos mensajeros, como AMP cíclico (AMPc). Los miembros de la familia de la neurotrofina (NGF, BDNF, NT3 y NT4/5) desempeñan un papel clave en el desarrollo, diferenciación y supervivencia neuronales. Los factores de crecimiento de la familia de la neurotrofina actúan normalmente a través de receptores de las tirosincinasas (Trk).

**[0049]** Un "trastorno neurológico" es cualquier trastorno, incluidos los trastornos psiquiátricos, que afecta a una parte del sistema nervioso, como los nervios, la médula espinal o el encéfalo. Algunos ejemplos de trastornos neurológicos incluirían enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, lesión de la médula espinal, esquizofrenia, autismo y trastorno bipolar.

**[0050]** Un "neurotransmisor" es cualquier producto químico o sustancia capaz de inhibir o excitar a una célula post-sináptica. Algunos ejemplos de neurotransmisores incluyen dopamina, serotonina y acetilcolina. Es bien conocido que los niveles inapropiados de neurotransmisores se asocian con numerosos trastornos, entre ellos trastornos neurológicos según se describe anteriormente.

**[0051]** La "neuritogénesis" es la formación de nuevas protuberancias y la extensión de protuberancias existentes que se asemejan a las de las neuronas.

## 40 II. Aislamiento de células madre olfativas humanas

**[0052]** Primero se extrae tejido de NeO de la cavidad nasal. El experto en la materia comprenderá que el tejido de NeO puede extraerse usando una diversidad de procedimientos. Un procedimiento preferido para extraer el tejido de NeO implica el uso de un endoscopio, que tiene un cable de fibra óptica con una "pinza" en un extremo, para realizar una biopsia. Una ventaja de usar este procedimiento preferido es la capacidad de obtener muestras de tejido de personas donantes vivas, con invasividad y molestias mínimas. Una ventaja adicional de la extracción de tejidos de NeO mediante el uso de un endoscopio es la capacidad de congelar o cultivar las células madre de NeO obtenidas en una recogida inicial y la capacidad de realizar múltiples recogidas cuando se necesite para la viabilidad del cultivo *in vitro* o para alcanzar el nivel deseado de cantidad de células madre.

**[0053]** Una rinitomía lateral es otro procedimiento para extraer tejidos de NeO. La rinitomía lateral es un procedimiento operativo en el que se realiza una incisión en la nariz a lo largo de un lateral de manera que pueda levantarse para proporcionar un acceso completo a la cavidad nasal y al tejido de NeO. Sin embargo este procedimiento es altamente invasivo. En un procedimiento preferido, el procedimiento de rinitomía lateral se usa para extraer tejidos de NeO de un cadáver. En este procedimiento, el cadáver es preferentemente de no más de dieciocho horas post-mórtem y más preferentemente es de seis horas post-mórtem y con la máxima preferencia, el cadáver es inmediatamente post-mórtem.

**[0054]** Una vez extraído, el NeO puede someterse a cultivo. Por ejemplo, el NeO se somete a cultivo en un medio que contiene DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) y F12 (1:1) con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10% (todos los componentes de los medios proceden de GIBCO, Grand Island, NY). Pueden ser apropiados otros medios, tal como reconocerá el experto en la materia, así como diferentes fuentes animales de

sueros o el uso de medios sin suero; además, algunos cultivos requerirán suplementos adicionales, entre ellos aminoácidos (como glutamina), factores de crecimiento, etc. Puede usarse una diversidad de sustratos para el cultivo de las células, por ejemplo, sustratos de plástico o vidrio, recubiertos o no recubiertos. Por ejemplo, la placa de cultivo puede ser una placa de plástico recubierta con laminina-fibronectina. Alternativamente los sustratos pueden estar recubiertos con moléculas de matriz extracelular (para estimular la adhesión o para controlar la diferenciación celular), colágeno o poli-L-lisina (para estimular la adhesión sin efectos biológicos). Los sustratos de cultivo celular pueden tratarse también para que contengan carga. En el caso en el que no se desee la adhesión al sustrato, pueden usarse cultivos en agitación, en los que las células se mantienen en suspensión. Además la composición de los sustratos puede desempeñar un papel en la diferenciación de células madre de NeO.

10

**[0055]** El NeO extraído no sólo contiene células madre pluripotentes, sino que puede contener también neuronas receptoras olfativas (NRO), células sustentaculares o envoltentes olfativas (CEO), células de soporte epiteliales y fibroblastos. Después del cultivo durante varias semanas, aparece una población de células mitóticamente activas, mientras las NRO y las CEO se vacuolizan, retraen protuberancias y mueren después de aproximadamente tres semanas *in vitro*. Estas células mitóticamente activas se duplican cada día. Al cabo de 2 a 3 semanas de proliferación adicional sin perturbaciones empiezan a formarse neuroesferas. Sin embargo esto sucede sólo en el 5 al 10% de los cultivos de manera que en general se necesitan múltiples cultivos para formar y sostener una colección de células. Las células de neuroesferas se recogen a partir del cultivo. Puede usarse una diversidad de procedimientos para recoger las neuroesferas, entre ellos extracción enzimática (por ejemplo, por tripsinización), procedimientos químicos (por ejemplo, quelación con cationes metálicos usando ácido etilendiamintetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), y mecánicamente, por ejemplo, por raspado celular o en el caso de células en suspensión, por simple centrifugación.

15

20

25

30

**[0056]** Después de la recogida, las células pueden ser lavadas y separadas del residuo no deseado mediante centrifugación con o sin un gradiente (continuo o escalonado, por ejemplo, con polietilenglicol o sacarosa), o se clasifican, si se desea mediante FACS u otras técnicas basadas en la unión, como anticuerpos para un marcador celular específico que recubren perlas (magnéticas). Preferentemente, todos los procedimientos de recogida se realizan de forma aséptica. Un experto en la materia sabrá cómo determinar apropiadamente parámetros útiles, como los tiempos de incubación con agentes de extracción celular (químicos o enzimáticos), temperaturas, fuerza centrífuga y número y tipo de lavados. Después de la recogida, las neuroesferas se someten a dispersión mecánica en células individuales, se lavan repetidamente con una solución apropiada osmóticamente (con o sin tampón), se les añaden soluciones salinas, como solución de suero salino o solución de Ringer, y se centrifugan para eliminar los residuos celulares, y a continuación se resiembran a razón de  $10^3$  células por  $mm^2$ .

35

40

**[0057]** Las células pueden aislarse adicionalmente a partir de estas células sembradas y se caracterizan mediante sondeo de las células con anticuerpos específicos del linaje, o se examinan en busca de otros marcadores útiles. Inicialmente se prefiere determinar si hay neuronas en los cultivos celulares aislados. Además de inspección microscópica simple, las neuronas pueden detectarse con más sensibilidad al menos mediante los siguientes marcadores: NCAM, E-NCAM, MAP2ab monoclonal, isotipo III de la β-tubulina, A2B5 y receptor NGF (Tabla 1). Las células gliales pueden detectarse al menos por la presencia de un gangliósido enriquecido con membrana glial con un anticuerpo monoclonal, como A2B5. Los astrocitos pueden detectarse al menos por la presencia de proteína gliofibrilar ácida (GFAP). La Tabla 2 resume la inmunoreactividad de células de neuroesferas de NeO que contienen células madre olfativas humanas.

45

**Tabla 2 Resumen de inmunoreactividad de células de neuroesferas en subcultivo a partir de NeO**

Antígeno expresado
NCAM+/nestina+ <sup>**</sup>
NCAM+/queratina-
β-tubulina III +/nestina+ <sup>**</sup>
β-tubulina III +/GFAP-
GFAP +/β-tubulina III-
GFAP +/RIP-
GFAP +/A2B5+
Trk A +/p75 <sup>NGFR</sup> -
Trk B +/p75 <sup>NGFR</sup> -
<sup>**</sup> +- significa que hay células inmunopositivas e inmunonegativas en las que al menos más de una célula es inmunonegativa pero no todas las células son inmunonegativas.

## III. Cultivos celulares

**[0058]** El medio y las condiciones adecuados para generar cultivos primarios y mantener los cultivos de neuroesferas anteriores son bien conocidos en la técnica y pueden variar dependiendo de los tipos de células presentes. Por ejemplo, las células madre musculoesqueléticas, óseas, de neuronas, cutáneas, hepáticas y embrionarias se cultivan todas en medios que difieren en sus contenidos específicos. Además, los medios para un tipo de célula pueden diferir significativamente de un laboratorio a otro y de una institución a otra. Para mantener la división celular, se añade al medio suero, como suero de ternera fetal, en cantidades relativamente grandes, del 1 al 30% en volumen, dependiendo de nuevo del tipo de célula o de tejido. También pueden añadirse factores de crecimiento purificados específicos o cócteles de múltiples factores de crecimiento o a veces se emplean en lugar del suero. Cuando se desea una diferenciación y no una proliferación, en general el suero con sus mitógenos se limita a aproximadamente del 0 al 2% en volumen. También pueden usarse factores u hormonas específicos que promuevan la diferenciación y/o promuevan la interrupción del ciclo celular.

**[0059]** Pueden usarse condiciones de oxígeno fisiológico y de oxígeno subatmosférico en cualquier momento durante el crecimiento y diferenciación de las células en cultivo, como un elemento añadido crítico para la selección de fenotipos celulares específicos, crecimiento y proliferación de tipos de células específicos, o diferenciación de tipos de células específicos. En general, el cultivo con nivel de oxígeno bajo o fisiológico se acompaña de procedimientos que limitan la acidosis de los cultivos, como la adición de un fuerte tampón al medio (por ejemplo, HEPES), y cambios frecuentes en el medio y cambios en la concentración de CO<sub>2</sub>.

