

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 238**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2015.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/0797** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2002 E 02778303 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1438392**

54 Título: **Poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90**

30 Prioridad:

**21.09.2001 US 960244**

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

**05.11.2015**

73 Titular/es:

**GARNET BIOTHERAPEUTICS, INC (100.0%)  
ONE GREAT VALLEY PARKWAY, SUITE 20  
MALVERN, PA 19335, US**

72 Inventor/es:

**HO, TONY, W.;  
KOPEN, GENE, C.;  
RIGHTER, WILLIAM, F.;  
RUTKOWSKI, J., LYNN;  
HERRING, W., JOSEPH;  
RAGAGLIA, VANESSA y  
WAGNER, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 550 238 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**

Poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90

5 **Antecedentes de la invención**

Varias afecciones y enfermedades del sistema nervioso central (es decir, cerebro y médula espinal), sistema nervioso periférico y corazón afectan de forma adversa a los seres humanos. Estas afecciones y enfermedades incluyen, por ejemplo, lesión de médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Parkinson, apoplejía, lesión cerebral traumática, tumores cerebrales, enfermedad de Fabry, fallo cardiaco congestivo e infarto de miocardio. Las estrategias de tratamiento clínico, por ejemplo, frecuentemente se centran en la prevención de un daño o lesión adicional en lugar del reemplazo o reparación del tejido dañado (por ejemplo, neuronas, células gliales, músculo cardiaco); incluyen tratamiento con esteroides exógenos y fármacos no celulares sintéticos; y tienen grados variables de éxito que puede depender de la administración continuada del esteroide o fármaco sintético.

15 Por ejemplo, la mayoría de las lesiones de médula espinal son lesiones por compresión implicando el resto de los casos transección completa de la médula espinal. Los tratamientos terapéuticos actuales para lesión de médula espinal incluyen la prevención de lesión adicional de médula espinal por estabilización física de la médula a través de procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos y mediante la inhibición de la respuesta inflamatoria con terapia esteroide. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos mejorados y eficaces de tratamiento para enfermedades y afecciones, en particular, enfermedades y afecciones neurológicas y cardiacas, en seres humanos.

El documento WO 01/04 268 describe una población celular que expresa CD49c y CD90.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90 y métodos para tratar afecciones, tales como afecciones neurológicas o cardiacas, en seres humanos con estas poblaciones de células.

30 La presente invención proporciona un método para preparar una población celular aislada derivada de médula ósea humana, donde entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y donde la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que comprende las etapas de: a) cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno de menos del 15 % de oxígeno para producir una población celular adherente; y, b) cultivar la población celular adherente a una densidad de siembra de menos de 2500 células/cm<sup>2</sup>.

40 La presente invención también proporciona un método como se ha definido anteriormente, donde antes de las etapas a) y b), el método comprende adicionalmente las etapas de: a) lisar el componente de glóbulos rojos de un aspirado de médula ósea humano; b) sembrar las células de médula ósea no lisada en un dispositivo de cultivo tisular; c) permitir que las células de médula ósea no lisadas se adhieran a una superficie del dispositivo de cultivo tisular; y donde las etapas a) y b) del método definido anteriormente corresponden a las etapas d) y e) que comprenden: d) cultivar las células adherentes en condiciones de oxígeno del 5 %; y e) pasar las células adherentes a una densidad de siembra de 30 células/cm<sup>2</sup>.

45 La presente invención también proporciona alternativamente un método como se ha definido anteriormente, donde antes de las etapas a) y b), el método comprende adicionalmente las etapas de: a) seleccionar una fuente fraccionada de la población celular de un aspirado de médula ósea humana por pase a través de un gradiente de densidad; b) sembrar las células fraccionadas en un dispositivo de cultivo tisular; c) permitir que las células fraccionadas se adhieran a una superficie del dispositivo de cultivo tisular; y donde las etapas a) y b) del método definido anteriormente corresponden a las etapas d) y e) que comprenden: d) cultivar las células adherentes en condiciones de oxígeno del 5 %; y e) pasar las células adherentes a una densidad de siembra de 30 células/cm<sup>2</sup>.

50 La presente invención proporciona adicionalmente una población celular aislada derivada de médula ósea humana, donde entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y donde la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que puede obtenerse por cualquiera de los métodos anteriores y/o cualquier realización preferida de esos métodos como se describe a continuación.

También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa.

60 También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90, pero no expresa sialoproteína ósea (BSP).

65 En otra realización, la invención es un método como se ha descrito anteriormente, donde las células de la población celular que co-expresan CD49c y CD90 no expresan CD34 y/o CD45.

En una realización adicional, la invención es un método como se ha descrito anteriormente, donde las células de la población celular que co-expresan CD49c y CD90 expresan adicionalmente al menos un factor trófico seleccionado entre el grupo que consiste en BDNF, IL-6, NGF y MCP-1.

- 5 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 cultivando una fuente de la población celular a una densidad celular de siembra de menos de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo estrés oxidativo y seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90.
- 10 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 cultivando una fuente de la población celular a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo estrés oxidativo; y seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90.
- 15 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 cultivando una fuente de la población celular a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 50 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo estrés oxidativo; y seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90.
- 20 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 cultivando una fuente de la población celular a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 30 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo estrés oxidativo; y seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90.
- 25 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 cultivando una fuente de la población celular a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 75.000 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo estrés oxidativo para producir una población celular adherente y cultivando la población celular adherente a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo estrés oxidativo. Las células que co-expresan CD49c y
- 30 CD90 se seleccionan de la población celular adherente cultivada.

Otra realización de la invención incluye un método para preparar una población celular aislada como se ha definido anteriormente, que incluye la etapa de cultivar una fuente de la población celular a una densidad celular de siembra de menos de aproximadamente 50 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo contenido de oxígeno y seleccionar de la

35 fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90.

En otra realización más, la invención incluye un método para preparar una población celular aislada como se ha definido anteriormente, que incluye la etapa de cultivar una fuente de la población celular a una densidad celular de siembra de menos de aproximadamente 30 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo contenido de oxígeno y seleccionar de la

40 fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90.

En una realización adicional, la invención es un método como se ha definido anteriormente, donde la fuente de la población celular en la parte a) del método se cultiva a una densidad celular de siembra de menos de 75.000 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo contenido de oxígeno de menos del 15 % de oxígeno para producir una

45 población celular adherente; y la población celular adherente en la parte b) se cultiva a una densidad de siembra de menos de 100 células/cm<sup>2</sup>. Las células que co-expresan CD49c y CD90 se seleccionan de la población celular adherente cultivada.

También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección por lesión degenerativa o aguda, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente

50 homogénea que co-expresa CD49c y CD90.

También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente

55 homogénea que co-expresa CD49c y CD90.

También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección cardíaca, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-

60 expresa CD49c y CD90.

También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica cultivando una fuente de una población celular a una densidad celular de siembra de menos de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo contenido de oxígeno; seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, una población de células que co-expresa CD49c y CD90; y administrando la

65 población de células que co-expresan CD49c y CD90 al ser humano.

- 5 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende cultivar una fuente de una población celular; seleccionar de la fuente cultivada de la población celular una población de células que co-expresa CD49c y CD90; y administrar la población de células que co-expresan CD49c y CD90 al ser humano.
- 10 También se describe en este documento un método para preparar una célula progenitora comprometida, que comprende cultivar una fuente de una población celular; seleccionar de la fuente cultivada de la población celular células que co-expresan CD49c y CD90; y modificar las células que co-expresan CD49c y CD90 para que se conviertan en células progenitoras comprometidas.
- 15 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende cultivar una fuente de una población celular; seleccionar de la fuente cultivada de la población celular células que co-expresan CD49c y CD90; modificar las células que co-expresan CD49c y CD90 para que se conviertan en células progenitoras comprometidas; y administrar las células modificadas al ser humano.
- 20 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección por lesión degenerativa o aguda administrando al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa.
- 25 También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa.
- 30 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección por lesión degenerativa o aguda, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y Cd90, pero no expresa sialoproteína ósea (BSP).
- 35 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90, pero no expresa sialoproteína ósea.
- 40 En otra realización más, la invención es un método como se ha definido anteriormente, donde las células de la población celular que co-expresan CD49c y CD90, expresan adicionalmente al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco seleccionado entre el grupo que consiste en GATA4, Irx4 y Nkx2.5.
- 45 También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco, pero no expresa sialoproteína ósea.
- 50 También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GAT14, Irx4 y Nkx2.5.
- 55 Un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco, puede comprender las etapas de cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.
- 60 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4, Nkx2.5, que comprende las etapas de cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.
- 65 Un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, GATA4, Irx4, Nkx2.5, puede comprender las etapas de cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C y un

inhibidor de la metilación del ADN.

Un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco, puede comprender la etapa de tratar una población celular que co-expresa CD49c y CD90 con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco, que comprende la etapa de tratar una población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4 y Nkx2.5, que comprende la etapa de tratar una población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo en un ser humano, que comprende la etapa de administrar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco al ser humano.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo en un ser humano, que comprende la etapa de administrar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco al ser humano.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo en un ser humano, que comprende la etapa de administrar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, GATA4, Irx4 y Nkx2.5 al ser humano.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo en un ser humano, que comprende la etapa de administrar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4, Nkx2.5 al ser humano.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo en un individuo, que comprende las etapas de cultivar una fuente de una población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno, tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN; y administrar la población celular tratada al individuo.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo en un ser humano, que comprende las etapas tratar una población celular que co-expresa CD49c y CD90 con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN; y administrar las células tratadas al ser humano.

También se describe en este documento un método para formar un tipo celular progenitor comprometido, que comprende la etapa de combinar una población sustancialmente homogénea de células que co-expresan CD49c y CD90 con una población de células que incluye al menos un tipo celular progenitor comprometido.

También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco.

También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco.

También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4, y Nkx2.5.

También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, GATA4, Irx4 y Nkx2.5.

La invención descrita en este documento proporciona un método para preparar una población aislada de células como se ha definido anteriormente, que puede usarse para tratar una afección o enfermedad en un ser humano. Las ventajas de las terapias basadas en células que se pueden obtener por los métodos de la invención reivindicada incluyen, por ejemplo, incorporación de las células en el tejido (por ejemplo, tejido del sistema nervioso central, tejido

del sistema nervioso periférico, tejido cardiaco), las células incorporadas tienen el potencial de diferenciarse o desarrollarse en células neuronales, de la glía u otras células (por ejemplo, músculo cardiaco) para reemplazar o facilitar la reparación del tejido dañado, traumatizado o degenerante provocando de ese modo un tratamiento más permanente de la afección degenerativa, por lesión aguda, por traumatismo, neurológica o cardiaca; y la capacidad de emplear poblaciones reproducibles caracterizadas de células en regímenes de tratamiento. Las células obtenidas por el método de la invención tienen el potencial de secretar citoquinas y factores tróficos beneficiosos (por ejemplo, BDNF, IL-6, NGF y MCP-1).

Por tanto, el tratamiento de seres humanos con poblaciones de células que co-expresan CD49c y CD90 puede revertir potencialmente, disminuir o reparar la pérdida de vida a una afección degenerativa, de lesión aguda, neurológica (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, ALS, apoplejía, lesión cerebral traumática, tumores cerebrales) o cardiaca (por ejemplo, fallo cardiaco congestivo, infarto de miocardio) en un ser humano, aumentando de ese modo la calidad de vida y esperanza de vida del ser humano.

### 15 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A, 1B y 1C ilustran el análisis citométrico de flujo de poblaciones celulares en los Bancos Celulares Maestro y de Trabajo generados a partir de un aspirado de médula ósea después lisis de los glóbulos rojos.

Las Figuras 2A, 2B y 2C ilustran el análisis citométrico de flujo de poblaciones celulares en los Bancos Celulares Maestro y de Trabajo generados a partir de un aspirado de médula ósea después de separación por densidad.

La Figura 3 ilustra la producción (cantidad de células) de células que co-expresan CD49c y CD90 durante expansión *ex vivo* de un Banco Celular Primario de unidades formadoras de colonias (CFU) derivadas de aspirados de médula ósea humana.

La Figura 4 ilustra la velocidad de duplicación de poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90 en cultivo.

La Figura 5 ilustra el índice de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) para ratas después de lesión en médula espinal y después de trasplante con una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90. A los 19 días después de la contusión, las ratas que recibieron el trasplante celular mostraron mayor mejora que las ratas que recibieron solamente control de PBS.

La Figura 6A representa los efectos de células determinadas miocíticas tempranas (EMD) y células no modificadas sobre la función cardiaca después de inducción experimental de infarto de miocardio medido por tasa positiva máxima de cambio de presión (+dp/dt). Cuatro semanas después del tratamiento, las ratas que recibieron células no modificadas o células determinadas miocíticas tempranas tuvieron valores significativamente mayores de +dp/dt. (\*p<0,05 por ANOVA).

La Figura 6B representa las diferencias de género en ratas macho y hembra después de inducción experimental de infarto de miocardio y tratamiento con células determinadas miocíticas tempranas (EMD) y células no modificadas. (\*p<0,05 por ANOVA).

La Figura 6C representa cambios en la función cardiaca durante el curso de tratamiento sustrayendo los valores de +dp/dt en la semana 0 de los valores de +dp/dt en la semana 4 para obtener un "delta +dp/dt" en ratas después de inducción experimental de infarto de miocardio y tratamiento con células determinadas miocíticas tempranas (EMD) o células no modificadas (\*p<0,05, \*\*p<0,01 por ANOVA).

La Figura 6D representa las diferencias de género en ratas macho y hembra después de inducción experimental de infarto de miocardio y tratamiento con células determinadas miocíticas tempranas (EMD) y células no modificadas (\*p<0,05, \*\*p<0,01 por ANOVA).

Las Figuras 7A y 7B representan los efectos del tratamiento con células determinadas miocíticas tempranas (EMD) y células no modificadas sobre la función cardiaca en ratas después de inducción experimental de infarto de miocardio medido por tasa negativa máxima de cambio de presión (-dp/dt). (\*p<0,05, \*\*p<0,01 por ANOVA).

Las Figuras 8A y 8B representan los efectos de células no modificadas y células determinadas miocíticas tempranas (EMD) sobre la función cardiaca en ratas después de inducción experimental de infarto de miocardio medido por la constante de tiempo de la caída de la presión volumétrica ventricular izquierda (tau). (\*p<0,05, \*\*p<0,01 por ANOVA).

La Figura 9 representa el valor histológico (área tisular fibrótica/viable) en músculo cardiaco obtenido de ratas después de inducción experimental de infarto de miocardio y posterior tratamiento con células no modificadas o células determinadas miocíticas tempranas (EMD).

Las Figuras 10A y 10B son tinciones H y E y tricromo de secciones tisulares cardiacas obtenidas de ratas después de inducción experimental de infarto de miocardio y posterior tratamiento con vehículo (Figura 10A) o células no modificadas (Figura 10B). La línea blanca representa al área del infarto de miocardio.

### 60 Descripción detallada de la invención

Las características y otros detalles de la invención, como etapas de la invención o como combinaciones de partes de la invención, ahora se describirán más particularmente y se señalan en las reivindicaciones. Se entenderá que las realizaciones particulares de la invención se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin alejarse del alcance de la invención.

La presente invención se refiere a un método para preparar una población celular aislada derivada de médula ósea humana, donde entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y donde la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que comprende las etapas de:

- 5 a) cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno de menos del 15 % de oxígeno para producir una población celular adherente; y  
 b) cultivar la población celular adherente a una densidad de siembra de menos de 2500 células/cm<sup>2</sup>. La invención también se refiere a un método definido anteriormente, donde las células de la población que co-expresan CD49c, y CD90, expresan adicionalmente al menos un factor de transcripción relacionado con músculo  
 10 cardiaco (por ejemplo, GATA4, Irx4 y Nkx2.5).