**[0060]** Además de oxígeno, los otros gases para cultivo normalmente son aproximadamente dióxido de carbono al 5% y el resto es nitrógeno, pero opcionalmente puede contener cantidades diversas de óxido nítrico (a partir de valores de sólo 3 ppm), monóxido de carbono y otros gases, tanto inertes como biológicamente activos. Las concentraciones de dióxido de carbono están comprendidas normalmente en torno al 5%, pero pueden variar entre el 2 y el 10%. El óxido nítrico y el monóxido de carbono, cuando es necesario, se administran normalmente en cantidades muy pequeñas (es decir, en el intervalo de ppm), determinadas empíricamente o a partir de la literatura especializada.

**[0061]** El medio puede suplementarse con una diversidad de factores de crecimiento, citocinas, suero, etc. Algunos ejemplos de factores de crecimiento adecuados son factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento neuronal (NGF), NT3, NT4/5, factor neuronal obtenido del encéfalo (BDNF) y factor estimulante de colonias (CSF). Algunos ejemplos de aditivos al medio de hormonas son estrógeno, progesterona, testosterona o glucocorticoides como, por ejemplo, dexametasona. Algunos ejemplos de aditivos al medio de citocinas son interferones, interleucina o factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Un experto en la materia probará con aditivos y componentes de cultivo en diferentes condiciones de cultivo, ya que estas pueden alterar la respuesta celular, el tiempo de vida activo de los aditivos u otras características que afecten a su bioactividad. Además, la superficie en la que se desarrollan las células puede ser sembrada con una diversidad de sustratos que contribuyen a la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de las células. Estos sustratos incluyen pero no se limitan a laminina, matriz ECL, colágeno, poli-L-lisina, poli-D-lisina, poliornitina y fibronectina. En algunos casos, cuando se desean cultivos tridimensionales, pueden usarse geles de matriz extracelular, como colágeno, matriz ECL o gelatina. Las células pueden desarrollarse en la parte superior de dichas matrices, o puede ser vertidas en el interior de los propios geles. Por ejemplo, el uso de una matriz ECL promovió la restricción de linaje de las células obtenidas de NeO hacia neuronas en maduración según se indica por el nivel de neuritogénesis.

45 IV. Trasplante

**[0062]** Las células madre de la presente invención pueden ser trasplantadas a un paciente que sufre un trastorno neurológico, como, por ejemplo, lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o esclerosis múltiple, como un procedimiento de tratamiento del trastorno. Entre los procedimientos de trasplante se incluyen inyección de células transformadas o efectivas para tratar un trastorno neurológico, por medio de una diversidad de procedimientos, en el sitio de la lesión o en un sitio distante. Las células pueden diferenciarse de forma parcial o completa antes del trasplante.

55 V. Reformación o formación de estructuras del SNC

**[0063]** Las células madre de la invención pueden usarse además para formar o reformar estructuras del SNC dañadas o con mal funcionamiento, como, por ejemplo, axones, o estimular el nuevo crecimiento de axones existentes. Por ejemplo, Li y col. han demostrado que la inyección de células envoltantes cultivadas a partir del bulbo olfativo de ratas adultas, en un sitio de transección del tracto corticoespinal cervical superior, indujo un crecimiento elongativo no ramificado de los axones corticoespinales cortados y restauró la función motora (Li y col., 2000). Análogamente, las células madre pueden diferenciarse, y las células envoltantes resultantes son

seleccionadas y trasplantadas para reparar un daño espinal.

**[0064]** La diferenciación de células madre puede dirigirse para dar como resultado un tipo particular de célula hija que procede de la célula madre progenitora. Por ejemplo cuando la célula madre de la presente invención se expone a dibutiril-AMPc durante 24 horas, se diferencia en un progenitor que contiene un precursor de neurofilamento. Además, en cultivo, al menos una parte de las células madre se diferencia espontáneamente y puede ser seleccionada. Puede usarse congelación para almacenar las células diferenciadas hasta que se han recogido suficientes para un trasplante eficaz. Por tanto, mediante la inducción de la célula madre de la presente invención para formar un tipo de célula deseado, y la inyección de esta célula diferenciada en el sitio de la lesión, pueden tratarse las estructuras del SNC.

#### E. Enfoques farmacológicos

**[0065]** Las células de la presente invención pueden usarse para la fabricación de compuestos farmacéuticamente útiles, como dopamina u otros neurotransmisores producidos por neuronas sanas. Por tanto, dirigiendo la célula madre de la presente invención a una ruta de diferenciación que conduzca a la formación de neuronas, un cultivo celular especial formado por neuronas diferenciadas obtenidas de la célula madre de la presente invención puede proporcionar grandes poblaciones celulares capaces de producir grandes cantidades de compuestos farmacéuticamente útiles, como la dopamina. Además, pueden usarse muchos factores de crecimiento, entre ellos al menos NGF, BDNF, NT3 y NT4/5, para dirigir la diferenciación de la célula madre.

**[0066]** Pueden usarse segundos mensajeros, como AMPc, para mediar en la interacción entre los receptores de factor de crecimiento de la célula madre en diferenciación y los factores de crecimiento en sí. Por ejemplo, la exposición de subcultivos de neuroesferas a medios que contienen dibutiril-AMPc 2,5 mM reduce drásticamente la actividad mitótica y aumenta los niveles de  $\alpha$ -internexina, un marcador neuronal que aparece antes de la formación del neurofilamento en las neuronas en desarrollo.

**[0067]** Además, las células de la invención pueden ser manipuladas para expresar transgenes que codifican productos útiles. Una ventaja del diseño por ingeniería de las células de la invención, ya sean o no diferenciadas, es la posibilidad de producir polipéptidos, como polipéptidos neuronales o polipéptidos específicos de células madres que son procesados de una manera tal que estarían en su contexto nativo y pueden ser así cultivados en grandes cantidades. Otra ventaja incluye el diseño por ingeniería de dichas células antes de trasplantarlas a un sujeto de tal modo que se exprese una molécula terapéuticamente útil; por ejemplo, un paciente que sufra enfermedad de Parkinson puede tener células de NeO recogidas para crear las células madre de la invención, pero no expresará dopamina suficiente para tratar la enfermedad de Parkinson. Así, dichas células pueden diseñarse por ingeniería con un gen de dopamina natural (unido operativamente a los promotores de dopamina endógenos o a un promotor exógeno, dependiendo de la regulación y de la cantidad de secreción que se desee) antes de la implantación.

#### F. Manipulación de células con ADN recombinante

**[0068]** Para manipular ADN *in vitro* de manera que se diseñen por ingeniería las células de la invención con secuencias de ácido nucleico exógenas, los expertos en la materia disponen de muchas técnicas (Ausubel y col., 1987).

**[0069]** Los vectores son herramientas útiles para lanzar ADN entre células hospedadoras o como un medio para expresar una secuencia de nucleótidos. Algunos vectores funcionan sólo en procariotas, mientras que otros funcionan en procariotas y en eucariotas, lo que permite la preparación de ADN a gran escala a partir de procariotas para expresión en eucariotas. La inserción del ADN del polipéptido neurológico de interés se consigue mediante técnicas de ligamiento y/o protocolos de apareamiento bien conocidos para el experto en la materia. Dicho ADN se inserta de manera que su integración no interrumpa ningún componente necesario del vector. En el caso de vectores que se usan para expresar el polipéptido codificado insertado, el ADN introducido está ligado operativamente a elementos del vector que rigen su transcripción y su traducción. "Ligado operativamente" indica que una secuencia de nucleótidos de interés está ligada a secuencias reguladoras de manera que se consigue la expresión de la secuencia de nucleótidos.

**[0070]** Los vectores pueden dividirse en dos clases generales: los vectores de clonación son fagos o plásmidos replicantes con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula hospedadora apropiada y en las que puede insertarse ADN extraño; el ADN extraño es replicado y propagado como si fuera un componente del vector. Se usa un vector de expresión (como un plásmido, levadura, o un genoma de virus animal) para introducir material genético extraño en un tejido o una célula hospedadora con el fin de transcribir y traducir el ADN extraño. En vectores de expresión, el ADN introducido está ligado operativamente a elementos, como, por ejemplo, promotores, que señalan a la célula hospedadora que transcriba el ADN insertado. Algunos promotores son

excepcionalmente útiles, como, por ejemplo, promotores inducibles que controlan la transcripción génica en respuesta a factores específicos, o promotores histo-específicos. Los vectores tienen muchas manifestaciones. Un "plásmido" es una molécula de ADN bicatenario circular que puede aceptar fragmentos de ADN adicionales. Los vectores víricos pueden aceptar también segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora y se replican como parte del genoma del hospedador. En general, los vectores de expresión útiles son plásmidos y vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa); también pueden usarse otros vectores de expresión.

*el polipéptido neurológico el polipéptido neurológico*

**[0071]** Los vectores pueden introducirse en una diversidad de organismos y/o células (Tabla D).  
15 Alternativamente, los vectores pueden ser transcritos y traducidos *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras de promotores T7 y polimerasa T7.