"Sustancialmente homogéneo" como se usa en este documento se refiere a una población de células donde la mayoría (por ejemplo, entre aproximadamente el 100 % y aproximadamente el 90 %) de la cantidad total de células tiene una característica específica de interés (por ejemplo, co-expresa CD49c y CD90; co-expresa CD49c y CD90 con expresión mínima de CD34 y/o CD45).

"Co-expresa" o "co-expresan", como se usan en este documento, se refieren a la detección simultánea de dos o más moléculas, por ejemplo, CD49c y CD90; CD49c, CD90 y telomerasa; CD49c, CD90, GATA4, Nkx2.5 e Irx4; CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Nkx2.5 e Irx4, sobre o dentro de una única célula; o, como alternativa, sobre o dentro de un conjunto de células.

La población celular sustancialmente homogénea de la invención co-expresa CD49c y CD90 en una única célula de la población. La población celular de la invención que co-expresa CD49c, CD90 y, opcionalmente, telomerasa sobre cada célula de la población, también puede co-expresar otras proteínas (por ejemplo, factores de transcripción relacionados con músculo cardiaco tales como GATA4, Irx4 y Nkx2.5) sobre al menos una parte (por ejemplo, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %) de la cantidad total de células en la población celular.

Las técnicas para detectar la co-expresión de CD49c y CD90 en células (por ejemplo, células estromáticas de médula ósea) están bien establecidas. Por ejemplo, la co-expresión de CD49c y CD90 sobre una célula puede detectarse por análisis citométrico de múltiples colores. CD49c puede detectarse empleando una sonda marcada con fluoresceína y CD90 puede detectarse empleando una sonda rojo Texas. Los antígenos de superficie celular CD49c y CD90 pueden visualizarse con la ayuda de un citómetro de flujo equipado con múltiples filtros capaces de detectar los múltiples colores. Las técnicas para detectar las moléculas de interés también pueden incluir ELISA, RIA, microscopia de inmunofluorescencia y PCR cuantitativa.

También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea de la invención que co-expresa CD49c y CD90, pero no expresa sialoproteína ósea.

40 La población celular aislada producida de acuerdo con el método de la invención que co-expresa CD49c y CD90, tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas. El tiempo de duplicación de las células de la invención puede variarse dependiendo de, por ejemplo, la densidad de las células en cultivo (por ejemplo, 100 células/cm<sup>2</sup>) y/o la concentración de oxígeno empleada para cultivar las células (por ejemplo, una baja concentración de oxígeno tal como aproximadamente el 5 % de oxígeno).

45 La población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 puede tener el potencial de diferenciarse en un fenotipo preseleccionado (por ejemplo, condrocitos, astrocitos, oligodendrocitos, neuronas, hueso, osteoclastos, osteoblastos, cardiomiocitos, células de islotes pancreáticos, músculo esquelético, músculo liso, hepatocitos y células ganglionares de la retina). El potencial de diferenciarse en un fenotipo preseleccionado se refiere a la capacidad de la población celular de cambiar a un tipo celular funcional.

50 La población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 no expresa sustancialmente, después de entre aproximadamente 20 duplicaciones de población a aproximadamente 50 duplicaciones de población, al menos un marcador de senescencia celular seleccionado entre un grupo que consiste en P21 y P53. Un marcador de senescencia sería cualquier marcador asociado con senescencia o envejecimiento en una célula (por ejemplo, P21, P53). El marcador de senescencia puede ser un marcador citoplasmático, nuclear o de superficie celular.

60 En una realización, la población celular aislada producida de acuerdo con el método se ha cultivado *in vitro* a través de varias duplicaciones de población seleccionadas entre el grupo que consiste en a) al menos 20 duplicaciones de población; b) al menos 30 duplicaciones de población; c) al menos 40 duplicaciones de población; y d) al menos 50 duplicaciones de población; y aún co-expresa CD49c y CD90 pero no expresa sustancialmente al menos un marcador de senescencia celular seleccionado entre un grupo que consiste en P21 y P53. Un especialista en la técnica sería capaz de determinar si una célula ha experimentado una duplicación de población (Freshney, R.I. "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques" Nueva York, Wiley-Liss (1994)) y sería capaz de determinar si las poblaciones celulares co-expresan CD49c y CD90 y no expresan sustancialmente al menos un marcador de

senescencia celular seleccionado entre un grupo que consiste en P21 y P53 empleando técnicas establecidas (por ejemplo, citometría de flujo, PCR cuantitativa).

5 La población celular aislada obtenida por el método de la invención que co-expresa CD49c y CD90 puede incluir adicionalmente la expresión de P21 o P53 después de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 duplicaciones de población de las células. La expresión de un marcador de senescencia (por ejemplo, P21, P53) es una expresión relativa del marcador de senescencia (por ejemplo, respecto a ARNr 18s, GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), actina). "Expresión relativa", como se usa en este documento, es la expresión (por ejemplo, ácido nucleico, proteína) de una molécula de interés (por ejemplo, CD49c, CD90, telomerasa, CBFA1, BSP, BDNF, IL-6, MCP-1) con respecto a la expresión de un marcador patrón o de referencia (por ejemplo, ARNr 18s, actina, GFAP). En una realización preferida, la expresión de P53 es una expresión relativa de hasta aproximadamente 3000 transcritos de P53 (por ejemplo, 0, 100, 1000, 1500, 2000) por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s y la expresión de P21 es una expresión relativa de hasta aproximadamente 20.000 transcritos de P21 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s.

15 En una realización, la expresión de P53 es aproximadamente 3000 transcritos de P53 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s. En otra realización, la P53 es aproximadamente 2000 transcritos de P53 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s. En otra realización más, la expresión de P53 es aproximadamente 1000 transcritos de P53 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s.

20 En otra realización, la expresión de P21 es hasta aproximadamente 20.000 transcritos de P21 (por ejemplo, 0, 100, 1000, 5000, 10000, 15000, 20000) por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s. En otra realización más, la expresión de P21 es aproximadamente 15000 transcritos de P21 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s. En otra realización más, la expresión de P21 es aproximadamente 500 transcritos de P21 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s.

25 En una realización, la expresión de un factor 1 de unión a núcleo marcador de linaje óseo (CBFA1) (Otto, F. et al., Cell 89(5) 765-771 (1997)) es aproximadamente 5000 transcritos del marcador de linaje óseo por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s. En otra realización, la expresión del marcador de linaje óseo CBFA1 es aproximadamente 3000 transcritos del marcador de linaje óseo por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s. En otra realización más, la expresión del marcador de linaje óseo CBFA1 es aproximadamente 1000 transcritos del marcador de linaje óseo por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s.

30 La población celular producida de acuerdo con el método de la invención es una población celular de médula ósea humana. Por tanto, la población celular sustancialmente homogénea se obtiene de células de médula ósea humana (por ejemplo, células estromáticas de médula ósea humana). Las células de la invención pueden mencionarse como "derivadas" de médula ósea humana. Las células derivadas de médula ósea humana pueden obtenerse, por ejemplo, por lisis de la fuente de las células (por ejemplo, células de médula ósea). Por ejemplo, las células estromáticas de médula ósea se obtienen de aspirados de médula ósea completa después de lisis con cloruro de amonio aspirados de médula ósea. El cloruro de amonio elimina los glóbulos rojos de los aspirados y el sedimento celular resultante se emplea para generar la población celular que co-expresa CD49c y CD90 de acuerdo con el método de la invención. Como alternativa, la médula ósea puede procesarse (por ejemplo, fraccionarse por centrifugación en gradiente de densidad, lisis con  $\text{NH}_2\text{Cl}$ , clasificación activada fluorescente o clasificación magnética) para obtener la fuente de la población celular a usar en los métodos de la invención. Por ejemplo, los aspirados de médula ósea o células de médula ósea lisadas se pasan a través de un gradiente de densidad para separar las células de la invención de los desechos celulares como resultado de la lisis. Como alternativa, o  
45 adicionalmente, los aspirados de médula ósea o células de médula ósea lisadas pueden formar un gradiente de densidad.

50 Los aspirados de médula ósea completa se obtienen de un ser humano y se cultivan en contacto con una fase sólida. Como alternativa, o adicionalmente, el aspirado de médula ósea completa puede procesarse para producir una fracción de células mononucleares que después se cultivan en contacto con una fase sólida. La fase sólida puede ser, por ejemplo, plástico (por ejemplo, plásticos tratados con cultivo tisular).

55 La fracción celular mononuclear puede obtenerse de un aspirado de médula ósea completa en un gradiente de densidad por procedimientos establecidos. Como alternativa, la fracción de células mononucleares se obtiene por lisis de los glóbulos rojos contenidos en el aspirado de médula ósea. La lisis se hace mezclando el aspirado de médula ósea con cloruro de amonio.

60 Las células de médula ósea humana se obtienen de donantes humanos sanos por aspiraciones de la cresta iliaca y las poblaciones de células estromáticas de médula ósea se obtienen empleando técnicas bien establecidas. Por ejemplo, las poblaciones celulares aisladas de la invención que co-expresan CD49c y CD90 se obtienen de aspirados de médula ósea de cresta iliaca humana y se procesan a fracciones de células mononucleares de las cuales las células estromáticas de médula ósea se propagan selectivamente *in vitro* basándose en su propensión a adherirse a plástico y dividirse en respuesta a medio de cultivo celular definido. Las células adherentes en plástico se cultivan de forma óptima a una concentración celular que fomenta la proliferación de casi solamente las células de auto-renovación, mencionadas como células tipo fibroblasto de unidades formadoras de colonias (Cfu-f). Las  
65 células derivadas de Cfu-f se analizan para células que co-expresan CD49c y CD90 y se sub-cultivan de acuerdo

con el método de la invención para producir una población celular que co-exprese CD49c y CD90.

El aspirado de médula ósea, o una fracción celular del aspirado de médula ósea, se cultiva en contacto con una fase sólida y se aísla una población celular intermedia del cultivo celular resultante basándose en su propensión a adherirse a la fase sólida. Los aspirados de médula ósea, o una fracción celular del aspirado, se cultivan de acuerdo con parte (b) del método de la invención a una concentración de oxígeno disuelto de menos del 20 %, preferiblemente entre el 1 % y aproximadamente el 10 %, y mucho más preferiblemente entre el 2 % de oxígeno y el 7 % de oxígeno. En una realización preferida, la concentración de oxígeno disuelto es del 5 % de oxígeno. La población celular adherente resultante se expande para producir la población celular aislada que co-expresa CD49c y CD90.

La expansión de células de médula ósea de acuerdo con la parte (b) del método de la invención se realiza con una densidad de siembra de menos de 2500 células/cm<sup>2</sup>, preferiblemente menos de 1000 células/cm<sup>2</sup>, y mucho más preferiblemente menos de 100 células/cm<sup>2</sup>. En una realización particular, la densidad celular inicial en la etapa de expansión es entre 30 células/cm<sup>2</sup> y 50 células/cm<sup>2</sup>. Una densidad de siembra sería la cantidad de células adherentes por cm<sup>2</sup> obtenidas de células mononucleares de médula ósea.

Pueden usarse preparaciones convencionales de medio para cultivar las células de médula ósea. Por ejemplo, el medio puede ser medio esencial mínimo-modificación alfa suplementado con L-glutamina 4 mM y suero bovino fetal (FSB) seleccionado por lotes del 0 al 10 %, preferiblemente FSB aproximadamente al 10 %. La etapa de cultivo puede realizarse durante cualquier periodo razonable, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 días y mucho más preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 días.

Una población celular intermedia se aísla del cultivo celular, como se ha descrito anteriormente, basándose en su propensión a adherirse a la fase sólida. La población celular intermedia se cultiva a una concentración celular que fomenta la proliferación de casi solamente las células de auto-renovación, mencionadas en este documento como células de tipo fibroblasto de unidades formadoras de colonia (Cfu-f). Las células derivadas de Cfu-f se sub-cultivan en condiciones definidas para producir una población sustancialmente homogénea de células (Ejemplo 1). De acuerdo con la invención, la expansión produce una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90.

En otra realización, las células de la población celular producidas de acuerdo con el método de la invención no expresan CD34 y/o CD45. La presencia o ausencia de CD34 y CD45 puede detectarse en células mononucleares de médula ósea que co-expresan CD49c y CD90 usando métodos rutinarios incluyendo, por ejemplo, ensayos ELISA específicos de antígeno, PCR cuantitativa, o citometría de flujo. Las células que co-expresan CD49c y CD90, pero no expresan cualquiera de CD34 y/o CD45 o ambos, se propagan en cultivo y se almacenan hasta su uso en los métodos descritos en este documento.

En otra realización más, las células de la población celular producidas de acuerdo con el método de la invención que co-expresan CD49c y CD90 expresan adicionalmente al menos un factor trófico seleccionado entre el grupo que consiste en factor neurotrófico derivado de cerebro factor (BDNF) (Barde, Y.A., et al. EMBO J., 1(5):549-553 (1982)), factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi-Montalcini, R., Arch Biol 76(2):387-417 (1965)), neurotrofina-3 (NT-3) (Mohn, A., et al., Nature 344:339-341 (1990)), interleuquina-6 (IL-6) (Barton, B.E., Clin. Immunol. Immunopathol. 85(1):16-20 (1997)), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-11 (IL-11), factor de células madre (SCF), proteína-1 quimioatrayente de macrófagos (MCP-1), metaloproteínasa-9 de matriz (MMP-9) y Cistatina-C y factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Moore, MA., et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 938:36-45 (2001); Koller mann, J., et al., Am. J. Clin. Pathol. 116:115-121 (2002)).

La expresión de BDNF, NGF, NT-3, IL-6, IL-7, IL-11, SCF, VEGF, MCP-1, MMP-9 y Cistatina-C en poblaciones de células que co-expresan CD49c y CD90 puede aumentarse por diversas técnicas, incluyendo cultivo *ex vivo* de las células en medio químicamente definido.

También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa. La expresión de telomerasa es una expresión relativa, por ejemplo, una expresión relativa de más de entre aproximadamente 1 transcrito de telomerasa por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s y aproximadamente 10 transcritos de telomerasa por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s.

La expresión de telomerasa es de aproximadamente de 1 transcrito de telomerasa por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s. En otra realización, la expresión de telomerasa es de aproximadamente 5 transcritos de telomerasa por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s.

La expresión de telomerasa es de aproximadamente de 10 transcritos de telomerasa por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s.

La población celular que co-expresa CD40c, CD90 y telomerasa tiene un tiempo de duplicación de menos de aproximadamente 144 horas, menos de aproximadamente 72 horas y menos de aproximadamente 48 horas.

5 La población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa tiene el potencial de diferenciarse en un fenotipo preseleccionado (por ejemplo, un condrocito, un astrocito, un oligodendrocito, una neurona, osteocito, osteoblasto, osteoclasto, un cardiomiocito, una célula de islote pancreático, un músculo esquelético, un músculo liso, un hepatocito y una célula ganglionar de la retina).

10 La población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa puede incluir adicionalmente la expresión de P21 o P53 después de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 duplicaciones de población de las células (por ejemplo, 20, 30, 40 o 50 duplicaciones de población). La expresión de P53 es una expresión relativa de hasta aproximadamente 3000 transcritos de P53 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s (por ejemplo, 3000, 2000 o 1000 transcritos de P53 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s). La expresión de P21 es una expresión relativa de hasta aproximadamente 20.000 transcritos de P21 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s (por ejemplo, 20000, 15000 o 5000 transcritos de P21 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s).

15 La población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa no expresa CD34 y/o CD45.

La población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa puede expresar al menos un factor trófico seleccionado entre el grupo que consiste en BDNF, IL-6 y MCP-1.