Tabla D Ejemplos de hospedadores para clonación o expresión

Organismos	Ejemplos	Fuentes y referencias*	
Procariotas			
Enterobacteriáceas	<i>E. coli</i> K 12 cepa MM294 X1776 W3110 K5 772	ATCC 31,446 ATCC 31,537 ATCC 27,325 ATCC 53,635	
	<i>Enterobacter</i>		
	<i>Erwinia</i>		
	<i>Klebsiella</i>		
	<i>Proteus</i>		
	<i>Salmonella (S. typhimurium)</i>		
	<i>Serratia (S. marcescans)</i>		
	<i>Shigella</i>		
	<i>Bacilli (B. subtilis y B. licheniformis)</i>		
	<i>Pseudomonas (P. aeruginosa)</i>		
	<i>Streptomyces</i>		
Eucariotas			
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
	<i>Kluyveromyces</i> <i>K. lactis</i> MW98-8C, CBS683, CBS4574	(Fleer y col., 1991) (de Louvencourt y col., 1983)	
	<i>K. fragilis</i> <i>K. bulgaricus</i> <i>K. wickeramii</i> <i>K. waltii</i> <i>K. drosophilorum</i> <i>K. thermotolerans</i> <i>K. marxianus; yarrowia</i>	ATCC 12,424 ATCC 16,045 ATCC 24,178 ATCC 56,500 ATCC 36,906	
	<i>Pichia pastoris</i>	(EPO-402.226, 1990)	
	<i>Candida</i>	(Sreekrishna y col., 1988)	
	<i>Trichoderma reesia</i>		
	<i>Neurospora crassa</i>	(Case y col., 1979)	
	<i>Torulopsis</i>		
	<i>Rhodotorula</i>		
	<i>Schwanniomyces (S. occidentalis)</i>		
	Hongos filamentosos	<i>Neurospora</i>	
		<i>Penicillium</i>	
<i>Tolypocladium</i>		(WO-91/00.357, 1991)	
<i>Aspergillus (A. nidulans y A. niger)</i>		(Kelly y Hynes, 1985; Tilburn y col., 1983; Yelton y col., 1984)	
Células de invertebrados	<i>Drosophila S2</i>		
	<i>Spodoptera Sf9</i>		
Células de vertebrados	Ovario de hámster chino (CHO)		
	COS de simio COS-7	ATCC CRL 1651	
	HEK 293		

\* Las células sin referencia están disponibles generalmente en la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

- [0072]** La elección del vector está dictada por el organismo o las células que se están usando, y por el destino deseado para el vector. Los vectores pueden replicarse una vez en las células diana o pueden ser vectores "suicidas". En general, los vectores comprenden secuencias de señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores, promotores y secuencias de terminación de transcripción. La elección de estos elementos depende de los organismos en los que se usará el vector. Algunos de estos elementos pueden ser condicionales, como, por ejemplo, un promotor inducible o condicional que se "activa" cuando las condiciones son apropiadas.
- 10 Entre los ejemplos de promotores inducibles se incluyen aquellos que son histo-específicos, que relegan la expresión a ciertos tipos de células, que responden a esteroides o son reactivos frente al choque térmico. Algunos sistemas de



neurológico

(c) *Cribado para identificar moduladores*

5 **[0079]** Los moduladores de la expresión de un polipéptido neurológico pueden identificarse en un procedimiento en el que se pone una célula en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión del ARNm del polipéptido neurológico o del polipéptido en la célula. El nivel de expresión del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido en presencia del compuesto candidato se compara con los niveles del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido en ausencia del compuesto candidato. A continuación puede identificarse el compuesto candidato como un modulador de la expresión del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido es mayor (es decir, estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión de ese ARNm del polipéptido neurológico o polipéptido. Alternativamente, cuando la expresión del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido es menor (estadísticamente significativa) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido. El nivel de la expresión del ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido en las células puede determinarse mediante procedimientos descritos para detectar el ARNm del polipéptido neurológico o el polipéptido.

20 *Identificación de marcadores asociados con un trastorno neurológico*

**[0080]** En otro aspecto, las células de la invención pueden usarse para identificar marcadores que están asociados con una enfermedad o trastorno neurológico. Entre dichos marcadores se incluyen, por ejemplo, diferencia de expresión génica y lesiones genéticas. Un enfoque útil incluiría la identificación de aquellos genes que se expresan diferencialmente entre aquellas células madre de la invención aisladas de un individuo sano y las aisladas de un individuo afectado por un trastorno neurológico. En la técnica se dispone de muchos procedimientos para determinar la expresión génica diferencial (Ausubel, 1987). Son especialmente útiles aquellos procedimientos que aprovechan formatos de alto rendimiento, como los chips génicos.

30 **[0081]** Las lesiones genéticas pueden detectarse mediante la determinación de: (1) la delección de uno o más nucleótidos a partir de un gen de polipéptido diana; (2) la adición de uno o más nucleótidos al gen de polipéptido diana; (3) la sustitución de uno o más nucleótidos en el gen de polipéptido diana; (4) la redistribución cromosómica de un gen del polipéptido neurológico; (5) una alteración en el nivel de los transcritos del ARNm del polipéptido neurológico; (6) la modificación aberrante del polipéptido diana, como, por ejemplo, un cambio en la metilación del ADN genómico; (7) la presencia de un patrón de división no natural de un transcrito de ARNm del polipéptido neurológico diana; (8) un nivel no natural del gen del polipéptido diana; (9) la pérdida alélica del gen de polipéptido diana, y/o (10) la modificación postraducciona inapropiada del polipéptido neurológico. Las mutaciones en un polipéptido neurológico diana a partir de una muestra pueden identificarse por medio de las alteraciones en los patrones de digestión de enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de muestra y de control es aislado, amplificado (opcionalmente), digerido con una o más endonucleasas de restricción, y los tamaños de la longitud del fragmento se determinan mediante electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de la longitud de fragmento entre el ADN de muestra y de control indican mutaciones en el ADN de muestra. Por otra parte, puede recurrirse al uso de ribozimas específicas de las secuencias para valorar la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de corte de ribozimas.

45 **[0082]** La hibridación de ácidos nucleicos de muestra y de control, por ejemplo, ADN o ARN, en matrices de alta densidad que contienen centenares o miles de sondas de oligonucleótidos, puede identificar mutaciones genéticas en un polipéptido neurológico diana (Cronin y col., 1996; Kozal y col., 1996). Por ejemplo, las mutaciones genéticas en un polipéptido neurológico diana pueden identificarse en matrices bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas por luz (Cronin y col., 1996). Brevemente, puede usarse una primera matriz de hibridación de sondas para examinar largas extensiones de ADN en una muestra y en el control para identificar cambios de bases entre las secuencias preparando matrices lineales de sondas superpuestas secuenciales. Esta etapa permite la identificación de mutaciones puntuales. Se sigue una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas usando matrices de sondas especializadas más pequeñas complementarias para todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutaciones está compuesta por conjuntos de sondas en paralelo, una complementaria al gen natural y la otra complementaria al gen mutante.

**[0083]** Otros procedimientos para detectar mutaciones en un polipéptido neurológico diana incluyen aquellos en los que se usa protección con respecto a los agentes de corte para detectar bases mal apareadas en heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN (Myers y col., 1985). En general, la técnica de "corte mal apareado" empieza por proporcionar heterodúplex formados por hibridación de ARN o ADN (marcado) que contiene la secuencia de polipéptidos neurológicos diana naturales con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido de una muestra. Los

dúplex bicatenarios son tratados con un agente que corta regiones monocatenarias del dúplex como, por ejemplo, las que proceden de los errores de apareamiento de pares de bases entre las cadenas de control y de muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN pueden ser tratados con ARNasa y los híbridos de ADN/ADN tratados con nucleasa S<sub>1</sub> para digerir enzimáticamente las regiones mal apareadas. En otras formas de realización, los dúplex de  
 5 ADN/ADN o ARN/ADN pueden ser tratados con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir regiones mal apareadas. A continuación se separa el material digerido por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturalizantes para determinar el sitio de mutación (Grompe y col., 1989; Saleeba y Cotton, 1993). El ADN o ARN de control puede ser marcado para detección.

10 **[0084]** Las reacciones de corte en mal apareamiento pueden emplear uno o más polipéptidos que reconocen pares de bases mal apareadas en ADN bicatenario (reparación de mal apareamiento de ADN) en sistemas definidos para detectar e identificar mutaciones puntuales en un ADNc de polipéptido neurológico diana obtenido de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* corta A en errores de apareamiento G/A y la timidina ADN glicosilasa de células HeLa corta T en errores de apareamiento G/T (Hsu y col., 1994). El dúplex es tratado con una  
 15 enzima de reparación de mal apareamiento de ADN, y los productos de corte, si los hubiera, pueden detectarse a partir de protocolos de electroforesis o similares (Modrich y col., patente de EE.UU. nº 5.459.039, 1995).

**[0085]** Pueden usarse alteraciones de la movilidad electroforética para identificar mutaciones en un gen neurológico diana. Por ejemplo, puede usarse polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP) para detectar  
 20 diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos naturales y mutantes (Cotton, 1993; Hayashi, 1992; Orita y col., 1989). Los fragmentos de ADN monocatenario de ácidos nucleicos de polipéptido neurológico diana de muestra y de control son desnaturalizados y a continuación renaturalizados. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia; la alteración resultante en movilidad electroforética permite la detección incluso de un cambio en una sola base. Los fragmentos de ADN pueden ser marcados o detectados con  
 25 sondas marcadas. La sensibilidad de ensayo puede mejorarse usando ARN (en lugar de ADN), en cuyo caso la estructura secundaria es más sensible a cambios de secuencia. El procedimiento puede usar análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias sobre la base de los cambios en la movilidad electroforética (Keen y col., 1991).

30 **[0086]** La migración de fragmentos mutantes o naturales puede ser sometida a ensayo usando electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE; Myers y col., 1985). En DGGE, el ADN es modificado para evitar la desnaturalización completa, por ejemplo añadiendo una cola GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión por PCR. También puede usarse un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturalizante para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra (Rossiter y Caskey,  
 35 1990).

**[0087]** Entre los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales se incluye hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores de oligonucleótidos en los que la mutación conocida se coloca centralmente y a continuación  
 40 se hibrida en ADN diana en condiciones que permiten la hibridación sólo si se encuentra un apareamiento perfecto (Saiki y col., 1986; Saiki y col., 1989). Dichos oligonucleótidos específicos de alelos son hibridados a ADN diana amplificado por PCR o una serie de mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos se fijan a la hibridación de membrana y se hibridan con ADN diana marcado. Alternativamente, puede usarse la tecnología de amplificación específica de alelos que depende de la amplificación selectiva de PCR. Los cebadores de oligonucleótidos para  
 45 amplificaciones específicas pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de manera que la amplificación depende de la hibridación diferencial (Gibbs y col., 1989)) o en el extremo 3' de un cebador en el que, en condiciones apropiadas, el error de apareamiento puede impedir, o reducir, la extensión de la polimerasa (Prosser, 1993). Pueden introducirse nuevos sitios de restricción en la región de la mutación para crear detección basada en el corte (Gasparini y col., 1992). La amplificación puede realizarse también usando ligasa *Taq* (Barany,  
 50 1991). En dichos casos, el ligamiento tiene lugar sólo si existe un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5', lo que permite la detección de una mutación conocida por valoración de la amplificación.