20 En una realización, la invención incluye un método para preparar una población celular aislada como se ha definido anteriormente que comprende cultivar una fuente de la población celular (por ejemplo, células de médula ósea humana) y seleccionar de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90. La fuente de la población celular se cultiva en condiciones de bajo contenido de oxígeno de menos del 15 % de oxígeno (por ejemplo, menos del atmosférico). "Condiciones de bajo contenido de oxígeno", como se usa en este documento,  
25 se refiere a una concentración (por ejemplo, porcentaje de oxígeno basado en el volumen, peso o molaridad) de menos del 15 % oxígeno, que es menos que el oxígeno atmosférico.

30 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa que comprende cultivar una fuente de la población celular (por ejemplo, células de médula ósea humana) y seleccionar de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c, CD90 y telomerasa.

35 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 pero no expresa sialoproteína ósea que comprende cultivar una fuente de la población celular y seleccionar de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c, CD90 y un marcador de linaje óseo.

40 Las condiciones de bajo contenido de oxígeno usadas en la parte (a) del método de la invención es una concentración de oxígeno de menos del 15 % en volumen (porcentaje en moles) de oxígeno, y más preferiblemente una concentración de oxígeno de menos del 10 % en volumen, y mucho más preferiblemente una concentración de oxígeno es menos del 5 % en volumen de oxígeno. En otra realización, la fuente de la población celular se cultiva a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> (por ejemplo, 95, 90, 80, 50, 30, 25 células/cm<sup>2</sup>) en condiciones de bajo contenido de oxígeno de menos del 15 % de oxígeno (por ejemplo, menos de aproximadamente el 5 % de oxígeno).  
45

También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90 que comprende cultivar una fuente de la población celular (por ejemplo, células de médula ósea humana) y seleccionar de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD40c y CD90 cultivando la fuente de la población celular a bajo estrés oxidativo (por ejemplo, glutatión, Vitamina C, Catalasa, Vitamina E, N-Acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo", como se usa en este documento, se refiere a condiciones de ausencia de o mínimo daño por radicales libres a las células cultivadas.  
50

55 El método de acuerdo con la invención puede incluir adicionalmente lisar la fuente de la población celular (por ejemplo, aspirados de médula ósea) antes de cultivar la fuente de la población celular. Por ejemplo, la lisis de un aspirado de médula ósea puede provocar la lisis de células hematopoyéticas dejando las células no hematopoyéticas sin lisar. Adicionalmente, o como alternativa, el método de la invención puede incluir adicionalmente el fraccionamiento (por ejemplo, por paso a través de o formación de un gradiente de densidad, por lisis con NH<sub>2</sub>Cl) de la fuente de la población celular (por ejemplo, aspirados de médula ósea) antes de cultivar la fuente de la población celular. Por tanto, el método de acuerdo con la invención puede incluir adicionalmente  
60 seleccionar una fuente fraccionada de la población celular antes de cultivar la fuente de la población celular.

65 Las células preparadas por el método de la invención también pueden expresar al menos un factor trófico (por ejemplo, BDNF, NGF, NT-3, IL-6, IL-7, IL-11, SCF, MCP-1, MMP-9, Cistatina-C y VEGF). En otra realización, la población sustancialmente homogénea de células que co-expresan CD49c y CD90; preparada por el método de la invención no expresa CD34 y/o CD45.

También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección degenerativa o por lesión aguda, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90. Las células usadas para tratar al ser humano que padece una afección degenerativa o por lesión aguda también puede no expresar CD34 y/o CD45.

5 La enfermedad degenerativa es una enfermedad en que el descenso (por ejemplo, función, estructura, bioquímica) del tipo celular particular (por ejemplo, neuronal, muscular, conectivo, epitelial) provoca una afección clínica adversa. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson es una enfermedad degenerativa en el sistema nervioso central (por ejemplo, ganglios basales) que se caracteriza por temblores musculares rítmicos, rigidez del movimiento, 10 festinación, postura caída y aspecto facial tipo máscara. Las enfermedades degenerativas que pueden tratarse con la población celular aislada obtenida por los métodos de la invención que co-expresa CD49c y CD90 pueden ser, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, fallo cardíaco congénito, cardiomiopatía, ataxias, y distrofia muscular espinal.

15 Una afección por lesión aguda es una afección en que un evento o múltiples eventos provocan una afección clínica adversa. El evento que provoca la afección por lesión aguda puede ser un evento externo tal como una fuerza contundente o compresión o un evento interno tal como isquemia repentina (por ejemplo, apoplejía o ataque al corazón). Las afecciones por lesión aguda que pueden tratarse con la población celular aislada obtenida por los métodos de la invención, que co-expresa CD49c y CD90 pueden ser, por ejemplo, lesión de médula espinal, lesión 20 cerebral traumática, infarto de miocardio, fallo cardíaco congestivo y apoplejía.

También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección cardíaca, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90. A afección cardíaca es una enfermedad del corazón. La enfermedad del corazón puede ser 25 una enfermedad del músculo cardíaco, tejido conectivo de los vasos del corazón. Las células usadas para tratar al ser humano que padece una afección cardíaca también pueden no expresar CD34 y/o CD45. Una afección cardíaca que puede tratarse por las células obtenidas por los métodos de la invención puede ser, por ejemplo, infarto de miocardio, fallo cardíaco congestivo, miocarditis, enfermedad cardíaca vascular, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca congénita, enfermedad cardíaca isquémica, trasplante de corazón y puente pre-trasplante.

30 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende la etapa de administrar al ser humano una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90; co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa; CD49c, CD90 y un marcador de linaje óseo. "Una afección neurológica", como se usa en este documento, se refiere a cualquier estado del sistema nervioso (sistema nervioso central o periférico) que se desvía de cualquier forma de un sistema nervioso normal o sistema nervioso de un mamífero (por ejemplo, ser humano) no afectado por una afección neurológica. La afección neurológica puede ser una afección del sistema nervioso central (cerebro o médula espinal) o periférico. La afección neurológica puede ser, por ejemplo, el resultado o consecuencia de una enfermedad (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Fabry), afección por lesión aguda (por 40 ejemplo, apoplejía, lesión cerebral, lesión de médula espinal) o una combinación de enfermedad y afección por lesión aguda. Otras afecciones neurológicas que pueden tratarse con la población celular aislada obtenida por el método de la invención incluyen, por ejemplo, distrofia metacromática, leucodistrofia suprarrenal, enfermedad de Canavan, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, enfermedad de Nieman-pick y un tumor cerebral.

45 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende cultivar (por ejemplo, condiciones de bajo contenido de oxígeno; condiciones de oxígeno menores que la atmosférica; aproximadamente el 5 % de oxígeno) una fuente de una población celular (por ejemplo, médula ósea, grasa, sangre de cordón umbilical, piel) y seleccionar de la fuente cultivada de la población celular, una población de células que co-expresan CD49c y CD90. La población seleccionada de células que co-expresan CD49c y CD90 se administra al ser humano. 50

La población sustancialmente homogénea de células que se administra al ser humano puede co-expresar CD49c y CD90 y carecer de CD34 y/o CD45. La población sustancialmente homogénea de células que se administra al ser humano puede co-expresar CD49c, CD90 y telomerasa. La población sustancialmente homogénea de células que se administra al ser humano puede co-expresar CD49c y CD90 o co-expresar CD49c, CD90 y telomerasa y expresar al menos tres factor tróficos seleccionados entre el grupo que consiste en BDNF, NGF, NT-3, IL-6, IL-7, IL-11, SCF, MCP-1, MMP-9 y Cistatina-C (por ejemplo, BDNF, IL-6 y MCP-1). 55

La síntesis y secreción de citoquinas y factores tróficos desde la población aislada de células obtenida por los métodos de la invención puede proteger a las células adyacentes o distantes del sitio de trasplante de daño adicional como consecuencia de la afección degenerativa, por lesión aguda o neurológica. La síntesis y secreción de citoquinas y factores tróficos desde la población aislada de células obtenida por los métodos de la invención también puede, o como alternativa, promover la regeneración de células y tejidos del hospedador (por ejemplo, un ser humano que padece una afección por lesión aguda, neurológica, cardíaca o degenerativa) tratado con la población 60 aislada de células que co-expresan CD49c y CD90. 65

La población aislada de células que co-expresan CD49c y CD90 obtenida por los métodos de la invención cuando se administra al ser humano puede responder a señalización celular y señales fisiológicas en el ser humano y migrar al área de lesión o traumatismo y, por lo tanto, usarse como vehículos de suministro para proteínas y genes de interés.

5 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica (por ejemplo, lesión de médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, apoplejía, lesión cerebral traumática, enfermedad de Fabry, distrofia metacromática, leucodistrofia suprarrenal, enfermedad de Canavan, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher, enfermedad de Nieman-pick, un tumor cerebral) cultivando una fuente de una población celular a una densidad de siembra de menos de aproximadamente 100  
10 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo contenido de oxígeno; seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, una población de células que co-expresan CD49c y CD90; y administrando la población de células que co-expresan CD49c y CD90 al ser humano.

15 El trasplante de las poblaciones celulares aisladas obtenidas por los métodos de la invención a un paciente que padece una afección neurológica puede provocar la diferenciación de las células de la invención en células que normalmente funcionan en el tejido nervioso afectado en el ser humano con la afección neurológica tratando de ese modo una miríada de afecciones neurológicas incluyendo, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, ALS, lesión de médula espinal, tumores cerebrales, apoplejía. Asimismo, las poblaciones celulares aisladas obtenidas por los  
20 métodos de la invención pueden usarse para tratar a un ser humano que padece una afección no neurológica tal como una quemadura, enfermedad cardíaca, diabetes, osteoartritis y artritis reumatoide. Las poblaciones celulares aisladas obtenidas por los métodos de la invención administradas a un paciente (también mencionado en este documento como individuo, en particular un ser humano) que padece una afección cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio) pueden diferenciarse en células de músculo cardíaco (también mencionadas en este documento como cardiomiocitos).

25 Las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención pueden tener la capacidad de responder a señales intrínsecas (por ejemplo, en los sitios de trasplante o cuando se incorporan en tejidos y órganos) y señales exógenas para diferenciarse en numerosos tipos celulares (por ejemplo, neuronales, gliales, astrocitos, oligodendrocitos) en el ser humano. Las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención pueden proporcionar una fuente fácilmente disponible de células para su uso en el tratamiento de seres humanos. Las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención pueden aislarse fácilmente de tejidos adultos o embrionarios, proliferan a altas tasas, tienen gran potencial de expansión, pueden ser estables durante largos periodos de tiempo, pueden ser sensibles a señales exógenas y pueden producir suficientes cantidades terapéuticas de moléculas de interés.

35 Por consiguiente, también se describe en este documento un método para preparar una célula progenitora comprometida cultivando (por ejemplo, en condiciones de bajo contenido de oxígeno, un 5 % de oxígeno) una fuente de una población celular (por ejemplo, células de médula ósea, células de médula ósea humana, grasa, sangre de cordón umbilical, piel) y seleccionando de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan  
40 CD49c y CD90. La población de células que co-expresan CD49c y CD90 se modifica para que se convierta en células progenitoras comprometidas. La selección de células de la fuente cultivada de la población celular células que co-expresan CD49c y CD90 se consigue mediante condiciones de bajo contenido de oxígeno (por ejemplo, oxígeno por debajo del oxígeno atmosférico, 5 % de oxígeno).

45 "Célula progenitora comprometida", como se usa en este documento, se refiere a una célula precursora obtenida de una fuente (por ejemplo, médula ósea humana, grasa, sangre de cordón umbilical, piel) que se desarrolla en una célula con un fin particular. Una célula progenitora comprometida puede ser, por ejemplo, una célula CD49c/CD90 derivada de médula ósea humana que puede diferenciarse o desarrollarse en, por ejemplo, una neurona, célula glial, astrocito, oligodendrocito o célula de músculo cardíaco.

50 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica cultivando una fuente de una población celular (por ejemplo, aspirados de médula ósea) y seleccionando (por ejemplo, mediante condiciones de cultivo de bajo contenido de oxígeno) de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90; co-expresan CD49c, CD90 y telomerasa; o co-expresan CD49c, CD90 y un marcador de linaje óseo. Las células seleccionadas que co-expresan, por ejemplo,  
55 CD49c y CD90 se modifican para convertirse en una célula progenitora comprometida y se administran a un ser humano con una afección neurológica (por ejemplo, una lesión de médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, apoplejía, una lesión cerebral traumática, enfermedad de Fabry, distrofia metacromática, leucodistrofia suprarrenal, enfermedad de Canavan, enfermedad de Pelizaeus Merz-bacher, enfermedad de Nieman-pick y un tumor cerebral).

60 Las técnicas para evaluar si una célula de la población sustancialmente homogénea de células de la invención que co-expresa CD49c y CD90; co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa; o CD49c, CD90 pero no expresa sialoproteína ósea (BSP) para convertirse en células progenitoras comprometidas pertenecen a la experiencia de los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las células que co-expresan CD49c y CD90 pueden cultivarse, seleccionarse y modificarse para producir y expresar los marcadores de células neuronales, tales como noggina, musashi o Sox2,  
65

que indicarían que las células son células progenitoras neuronales comprometidas. Las técnicas para determinar si una célula se ha convertido en una célula progenitora comprometida están bien establecidas y son conocidas para los especialistas en la técnica (por ejemplo, PCR cuantitativa, citometría de flujo).

- 5 Las células que co-expresan CD49c y CD90 pueden seleccionarse de una fuente de una población celular para preparar las células progenitoras comprometidas. Las células seleccionadas que co-expresan CD49c y CD90 (también mencionadas en este documento como "células seleccionadas") pueden, por ejemplo, modificarse para convertirse en células progenitoras comprometidas cultivando las células seleccionadas en:
- 10 1. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml;  
 2. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/0,25 ng/ml de IL-β;  
 3. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/2 ng/ml de TNFα;  
 4. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/100 ng/ml de NT-3;  
 5. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/100 ng/ml de Noggina;  
 15 6. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/100 ng/ml de GDNF;  
 7. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/20 ng/ml/bFGF;  
 8. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/Forskolina 10 μM;  
 9. DMEM/F12/ITS/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml/Bay K 8644 1 μM; y/o  
 10. DMEM/F12/B27/Glutamina 2 mM/BSA 1 mg/ml.  
 20 11. MEM-Alfa/Glutamina 4 mM/suero bovino fetal de lote de suero seleccionado al 10 % y nifedipina 5 mM

Las células seleccionadas pueden usarse directamente de los cultivos o almacenarse para uso futuro (por ejemplo, congelando en nitrógeno líquido).

- 25 Las células progenitoras comprometidas descritas en este documento pueden no expresar CD34 y/o CD45. Las células progenitoras comprometidas descritas en este documento pueden expresar al menos un factor trófico seleccionado entre el grupo que consiste en BDNF, NGF, NT-3, IL-6, IL-7, IL-11, SCF, MCP-1, VEGF, metaloproteína-9 de matriz (MMP-9) y Cistatina-C (por ejemplo, BDNF, IL-6 y MCP-1).

- 30 También se describe en este documento un método para tratar a un ser humano que padece una afección neurológica, que comprende cultivar una fuente de una población celular (por ejemplo, médula ósea, médula ósea humana, grasa, sangre de cordón umbilical, piel) y seleccionar de la fuente cultivada de la población celular, las células que co-expresan CD49c y CD90. Las células seleccionadas se modifican para convertirse en una célula progenitora comprometida. Las células progenitoras comprometidas se administran a un ser humano.

- 35 También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco. La población celular que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco puede incluir adicionalmente la expresión de telomerasa. La población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco puede derivarse de células de médula ósea humana.