**[0088]** Otro aspecto de la invención proporciona procedimientos para determinar la actividad de un polipéptido neurológico o la expresión de un ácido nucleico en un individuo para seleccionar los agentes terapéuticos  
 55 o profilácticos apropiados específicamente para ese individuo (farmacogenómica). La invención proporciona una herramienta excepcionalmente poderosa en la que es posible desarrollar *in vitro* grandes cantidades de células a partir de pacientes y a continuación, si se desea, inducir la diferenciación en el tipo de célula en el que se manifiesta la enfermedad o el trastorno. La farmacogenómica permite la selección de modalidades (por ejemplo, fármacos, alimentos) para tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo basándose en el genotipo del individuo (por  
 60 ejemplo, el genotipo del individuo para determinar la capacidad del individuo para responder a un agente en particular). Otro aspecto de la invención se refiere a la supervisión de la influencia de modalidades (por ejemplo, fármacos, alimentos) en la expresión o la actividad del polipéptido neurológico el polipéptido neurológico en ensayos

clínicos.

*Ensayos de diagnóstico*

5 **[0089]** Un procedimiento de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido neurológico diana en una muestra biológica implica la obtención de una muestra biológica a partir de un sujeto y la puesta en contacto de la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el polipéptido neurológico o ácido nucleico de manera que la presencia del polipéptido neurológico es confirmada en la muestra. Un agente para detectar un mensaje de polipéptido neurológico o ADN es una sonda de ácido nucleico marcado que hibrida  
10 específicamente el ADN genómico o ARNm diana. Un agente para detectar un polipéptido neurológico puede ser un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo con un marcado detectable. Los Ac pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento (por ejemplo, F<sub>ab</sub> o F(ab')<sub>2</sub>).

*Ensayos de pronóstico*

15 **[0090]** Los procedimientos de diagnóstico pueden usarse además para identificar a sujetos que tienen, o están en riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrante del polipéptido neurológico, como obesidad o complicaciones relacionadas con la obesidad. Los ensayos de pronóstico pueden usarse para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno. Un  
20 procedimiento para identificar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrante del polipéptido neurológico incluiría una muestra de prueba obtenida de un sujeto y la detección del polipéptido neurológico o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico). Una muestra de prueba es una muestra biológica obtenida de un sujeto. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser un líquido biológico (por ejemplo, suero), una muestra celular o un tejido.

25 **[0091]** Los ensayos de pronóstico pueden usarse para determinar si a un sujeto se le puede administrar una modalidad (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, alimento, etc.) para tratar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido neurológico. Dichos procedimientos pueden usarse para determinar si un sujeto puede ser tratado  
30 eficazmente con un agente para un trastorno, como enfermedad de Parkinson. Los procedimientos para determinar si un sujeto puede ser tratado eficazmente con un agente incluyen la obtención de células madre olfativas de un paciente y la detección de un polipéptido neurológico o ácido nucleico diana (por ejemplo, cuando la presencia del polipéptido neurológico o ácido nucleico es diagnóstica para un sujeto al que puede administrársele el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del polipéptido neurológico). Las células madre  
35 aisladas pueden ser tratadas con uno o más factores de diferenciación antes de someter a ensayo la presencia o actividad del polipéptido neurológico o ácido nucleico.

**[0092]** Las lesiones genéticas en un polipéptido neurológico diana pueden usarse para determinar si un sujeto está en riesgo de sufrir un trastorno, como enfermedad de Parkinson. Los procedimientos incluyen la  
40 detección, en células madre olfativas (o células diferenciadas que proceden de las células madre olfativas) del sujeto, de la presencia o ausencia de una lesión genética caracterizada por una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica el polipéptido neurológico diana polipéptido o la expresión defectuosa del polipéptido diana.

F. Cultivos y kits para probar compuestos farmacéuticos

45 **[0093]** La célula madre de la presente invención puede obtenerse a partir de donantes con trastornos neurodegenerativos singulares, como trastorno bipolar, esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica. Una célula madre de NeO puede aislarse a partir de un donante, incluyendo un cadáver, o de un donante con un trastorno neurodegenerativo singular. Las células madre neurológicas del donante pueden mantenerse en cultivo, y puede dar  
50 lugar a una población de células diferenciadas o no diferenciadas que serían útiles en la prueba y el desarrollo de compuestos farmacéuticos como tratamientos para cualquier enfermedad o para la enfermedad especial del donante. Estas células pueden incluirse en un kit, recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones de uso. Cuando la invención se comercializa como un kit, las células madre de NeO también pueden congelarse y a continuación descongelarse inmediatamente antes de su uso. La congelación puede permitir el almacenamiento a  
55 largo plazo sin perder la función de célula madre.

**[0094]** Los fármacos candidatos potenciales pueden ponerse en contacto con la célula madre o la progenie diferenciada y a continuación puede examinarse la célula en busca de cambios como el aumento o la disminución de la expresión de proteínas.

60 a) Recipientes o vasos

**[0095]** Las condiciones estándar de congelación de células pueden determinarse basándose en el tipo de célula. Un procedimiento común es sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 0,5%-20%, y preferentemente DMSO al 10% y más preferentemente DMSO al 5% (o alguna otra sal capaz de inhibir la formación de cristales de hielo) en suero al 100%, medios celulares o medios celulares sin suero. Las células son minuciosamente recogidas, lavadas, 5 concentradas a una densidad adecuada (generalmente, una densidad alta), y a continuación colocadas en viales. A continuación, las células se colocan en un recipiente aislado (por ejemplo, una caja de Styrofoam) y se colocan a -20°C en un congelador durante entre 3 horas y una semana, o incluso más, cuando es necesario o conveniente. A continuación, las células son transferidas a nitrógeno líquido para su almacenamiento permanente. Las células pueden expedirse en hielo seco.

10

**[0096]** Para reiniciar el cultivo, por lo general las células son descongeladas rápidamente y se colocan inmediatamente en medios de cultivo precalentados.

b) Materiales didácticos

15

**[0097]** Los kits pueden suministrarse también con materiales didácticos. Las instrucciones pueden imprimirse en papel u otro sustrato, y/o pueden suministrarse como un medio legible por medios electrónicos, como un disco flexible, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de vídeo, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar asociadas físicamente con el kit; en su lugar, es posible dirigir a un usuario a una página web de internet 20 especificada por el fabricante o el distribuidor del kit, o suministrarse en forma de correo electrónico.

## EJEMPLOS

### A. Cultivos celulares primarios de cadáveres humanos

25

**[0098]** Se empleó un enfoque de rinotomía lateral para extraer de la mucosa olfativa los tejidos subyacentes de cadáveres de 4 a 18 horas post-mórtem. A continuación se recogió el tejido en una solución fría de tripsina al 0,05% en solución salina equilibrada de Hank libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS; GIBCO, Grand Island, NY). El NeO se extrajo de sus tejidos de soporte por microdissección en HBSS en frío, se troceó en piezas de  $1 \text{ mm}^3$ , y se lavó 30 repetidamente con varios cambios de HBSS nueva. Después de una nueva suspensión en HBSS que contenía tripsina al 0,05% seguido por 4 lavados con desoxirribonucleasa al 0,01% en HBSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , las células se incubaron durante 90 minutos a 37°C con suave burbujeo de  $\text{O}_2$  para permitir la disociación. Se centrifugó el tejido y las células individuales; se dispersó el sedimento por trituración a través de una pipeta de Pasteur pulida al fuego y se volvió a suspender en medio de crecimiento que consistía en DMEM y F12 (1:1) y suero fetal bovino 35 (FBS) inactivado por calor al 10% (todos los componentes de los medios proceden de GIBCO, Grand Island, NY). Se sembraron las células en placas de plástico recubiertas con laminina-fibronectina, se incubaron en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% en aire, y se nutrieron cada 3-4 días.

### B. Subcultivos para inmunofluorescencia

40

**[0099]** Se sembraron células en una concentración de  $4 \times 10^4$  células/pocillo en cubreobjetos no recubiertos prelavados de 22 mm de diámetro en medio epitelial olfativo (OEM) que consiste en Medio Esencial Mínimo al 90% con sales de Hanks con L-glutamina, FBS al 10% y 1 ml de 10 mg/dl de gentamicina y se incubó durante un mínimo de 2 días a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% humidificado en aire para permitir la fijación antes de la 45 inmunolocalización.

### C. Localización inmunofluorescente

**[0100]** Se aclararon los cultivos con tampón citoesquelético (CB): MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico), 50 1,95 mg/ml; NaCl, 8,76 mg/ml; EGTA 5 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM; glucosa, 0,9 mg/ml, pH 6,1) y se fijó durante 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 3% en CB. Se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,2% (SIGMA, St. Louis, MO) o acetona en frío (preferentemente a aproximadamente 4°C), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de unión no específicos se bloquearon durante un tratamiento de 1 hora con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en Solución Salina Tamponada con Tris (TBS): Tris, 2,42 mg/ml; NaCl, 8,9 55 mg/ml; EGTA 2 mM;  $\text{MgCl}_2$  2 mM; pH 7,5. Para facilitar la identificación de células no reactivas, se usó diclorhidrato de 4'6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI): 1:500; 2 mg/ml (Molecular Probes, Eugene, OR) para tinción en vivo de ADN en cada célula, después de lo cual se incubaron las células durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios enumerados en la Tabla 1.

60

**[0101]** Después de un lavado extenso con TBS, se incubaron las células en el cubreobjetos durante 1 hora a 37°C con los siguientes anticuerpos secundarios: anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con fluoresceína, anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo conjugada con fluoresceína, anticuerpo de cabra

dirigido contra IgG de ratón conjugada con rojo de Texas, anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo conjugada con rojo de Texas (todas diluidas a 1:40, FITC de Cappel, West Chester, PA; Rojo de Texas de Molecular Probes, Eugene, OR). Los procedimientos inmunohistoquímicos se establecieron en el laboratorio de los autores. Los controles (por omisión) de sólo anticuerpos preabsorbidos y secundarios aseguraron la especificidad de la reacción. Se usó la línea celular de feocromocitoma que responde a NGF de rata (PC12; American Type Tissue Culture Collection; Manassas, OH) como control positivo para el receptor de baja afinidad p75<sup>NGFr</sup> y los anticuerpos Trk. Como control negativo se usó la línea de fibroblastos 3T3. Los cubreobjetos se montaron con Mowiol 4-88 (HOECHST CELANESE, Sommerville, NJ) y se observaron con óptica de fluorescencia usando el microscopio confocal Leica 4d equipado con láseres UV y de argón/criptón. Para facilitar la comparación directa de los tratamientos, todos los voltajes de los fotomultiplicadores se mantuvieron constantes durante los experimentos individuales. Las imágenes confocales que representaban secciones ópticas de 1 µm se digitalizaron a 1.024 x 1.024 píxeles y se presentaron como proyecciones de densidad máxima.

#### D. Microscopia electrónica

15 **[0102]** Se lavaron secciones de tejido con tampón de cacodilato de pH 7,4, se fijaron durante 1, hora en glutaraldehído al 2.5% en tampón de cacodilato 0,1 M, se posfijaron durante 30 minutos en tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato, se deshidrataron a través de una serie graduada de etanoles seguido por óxido de propileno y se integraron en LX-112 (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Ft. Washington, PA). Se recortaron los bloques y se cortaron secciones gruesas y finas y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes del examen en una microscopia electrónica de transmisión Philips CM10 o CM12.

#### E. AMPc

25 **[0103]** Un análisis de los efectos de AMPc en subcultivos de neuroesferas mejora la comprensión de lo que podrían suponer los agentes tróficos. Se sembraron cultivos celulares en densidades idénticas ( $4 \times 10^4$  células/pocillo) y se mantuvieron en medio epitelial olfativo (OEM; Medio Esencial Mínimo al 90% con sales de Hanks con L-glutamina, FBS al 10% y 1 ml de 10 mg/dl de gentamicina) durante 72 horas y en OEM suplementado con dibutilil-AMPc 2,5 mM. Se procesaron cultivos para inmunofluorescencia usando anticuerpos frente a actina, isotipo III de la  $\beta$ -tubulina y  $\alpha$ -internexina. En un plazo de 24 horas de adición de AMPc a los cultivos, se observaron menos figuras mitóticas por campo y tuvo lugar formación de protuberancias. La AMPc redujo la división celular y aumentó la formación de protuberancias. La restricción y diferenciación de linaje producida por exposición de 24 horas a dibutilil-AMPc muestra que algunas células formadoras de neuroesferas de NeO conservan la capacidad de formar neuroblastos.

#### F. Ensayo con MTT

35 **[0104]** Se usó un ensayo comercial (SIGMA, St. Louis, MO) para evaluar la viabilidad celular valorando la reducción de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) por deshidrogenasa mitocondrial presente en células viables. Un aumento en el valor de MTT se correspondía con un aumento en el número de células. Las células se sembraron en una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, se añadió MTT igual al 10% del volumen de cultivo a cada pocillo. Se incubaron las placas a 37°C durante 4 horas más y se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo con MTT de viabilidad celular se usó para determinar si la viabilidad se mantenía constante a través de varios pasos. No se detectaron diferencias significativas (la significación se estableció en  $P < 0,05$  usando ANOVA).

#### G. Resultados

50 **[0105]** El NeO recogido 4-18 horas post-mórtem mostró un alto nivel de integridad ultraestructural. Se observaron vesículas olfativas (VO) con cinocilios no móviles intactos. Las células adyacentes con cilios móviles (9+2) se empaquetaron con mitocondrias apicales y formaron uniones densas con las NRO, lo que refleja su origen epitelial común. Dentro de la primera semana de cultivo, la mayoría de las células viables se fijaron a la superficie y adoptaron formas bipolares, fusiformes, estrelladas o esféricas. La población heterogénea incluía NRO, CEO, células de soporte epiteliales, fibroblastos y células pluripotentes. La presencia de cuatro tipos de células específicos se confirmó mediante inmunolocalización de antígenos específicos del linaje y por análisis ultraestructural. Las NRO se identificaron por sus neurofilamentos y microtúbulos compuestos por isotipo III de la  $\beta$ -tubulina que se extendían en todas sus protuberancias, así como la presencia de MAP2ab.

60 **[0106]** Las CEO negativas en queratina estaban con frecuencia tan estrechamente asociadas con las NRO que en ocasiones sus límites celulares podrían detectarse sólo por límites de microscopia electrónica. La población de soporte epitelial consistía en células positivas a queratina de contacto inhibido y altamente aplanadas que formaban nidos de monocapas.

**[0107]** Las NRO y las CEO se vacuolizaron, retrajeron sus protuberancias y murieron después de la tercera semana *in vitro*. En aproximadamente el 5 al 10% de los cultivos, surgió una población de células mitóticamente activas. Estas células se duplicaban cada día, eran escasamente adherentes y parecían desarrollarse en semisuspensión. Se les permitió proliferar sin perturbaciones durante 2 semanas adicionales durante las cuales formaron esferas compuestas por 20 a 80 células aproximadamente (fig. 1). La densidad de siembra inicial no alteró el tiempo *in vitro* requerido para la formación de esferas. Las escasas células no asociadas directamente con una esfera específica aparecieron habitualmente por pares. Las esferas se recogieron y se dispersaron mecánicamente en células individuales, se lavaron repetidamente y se centrifugaron para extraer los residuos celulares. Estos cultivos se han mantenido durante veinte meses aproximadamente y se han sometido aproximadamente a 200 pasos.

**[0108]** Se sondearon las células con anticuerpos específicos del linaje después de varios pasos (fig. 2). La mayoría de las células fueron positivas para uno o más de los siguientes marcadores neuronales: isotipo III de la  $\beta$ -tubulina, NCAM y MAP2ab (fig. 2). Fue evidente una red microtubular específica de neuronas compleja incluso en células mitóticamente activas. Se detectó fluorescencia positiva para NCAM en proyecciones espinosas a lo largo de las protuberancias de células que adoptaron formas bipolares o multipolares (fig. 2). MAP2ab se localizó en estructuras de tipo rosquilla y segmentos lineales cortos (fig. 2).

**[0109]** Aproximadamente el 10% de las células mostraron negatividad para todos los marcadores neuronales evaluados. Algunas de las células negativas neuronales fueron inmunorreactivas con A2B5 (AcM que se hizo reaccionar con un componente FITC), un anticuerpo frente a un gangliósido enriquecido en membranas gliales, y/o GFAP (AcP que se hizo reaccionar con rojo de Texas) según se mostró mediante experimentos con doble marcado (fig. 3a). La mayoría de estas células parecían estar en mitosis. El material fluorescente era punteado y se distribuyó en la superficie celular y en el citoplasma pericarial. Ocasionalmente en células extendidas en pocillos, se observó una alta reactividad a GFAP concentrada dispuesta en una matriz circular perinuclear de fluorescencia globular (fig. 3b). No se encontraron células positivas para RIP o nestina. Además las células subcultivadas a partir de neuroesferas no fueron reactivas ni con un anticuerpo policlonal frente a queratina ni con un anticuerpo monoclonal frente a citoqueratinas 5/6. Todos los resultados inmunológicos se mantuvieron similares durante más de 200 pasos.

**[0110]** Aproximadamente 24 horas después de la exposición a dibutiril-AMPC, se observaron menos neuroesferas mitóticas y tuvo lugar formación de protuberancias. La adición de dibutiril-AMPC redujo la división celular y aumentó la formación de protuberancias. Las fig. 4a y 4c se tomaron con óptica Nomarski. Al cabo de 72 horas se formaron células bipolares y multipolares con protuberancias positivas de  $\beta$ -tubulina III de 40  $\mu$ M de longitud (fig. 4). La alfa-internexina, un marcador neuronal que aparece antes de la formación de neurofilamentos en neuronas en desarrollo, se localizó en una célula portadora de protuberancias ocasionales. En cambio, los cultivos mantenidos en ausencia del nucleótido o butirato de sodio (5 mM) se mantuvieron altamente mitóticas, tuvieron una neuritogénesis mínima y fueron negativas en cuanto a  $\alpha$ -internexina.

**[0111]** Se usó el ensayo con MTT de viabilidad celular para determinar si la viabilidad se mantenía constante a través de varios pasos. No se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**[0112]** La naturaleza de las células formadoras de neuroesferas se caracterizó además por la determinación de la presencia y la distribución de una familia de cinasas receptoras de neurotrofina (Trk A, B, C y pan). La mayoría de las células fueron reactivas para Trk A y B, pero negativas para Trk C. Trk A se restringió a una pequeña población de células basales hasta su aceleración por bulbectomía. Trk B está ampliamente distribuida en neuronas inmaduras y se hace más abundante cuando las neuronas maduran después de la innervación diana. Trk C está presente sólo en NRO altamente diferenciadas. Ocasionalmente, se observaron células que eran positivas exclusivamente para Trk A o B, mientras que una población más pequeña se mantuvo inmunonegativa para todas las Trk, incluyendo un anticuerpo monoclonal que reconocía las tres. Trk A tenía la inmunorreactividad más intensa. En condiciones de bajo suero (< 2%), la inmunorreactividad de Trk A tuvo lugar en placas que en algunas células se agregaron para formar cápsulas polares (fig. 5). En cambio, la inmunorreactividad de Trk B punteadas se distribuyó por toda la superficie y se extendió a las regiones distales de las protuberancias (fig. 5). La población formadora de neuroesferas fue sondeada además con anticuerpo en cuanto al receptor NGF de baja afinidad humana p75<sup>NGFr</sup> (fig. 5). No se observaron células positivas. El doble marcado mostró la ausencia de inmunorreactividad de p75<sup>NGFr</sup> incluso en las células positivas Trk A (fig. 5). Los fibroblastos 3T3 sirvieron como un control negativo para Trk A.