- 45 "Factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco", como se usa en este documento, se refiere a una proteína, o el gen que produce una proteína, o parte de una proteína, que regula la transcripción de genes asociados con o expresados por células de músculo cardíaco. En una realización particular, el factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco se selecciona entre el grupo que consiste en el factor de transcripción 4 de unión a GATA (GATA4) (Auda-Boucher, G. et al., Dev. Bio. 225:214-225 (2000)); gen 4 de homeocaja Iroquois (Irx4) (Bao, Z., et al., Science 283:1161-1164 (1999); Auda-Boucher, G., et al., Dev. Bio. 225:214-225 (2000)); y Nkx2.5/CSX (homeocaja cardio específica), también mencionado como "Nkx2.5" (Bao, Z., et al., Science 283:1161-1164 (1999);  
 50 Auda-Boucher, G., et al., Dev. Bio. 225:214-225 (2000)).

- La población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco y, opcionalmente, telomerasa, puede diferenciarse en una célula de músculo cardíaco (también mencionada en este documento como cardiomiocito). La población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco y, opcionalmente, telomerasa, también puede expresar al menos un factor trófico (por ejemplo, IL-6, VEGF, MCP1, BDMF).

- 60 También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea en que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco, pero no expresa sialoproteína ósea. La población celular sustancialmente homogénea, que no expresa sialoproteína ósea, también puede expresar un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco (por ejemplo, GATA4, Irx4, Nkx2.5).

- 65 También se describe en este documento una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, y al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en GATA4, Irx4 y Nkx2.5. Esta población celular sustancialmente homogénea puede expresar adicionalmente telomerasa.

5 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco que comprende cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con el inhibidor de proteína quinasa C (por ejemplo, queleritrina, H-7 diclorhidrato, K252a, estaurosporina, bisindolilmaleimida I-V y Calfostina C) y un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, azacitidina). El método puede incluir adicionalmente seleccionar de la población celular tratada las células que co-expresan CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco.

10 La fuente de la población celular usada en los métodos de la invención incluye una fuente de médula ósea humana. En una realización más preferida, la fuente de médula ósea humana es una fuente de médula ósea adulta.

15 En una realización particular, el inhibidor de proteína quinasa C usado en los métodos de la invención es queleritrina y el inhibidor de la metilación del ADN es 5-azacitidina.

20 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco que comprende las etapas de cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

25 Las poblaciones aisladas obtenidas por los métodos de la invención que co-expresan CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco tienen tiempos de duplicación más largos (por ejemplo, menos de aproximadamente 72 horas, menos de aproximadamente 65 horas, menos de aproximadamente 60 horas) que células de la invención que no se trataron con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN y no expresan al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco. Las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención pueden marcarse. Las células marcadas pueden administrarse a los individuos (por ejemplo, animales de laboratorio, tales como ratas, ratones, o seres humanos) y el destino de las células marcadas puede determinarse en un momento (por ejemplo, días, meses, años) después de la administración. Las células pueden radiomarcarse, marcarse de forma fluorescente, o marcarse con otros compuestos (por ejemplo, biotina) para permitir su localización en el individuo.

35 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco, que comprende las etapas de cultivar una fuente de la población celular (por ejemplo, células de médula ósea adulta) en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C (por ejemplo, queleritrina) y un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, 5-azacitidina).

40 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4 y Nkx2.5, que comprende las etapas de cultivar una fuente de una población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN. El método incluye adicionalmente seleccionar de la población celular tratada, las células que co-expresan CD49c, CD90, telomerasa, y al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en GATA4, Irx4 y Nkx2.5.

50 También se describe en este documento el método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, GATA4, Irx4, y Nkx2.5, que comprende las etapas de cultivar una fuente de una población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno y tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C en un inhibidor de la metilación del ADN. Las células que co-expresan CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4 y Nkx2.5 pueden seleccionarse de las células tratadas.

55 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco, que comprende la etapa de tratar una población celular que co-expresa CD49c y CD90 con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

60 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco, que comprende la etapa de tratar una población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

65 También se describe en este documento un método para preparar una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, telomerasa, GATA4, Irx4 y Nkx2.5, que comprende las etapas de tratar una población celular que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa con un inhibidor de proteína quinasa C y un inhibidor de la metilación del ADN.

Los métodos de la invención pueden incluir adicionalmente seleccionar de las células tratadas, las células que co-expresan CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco (por ejemplo, GATA4, Irx4, Nkx2.5).

5 En una realización, la población celular de la invención puede ser una población de células madre. En otra realización, la población celular de la invención puede ser una población celular aislada o una población aislada de células madre.

10 Las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención, en particular, las poblaciones celulares que co-expresan al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco pueden usarse para tratar una afección cardíaca tal como infarto de miocardio o fallo cardíaco congestivo en un ser humano. Las poblaciones celulares encuentran aplicación en un método para tratar un infarto de miocardio o fallo cardíaco congestivo en un individuo (por ejemplo, un ser humano), que comprende la etapa de administrar una población celular  
15 sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco al individuo.

El factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco expresado por las células usadas para tratar el infarto de miocardio en el ser humano se selecciona entre el grupo que consiste en GATA4, Irx4 y Nkx2.5 (también  
20 mencionado en este documento como "Nkx2.5/CSX").

Las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención pueden administrarse próximas a la localización de la afección cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio, fallo cardíaco congestivo). Por ejemplo, en un ser humano que padece un infarto de miocardio, las poblaciones celulares obtenidas por los métodos de la invención  
25 pueden administrarse próximas al infarto de miocardio (por ejemplo, en el músculo cardíaco en el sitio del infarto). Las poblaciones celulares pueden administrarse directamente en el tejido de músculo cardíaco o espacios del corazón (los espacios ventriculares o auriculares).

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo  
30 en un ser humano que comprende las etapas de cultivar una fuente de una población celular (por ejemplo, células de médula ósea adulta) en condiciones de bajo contenido de oxígeno; tratar la fuente cultivada de la población celular con un inhibidor de proteína quinasa C (por ejemplo, queleritrina) y un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, 5-azacitidina); y administrar la población celular tratada al ser humano.

También se describe en este documento un método para tratar un infarto de miocardio o un fallo cardíaco congestivo  
35 en un ser humano, que comprende las etapas de tratar la población celular (por ejemplo, células de médula ósea adulta) que co-expresa CD49c y CD90 con un inhibidor de proteína quinasa C (por ejemplo, queleritrina) y un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, 5-azocitidina). Las células tratadas se administran al ser humano. La población celular que se trata con el inhibidor de proteína quinasa C y el inhibidor de la metilación del ADN puede  
40 incluir adicionalmente una población celular que co-expresa telomerasa. El método puede incluir adicionalmente seleccionar de las células tratadas, las células que co-expresan, CD49c, CD90, al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco (por ejemplo, GATA4, Irx4, Nkx2.5) y, opcionalmente, telomerasa.

También se describe en este documento un método para formar un tipo de célula progenitora comprometida, que  
45 comprende la etapa de combinar una población sustancialmente homogénea de células que co-expresan CD49c y CD90 con una población de células que incluye al menos un tipo de célula progenitora comprometida. El tipo de célula progenitora comprometida puede formarse *in vitro* o *in vivo*. La formación del tipo de célula progenitora comprometida puede formarse *in vivo* administrando la población sustancialmente homogénea de células que co-expresan CD49c y CD90 a un humano. Por ejemplo, el método puede usarse para formar una célula neuronal  
50 combinando la población celular sustancialmente homogénea con una población celular neuronal (por ejemplo, el sistema nervioso central o periférico).

La población de células, que se combinan con las células obtenidas por los métodos de la invención para formar un tipo de célula progenitora comprometida, pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en una población de  
55 células nerviosas y una población de células de músculo cardíaco. La población de células que co-expresan CD49c y CD90 también puede expresar telomerasa. La población de células que co-expresan CD49c y CD90 y, opcionalmente, telomerasa, también puede expresar al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco. La población sustancialmente homogénea de células usada para formar un tipo de célula progenitora comprometida puede estar aislada. La población sustancialmente homogénea de células que se emplea en el  
60 método para formar las células progenitoras comprometidas puede ser una población de células madre sustancialmente homogénea.