**[0113]** Además, aunque el fenotipo por omisión de la célula madre olfativa humana es normalmente neuronal, las células también mostraron ocasionalmente expresión glial y epitelial. Se sabe que las células B104 (BCM) promueven oligoprogenitores y producen "oligoesferas" (V. Avellana-Adalid, y col., 1996), en células no humanas (es decir, se ha mostrado que tienen esta propiedad en ratones) y, por tanto, se añadió a los medios de cultivo de neuroesferas de NeO. La exposición a BCM dio como resultado una formación de tipo oligoesferas en un plazo de

72 horas y el efecto dependía de la dosis. Las células eran de tipo oligoesferas porque mostraron un nivel incrementado de células inmunopositivas para A2B5, un marcador glial y de oligodendrocitos.

## J. Ejemplos predictivos

5

### 1. Tratamiento de enfermedad de Parkinson

**[0114]** Inicialmente, se obtiene tejido de NeO del paciente que sufre enfermedad de Parkinson, o de un donante histocompatible. Preferentemente el donante está emparentado con el paciente, y más preferentemente el donante es un familiar inmediato del paciente. Preferentemente el tejido de NeO se obtiene a través de una biopsia endoscópica.

**[0115]** A continuación se desarrolla el tejido de NeO en cultivo y se aíslan neuroesferas a partir del cultivo. Opcionalmente, puede añadirse dibutiril-AMPC, varios sustratos y factores de crecimiento neurotróficos para iniciar la diferenciación de las células de neuroesferas.

**[0116]** A continuación, pueden trasplantarse las células, por ejemplo, inyectándolas en la sustancia negra del encéfalo. Una vez que las neuronas están presentes en el encéfalo del individuo afectado, producirán dopamina, y con ello ayudarán a tratar la enfermedad. Una ventaja de este procedimiento es que puede repetirse, cuando se necesite, y con ello alivia parte del sufrimiento del paciente. Opcionalmente, las células pueden seleccionarse para la excreción de dopamina antes del trasplante. Opcionalmente, las células pueden diferenciarse antes del trasplante.

### 2. Tratamiento de esclerosis múltiple

**[0117]** Inicialmente, se obtiene tejido de NeO del paciente que sufre esclerosis múltiple, o de un donante histocompatible. Preferentemente el donante está emparentado con el paciente, y más preferentemente el donante es un familiar inmediato del paciente. Preferentemente el tejido de NeO se obtiene a través de una biopsia endoscópica.

**[0118]** A continuación se desarrolla el tejido de NeO en cultivo y se aíslan células de tipo oligoesferas a partir del cultivo. Opcionalmente, puede añadirse dibutiril-AMPC y factores de crecimiento para iniciar la diferenciación de las células de tipo oligoesfera.

**[0119]** A continuación pueden trasplantarse las células, por ejemplo, inyectándolas en la médula espinal, el encéfalo u otra área semejante que tenga una placa de esclerosis. Una vez que las células trasplantadas están presentes en el individuo afectado, producirán mielina, y con ello ayudarán a tratar la enfermedad. Una ventaja de este procedimiento es que puede repetirse, en caso necesario, y con ello aliviar parte del sufrimiento del paciente. Opcionalmente, pueden seleccionarse células para la producción de mielina antes del trasplante. Opcionalmente, las células pueden diferenciarse antes del trasplante.

40

## Referencias

### [0120]

**[0120]** D.R. Archer, P.A. Cuddon, D. Libsitz, L.D. Duncan. 1997. Myelination of canine central nervous system by glial cell transplantation: A model for repair of human myelin disease. *Nat. Med.* 3:54-59.

V. Avellana-Adalid, B. Nait-Oumesmar, F. Lachapelle, A. Baron-Van Evercooren. 1996. Expansion of rat oligodendrocyte progenitors and proliferative "oligospheres" that retain differentiation potential. *J. Neurosci. Res.* 45:558-570.

A.L. Calof y D.M. Chikaraishi. 1989. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: Proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron.* 3:115-127.

**[0120]** A.L. Calof, J.S. Mumm, P.C. Rim, J. Shou. 1998. The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. *J. Neurobiol.* 36(2):190-205.

R. Doucette. 1995. Olfactory ensheathing cells: Potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol. Histopathol.* 10:503-507.

60

F. Feron, A. Mackay-Sim, J.L. Andrieu, I. Matthaei, A. Holley, G. Sicard. 1999. Stress induces neurogenesis in nonneuronal cell cultures of adult olfactory epithelium. *Neuroscience.* 88:571-583.

- A. Gritti, E.A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D.J. Morassutti, F. Roisen, D.D. Nickel, A.L. Vescovi. 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16:1091-1100.
- 5 E. Harlow y D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 726pp.
- E. Harlow, y D. Lane. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 10 A.J. Kalyani, D. Piper, T. Mujatba, M.T. Lucero, M.S. Rao. 1998. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci.* 18(19):7856-7868.
- 15 V.G. Kukekov, E.D. Laywell, O. Suslov, K. Davies, B. Scheffler, L.B. Thomas, T.F. O'Brien, M. Kusakabe, D.A. Steindler. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp. Neurol.* 156:333-344.
- E.D. Laywell, V.G. Kukekov, D.A. Steindler. 1999. Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp. Neurol.* 156:430-433.
- 20 Y. Li, P.M. Field, G. Raisman. 1997. Repair of adult rat corticospinal tracts by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science.* 277:2000-2002.
- 25 N. Liu, C.B. Shields, F.J. Roisen. 1998. Primary culture of adult mouse olfactory receptor neurons. *Exp. Neurol.* 151:173-183.
- K.P.A. MacDonald, W.G. Murrell, P. Bartlett, G.R. Bushell, A. Mackay-Sim. 1996. FGF2 promotes neuronal differentiation in explant cultures of adult and embryonic mouse olfactory epithelium. *J. Neurosci. Res.* 44:27-39.
- 30 N.K. Mahanthappa y G.A. Schwarting. 1993. Peptide growth factor control of olfactory neurogenesis and neuron survival in vitro: Roles of EFG and TGF-beta's. *Neuron.* 10:293-305.
- J. K. McEntire y S.K. Pixley. 2000. Olfactory receptor neurons in partially purified epithelial cell cultures Comparison of techniques for partial purification and identification of insulin as an important survival factor. *Chem. Senses.* 25: 93-101.
- 35 R MacKay. 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 276:66-71.
- 40 T. Mujaba, M. Mayer-Proschel, M.S. Rao. 1998. A common neural progenitor for the CNS and PNS. *Dev. Biol.* 200: 1-15.
- W. Murrell, G.R. Bushell, J. Livesey, J. McGrath, K.P.A. Mac-Donald, P.R. Bates, A. Mackay-Sim. 1996. Neurogenesis in adult human. *NeuroReport.* 7:1189-1194.
- 45 M.K. Njenga y M. Rodriguez. 1996. Animal models of demyelination. *Curr. Opin. Neurol.* 9:1164-1519.
- S.K. Pixley. 1992. CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells. *Neuron.* 8:1191-1204.
- 50 S.K. Pixley. 1992. Purified cultures of keratin-positive olfactory epithelial cells: Identification of a subset as neuronal supporting (sustentacular) cells. *J. Neurosci. Res.* 31:693-707.
- S.K. Pixley, M. Bage, D. Miller, M.L. Miller, M. Shi, L. Hastings. 1994. Olfactory neurons in vitro show phenotypic orientation in epithelial spheres. *NeuroReport.* 5:543-548.
- 55 A. Ramon-Cueto, G.W. Plant, J. Avila, M.B. Bunge. 1998. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci.* 18(10):3808-3815.
- 60 M.S. Rao, M. Noble, M. Mayer-Proschel. 1998. A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:3996-4001.

- M. Satch y M. Takeuchi. 1995. Induction of NCAM expression in mouse olfactory keratin-positive basal cells in vitro. *Brain Res.* 87:111-119.
- R. Schade, C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, y col. 1996. The production of avian(egg yolk) antibodies IgY. The  
5 report and recommendations of ECVAM workshop. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*. 24:925-934.
- L.S. Shihabuddin, J. Ray, F.H. Gage. 1997. FGF2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp. Neurol.* 148:577-586.
- 10 J.S. Sosnowski, M. Gupta, K.H. Reid, F.J. Roisen. 1995. Chemical traumatization of adult mouse olfactory epithelium in situ stimulates growth and differentiation of olfactory neurons in vitro. *Brain Res.* 703:37-48.
- R. Tennent y M.I. Chuah. 1996. Ultrastructural study of ensheathing cells in early development of olfactory axons. *Dev. Brain Res.* 95:135-139.
- 15 A.L. Vescovi, E. A. Parati, A. Gritti, P. Poulin, M. Ferrario, E. Wanke, P. Prolichsthal-Scheoller, L. Cova, M. Arcellan-Panilio, A. Colombo, R. Galli. 1999. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp. Neurol.* 156: 71-83.
- 20 B. Wolozin, P. Lesch, R. Lebovits, T. Sunderland. 1993. Olfactory neuroblasts from Alzheimer donors: studies on APP processing and cell regulation. *Biol. Psychiatry.* 34:824-838.
- B. Wolozin, T. Sunderlan, B. Zheng, J. Resau, B. Dufy, J. Barker, R. Swerdlow, H. Coon. 1992. Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium. *J. Mol. Neurosci.* 3:137-146.
- 25 S.C. Zhang, C. Lundberg, D. Lipsitz, L.T. O'Connor, I.D. Duncan. 1998a. Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *J. Neurocytol.* 27:475-489.
- EPO 402226. 1990. Transformation vectors for yeast *Yarrowia*.
- 30 Ausubel, F.M., R. Brent, RE. Kingston, D.D. Moore, y col. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Barany, F. 1991. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:189-93.
- 35 Carell, T., E.A. Wintner, y J. Rebek Jr. 1994a. A novel procedure for the synthesis of libraries containing small organic molecules. *Angewandte Chemie International Edition.* 33:2059-2061.
- 40 Carell, T., E.A. Wintner, y J. Rebek Jr. 1994b. A solution phase screening procedure for the isolation of active compounds from a molecular library. *Angewandte Chemie International Edition.* 33:2061-2064.
- Case, M.E., M. Schweizer, S.R. Kushner, y N.H. Giles. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:5259-63.
- 45 Cho, C.Y., E.J. Moran, S.R. Cherry, J.C. Stephans, y col. 1993. An unnatural biopolymer. *Science.* 261:1303-5.
- Cotton, R.G. 1993. Current methods of mutation detection. *Mutat Res.* 285:125-44.
- 50 Cronin, M.T., R.V. Fucini, S.M. Kim, R.S. Masino, y col. 1996. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat.* 7:244-55.
- Cull, M.G., J.F. Miller, y P.J. Schatz. 1992. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:1865-9.
- 55 Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, y W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:6378-82.
- de Louvencourt, L., H. Fukuhara, H. Heslot, y M. Wesolowski. 1983. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. *J Bacteriol.* 154:737-42.
- 60 Devlin, J.J., L.C. Panganiban, y P.E. Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding

- molecules. *Science*. 249:404-6.
- DeWitt, S.H., J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder, y col. 1993. "Diversomers": an approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:6909-13.
- 5 Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, y col. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol*. 222:301-10.
- Fieck, A., D.L. Wyborski, y J.M. Short. 1992. Modifications of the *E. coli* Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res*. 20:1785-91.
- 10 Fler, R, P. Yeh, N. Amellal, I. Maury, y col. 1991. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (N Y)*. 9:968-75.
- 15 Fodor, S.P., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, y col. 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*. 364:555-6.
- Gallop, M.A., R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, y col. 1994. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem*. 37:1233-51.
- 20 Gallop, M.A., R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, y col. 1994. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem*. 37:1233-51.
- Gasparini, P., A. Bonizzato, M. Dognini, y P.F. Pignatti. 1992. Restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) for the probeless detection of hidden genetic variation: application to the study of some common cystic fibrosis mutations. *Mol Cell Probes*. 6:1-7.
- 25 Gibbs, R.A., P.N. Nguyen, y C.T. Caskey. 1989. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. *Nucleic Acids Res*. 17:2437-48.
- Grompe, M., D.M. Muzny, y C.T. Caskey. 1989. Scanning detection of mutations in human ornithine transcarbamoylase by chemical mismatch cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:5888-92.
- 30 Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genetic and Analytical Techniques Applications*. 9:73-79.
- Houghten, R.A., J.R. Appel, S.E. Blondelle, J.H. Cuervo, y col. 1992. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotechniques*. 13:412-21.
- 35 Hsu, I.C., Q. Yang, M.W. Kahng, y J.F. Xu. 1994. Detection of DNA point mutations with DNA mismatch repair enzymes. *Carcinogenesis*. 15:1657-62.
- 40 Keen, J., D. Lester, C. Inglehearn, A. Curtis, y col. 1991. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet*. 7:5.
- Kelly, J.M., y M.J. Hynes. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo J*. 4:475-9.
- 45 Kozal, M.J., N. Shah, N. Shen, R. Yang, y col. 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med*. 2:753-9.
- Ladner, R.C., S.K. Guterman, B.L. Roberts, W. Markland, y col. Patente de EE.UU. nº 5.223.409. 1993. Directed evolution of novel binding proteins.
- Lam, K.S., S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, y col. 1991. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Nature*. 354:82-84.
- 55 Modrich, P., S.-S. Su, K.G. Au, y R.S. Lahue. Patente de EE.UU. nº 5.459.039. 1995. Methods for mapping genetic mutations.
- Myers, R.M., Z. Larin, y T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science*. 230:1242-6.
- 60 Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, y col. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel

- electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:2766-70.
- Prosser, J. 1993. Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol.* 11:238-46.
- 5 Rossiter, B.J., y C.T. Caskey. 1990. Molecular scanning methods of mutation detection. *J Biol Chem*. 265:12753-6.
- Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, y col. 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 324:163-6.
- 10 Saiki, R.K., P.S. Walsh, C.H. Levenson, y H.A. Erlich. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6230-4.
- Saleeba, J.A., y R.G. Cotton. 1993. Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. *Methods Enzymol*. 217:286-95.
- 15 Scott, J.K., y G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 249:386-90.
- Sreekrishna, K., R.H. Potenz, J.A. Cruze, W.R. McCombie, y col. 1988. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol*. 28:265-78.
- 20 Tilburn, J., C. Scazzocchio, G.G. Taylor, J.H. Zabicky-Zissman, y col. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 26:205-21.
- Wyborski, D.L., L.C. DuCoeur, y J.M. Short. 1996. Parameters affecting the use of the lac repressor system in eukaryotic cells and transgenic animals. *Environ Mol Mutagen*. 28:447-58.
- 25 Wyborski, D.L., y J.M. Short. 1991. Analysis of inducers of the *E. coli* lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res*. 19:4647-53.
- 30 Yelton, M.M., J.E. Hamer, y W.E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:1470-4.
- Zuckermann, RN., E.J. Martin, D.C. Spellmeyer, G.B. Stauber, y col. 1994. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse N-(substituted)glycine peptoid library. *J Med Chem*. 37:2678-85.
- 35

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de aislamiento de células madre de neuroepitelio olfativo humano, que comprende:
- 5 el cultivo de tejido humano a partir de neuroepitelio olfativo recogido de un donante vivo adulto como población de células adherentes para inducir la formación de una población de células en suspensión, en el que dicha población de células en suspensión comprende neuroesferas, en el que dicha población de células en suspensión comprende una o más células que son todas inmunorreactivas para la nestina y el isotipo III de la beta-tubulina;
- 10 la resiembra de dicha población de células en suspensión, en el que dicha resiembra comprende la recogida de dicha población de células en suspensión que comprende neuroesferas, la dispersión de dichas neuroesferas en células separadas y el cultivo de dichas células separadas; y
- la caracterización de las células resembradas para confirmar la presencia de células que son inmunorreactivas para
- 15 la nestina y el isotipo III de la beta-tubulina.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho donante vivo es un paciente que tiene un trastorno neurológico.
- 20 3. Un procedimiento de formación de células diferenciadas, que comprende el aislamiento de una pluralidad de células por el procedimiento según la reivindicación 1; y la puesta en contacto de la pluralidad aislada de células con un factor de diferenciación.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además la selección de un solo tipo de
- 25 célula a partir del cultivo celular.
5. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el factor de diferenciación es al menos un factor de crecimiento.
- 30 6. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el factor de diferenciación es un sustrato.
7. Uso de una pluralidad de células aisladas por el procedimiento según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico, en el que la pluralidad de células comprende células que son inmunorreactivas para la nestina y el isotipo III de la beta-tubulina.
- 35 8. Uso según la reivindicación 7, o el procedimiento según la reivindicación 2, en el que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple.
- 40 9. Uso de células madre neuroepiteliales olfativas humanas aisladas obtenidas de un individuo afectado por un trastorno neurológico, en el que se ha introducido un transgén que codifica al menos un polipéptido útil para tratar el trastorno neurológico en las células madre, en el que las células madre se aislaron por el procedimiento según la reivindicación 1 y comprenden células que son inmunorreactivas para la nestina y el isotipo III de la beta-tubulina, para la fabricación de un medicamento para tratar el trastorno neurológico en dicho individuo.
- 45 10. Uso según la reivindicación 9, en el que el trastorno neurológico es uno seleccionado entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal y ELA.
- 50 11. Uso según la reivindicación 9, en el que el transgén es una pluralidad de transgenes.
12. Uso según la reivindicación 9, en el que el transgén es un neurotransmisor o un receptor de neurotransmisor.
- 55 13. Células aisladas obtenidas por el procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células aisladas comprenden células que son inmunorreactivas para la nestina y el isotipo III de la beta-tubulina, para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.
14. Las células para su uso según la reivindicación 13, en el que el trastorno neurológico se selecciona del
- 60 grupo que consiste en lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple.

15. Células madre neuroepiteliales olfativas humanas aisladas obtenidas de un individuo afectado por un trastorno neurológico, en el que las células madre olfativas humanas comprenden células que son inmunorreactivas para la nestina y el isotipo III de la beta-tubulina, para su uso en el tratamiento del trastorno neurológico en dicho individuo.

5

16. Las células madre olfativas humanas aisladas para su uso según la reivindicación 15, en el que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal y ELA.

10 17. Las células madre olfativas humanas aisladas para su uso según la reivindicación 15, en el que se ha introducido un transgén que codifica al menos un polipéptido útil para tratar el trastorno neurológico en la célula madre.

18. Las células madre olfativas humanas aisladas para su uso según la reivindicación 17, en el que el  
15 transgén es una pluralidad de transgenes.

19. Las células madre olfativas humanas aisladas para su uso según la reivindicación 17, en el que el transgén es un neurotransmisor o un receptor de neurotransmisor.

**FIGURA 1**

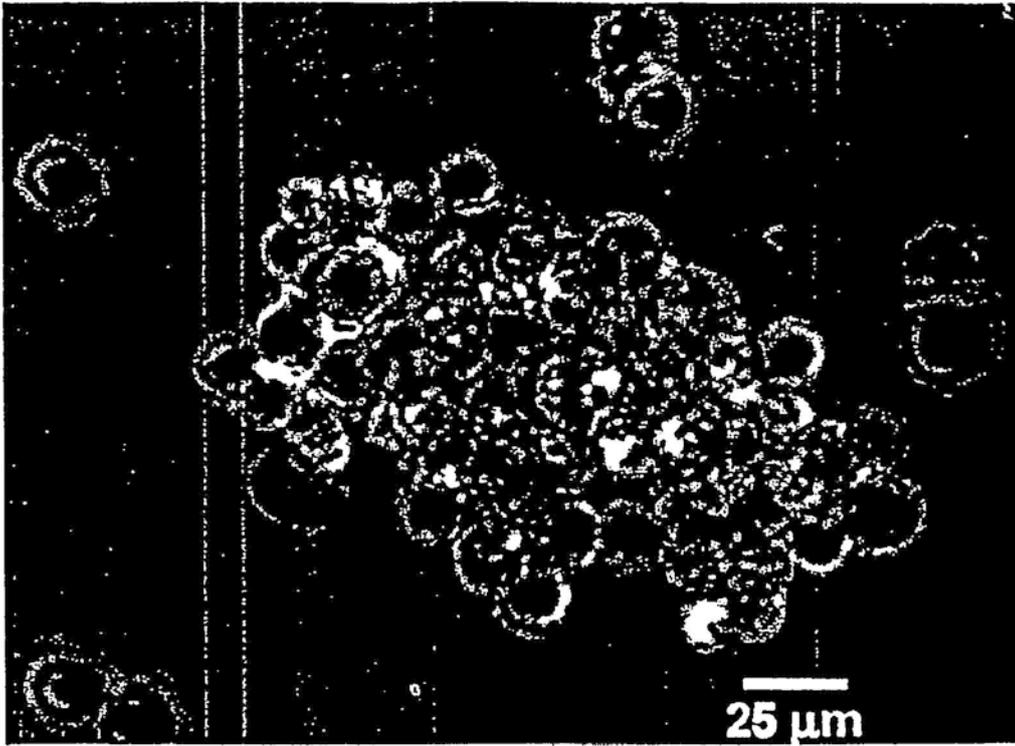
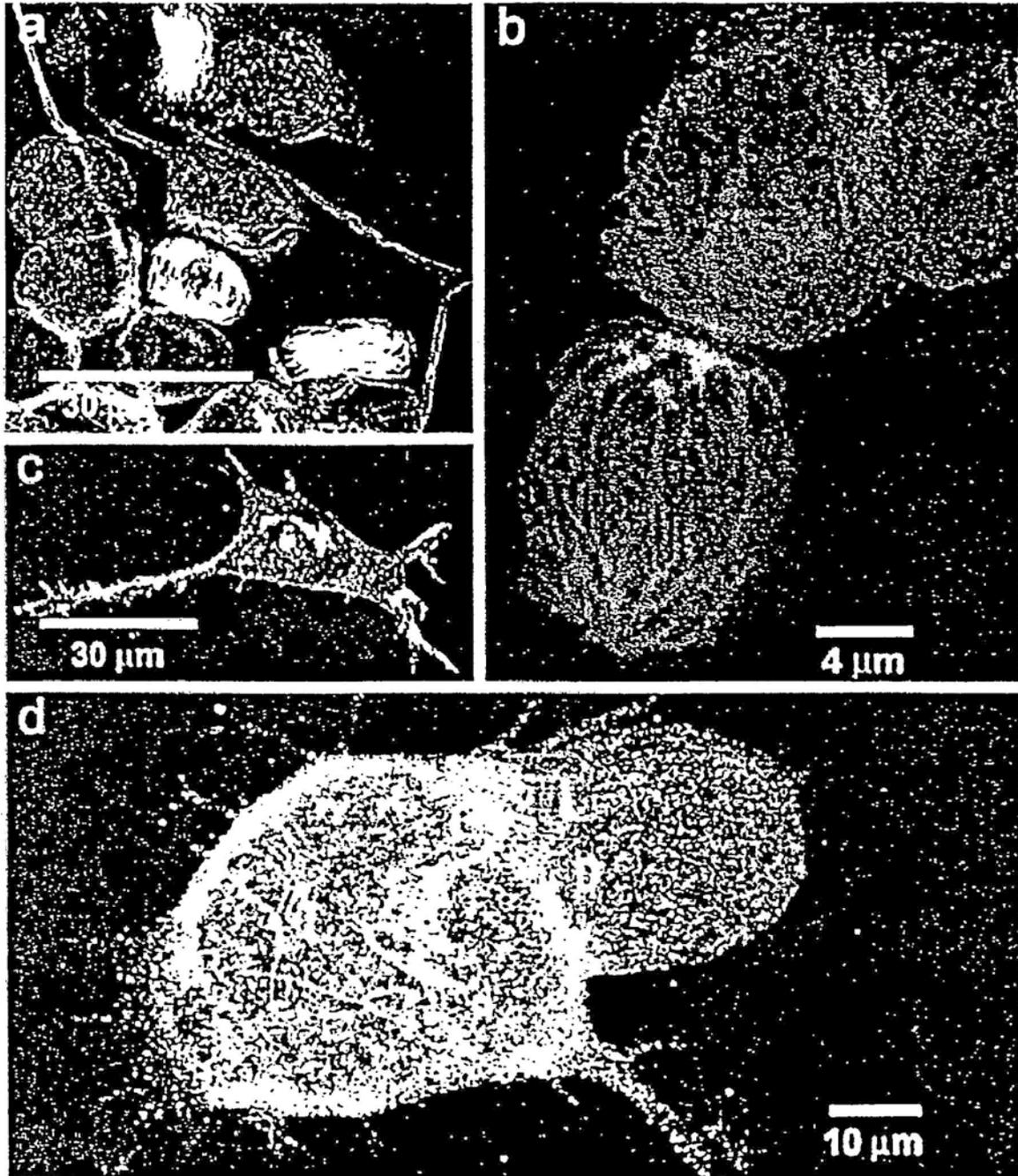


FIGURA 2



**FIGURA 3**

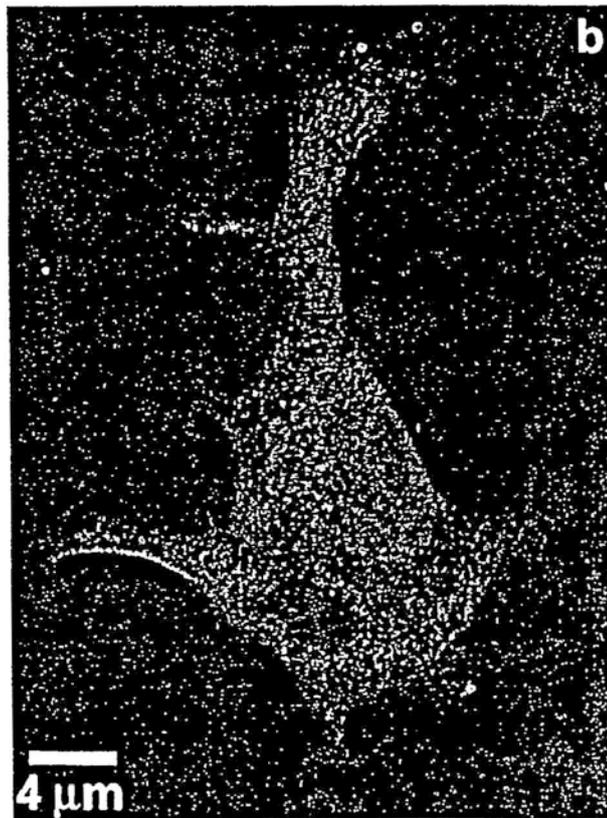
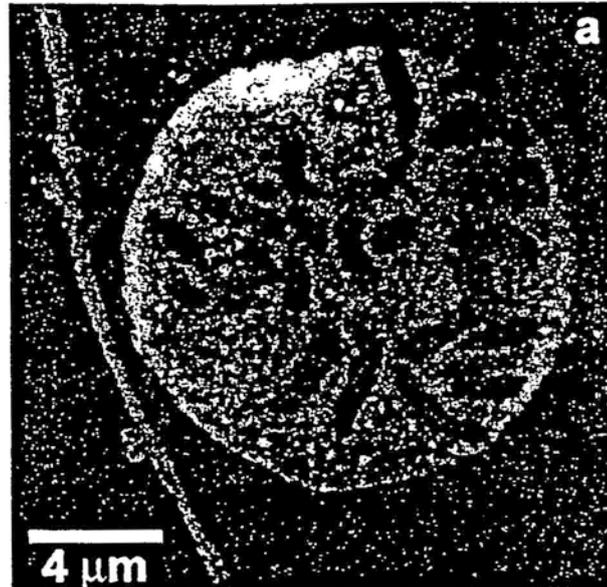


FIGURA 4

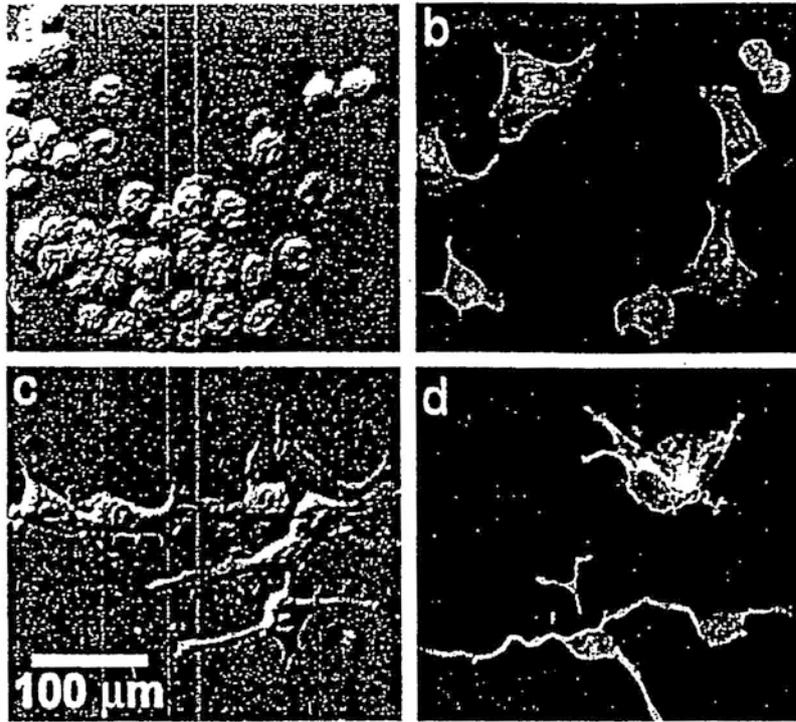


FIGURA 5