La población celular aislada que co-expresa CD49c y CD90 obtenida por los métodos de la invención tiene un tiempo de duplicación menor de 30 horas cuando se cultiva en condiciones de bajo contenido de oxígeno (por  
65 ejemplo, menos de aproximadamente el 15 % en volumen de oxígeno, menos de aproximadamente el 10 % en volumen de oxígeno, menos de aproximadamente el 5 % en volumen de oxígeno).

- En otra realización más, la invención es un método para preparar una población celular aislada que co-expresa CD49c, y CD90 como se ha definido anteriormente, que tiene un tiempo de duplicación menor de 30 horas cuando se cultiva en condiciones de bajo contenido de oxígeno (por ejemplo, menos de aproximadamente el 15 % en volumen de oxígeno, menos de aproximadamente el 10 % en volumen de oxígeno, menos de aproximadamente el 5 % en volumen de oxígeno), donde la población celular aislada se forma por un método que comprende la etapa de cultivar una fuente de población celular a una densidad de siembra de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de bajo contenido de oxígeno.
- Una población celular aislada obtenida por el método de la invención encuentra aplicación en una composición farmacéutica que comprende una población aislada que co-expresa CD49c y CD90 (por ejemplo, entre aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> y 2 x 10<sup>6</sup> células). En una realización, la composición farmacéutica tiene al menos aproximadamente 10<sup>5</sup> células sustancialmente homogéneas que co-expresan CD49c y CD90. En otra realización, la composición farmacéutica tiene al menos aproximadamente 10<sup>6</sup> células sustancialmente homogéneas que co-expresan CD49c y CD90. Las células que constituyen la composición farmacéutica también pueden no expresar CD34 y/o CD45 y/o pueden expresar al menos un factor trófico seleccionado entre el grupo que consiste en BDNF, NGF, NT-3, IL-6, IL-7, IL-11, SCF, MCP-1, metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9), Cistatina-C y VEGF.
- También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90 y telomerasa.
- También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardíaco y, opcionalmente, telomerasa.
- También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c, CD90, GATA4, Irx4, Nkx2.5 y, opcionalmente telomerasa.
- La población celular aislada obtenida por los métodos de la invención que co-expresa CD49c y CD 90 puede administrarse a un ser humano que padece una afección neurológica. Una "cantidad terapéuticamente beneficiosa" de la población aislada de células obtenida por los métodos de la invención es una cantidad suficiente para potenciar la función neuronal en un sujeto que tiene una afección neurológica (por ejemplo, lesión de médula espinal) que es clínicamente relevante.
- Las células obtenidas por el método de la invención pueden, por ejemplo, trasplantarse, colocarse o administrarse, por ejemplo, en el sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro o médula ósea), sistema nervioso periférico o tejido cardíaco (por ejemplo, músculo cardíaco). El sitio de colocación en el sistema nervioso o tejido cardíaco para las células se determina basándose en la afección neurológica o cardíaca particular (por ejemplo, inyección directa en el parénquima de la médula ósea lesionada, inyección intra-tecal, inyección intracardiaca, o inyección intravenosa). Por ejemplo, las células obtenidas por el método de la invención pueden colocarse en o cerca de la sustancia negra de pacientes que padecen enfermedad de Parkinson. Asimismo, las células pueden colocarse en o cerca de la médula ósea (por ejemplo, cervical, torácica, lumbar o sacra) de pacientes que padecen una lesión de médula espinal. Asimismo, las células pueden administrarse al músculo cardíaco (por ejemplo, músculo cardíaco ventricular o auricular) en un paciente que padece un infarto de miocardio u otra afección cardíaca.
- Las células obtenidas por el método de la invención pueden colocarse o trasplantarse en cavidades o espacios del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, espacio ventricular del corazón, o espacio auricular del corazón. Por ejemplo, las células pueden colocarse en los ventrículos del cerebro, espacio subaracnoideo de la médula ósea, canal vertebral de la médula ósea, ventrículos o aurículas del corazón. Un especialista en la técnica sería capaz de determinar el modo (por ejemplo, inyección o colocación con aguja, cirugía más invasiva) más adecuado para la colocación de las células dependiendo de la localización de la afección neurológica y el estado médico del paciente.
- Además, las vías de administración de las células obtenidas por el método de la invención, o cuando dichas células se mezclan con vehículos farmacéuticos incluyen, por ejemplo, vía intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, subcutánea, administración oral, o nasal.
- Las células obtenidas por el método de la invención que co-expresan CD49c y CD90 pueden administrarse solas o en forma de mezclas con excipientes convencionales, por ejemplo, sustancias de vehículo orgánicas o inorgánicas farmacéutica o fisiológicamente aceptables adecuadas para aplicación enteral o parenteral que no reaccionan de forma perjudicial con las células de la invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, soluciones salinas (tales como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácido graso, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidina. Dichas preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan de forma perjudicial con las células.

5 Cuando se necesita o desea aplicación parenteral, las mezclas particularmente adecuadas para las células son soluciones estériles inyectables, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones, o implantes, incluyendo supositorios y remojo en GELFOAM®. En particular, los vehículos para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de dextrosa, solución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y polímeros de bloque de polioxietileno. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para su uso son bien conocidas para los especialistas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17ª Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 96/05309.

10 Las células que co-expresan CD49c y CD90 obtenidas por el método de la invención pueden usarse solas o en cualquier combinación cuando se administran a un ser humano que padece una afección neurológica. Por ejemplo, pueden co-administrarse esteroides o fármacos sintéticos farmacéuticos con las células. Asimismo, el tratamiento de lesión de médula espinal puede incluir la administración/trasplante de las células obtenidas por el método de la invención en un ser humano cuya médula se ha estabilizado físicamente.

15 La dosificación y frecuencia (dosis únicas o múltiples) de la administración o trasplante de las células a un ser humano, incluyendo la cantidad real de células trasplantadas en el ser humano, pueden variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la afección particular que se esté tratando (por ejemplo, afección neurológica, afección cardíaca, tal como un infarto de miocardio, afección degenerativa, lesión aguda), tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal, dieta del ser humano, naturaleza y grado de los síntomas de la afección neurológica (por ejemplo, enfermedad de Parkinson de aparición temprana frente a enfermedad de Parkinson avanzada; traumatismo de médula ósea frente a seccionamiento parcial o completo de la médula ósea), o afección cardíaca (por ejemplo, fallo cardíaco congestivo, infarto de miocardio); tipo de tratamiento concurrente (por ejemplo, esteroides); complicaciones de la afección neurológica o cardíaca; grado de tolerancia al tratamiento u otros problemas relacionados con la salud.

20 Los seres humanos con una afección neurológica o cardíaca pueden tratarse durante días (por ejemplo, 30) con células obtenidas por los métodos de la invención (por ejemplo, aproximadamente  $10^6$  células), por varias vías de administración (por ejemplo, intra-tecal, intravenosa).

30 También se prevé que los métodos descritos en este documento puedan emplearse para tratar afecciones neurológicas en mamíferos diferentes al ser humano. Por ejemplo, un mamífero no humano en necesidad de tratamiento veterinario, por ejemplo, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas).

35 La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no son pretendidos ser limitantes de ningún modo.

#### 40 Ejemplificación

##### **Ejemplo 1: Aislamiento de un células adherentes como unidades formadoras de colonias o "CFU" de aspirados de médula ósea después de lisis de los glóbulos rojos**

45 Se aspiraron células de médula ósea de la cresta ilíaca de voluntarios humanos adultos sanos. El componente de glóbulos rojos del aspirado se lisó mezclando el aspirado con un tampón de cloruro de amonio que consistía en cloruro de amonio 155 mM, bicarbonato de potasio 10 mM y EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) 0,1 mM, pH 7,2, a una proporción 1:20 de aspirado de médula a tampón. La suspensión celular resultante se agitó en vórtice durante 2 segundos, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó (10 minutos a 500 x g). El sedimento celular mononuclear resultante se resuspendió en medio completo y se centrifugó (10 minutos a 500 x g).

50 El medio completo es medio esencial mínimo-alfa (Gibco BRL, Rockville, MD) suplementado con glutamina 4 mM y suero bovino fetal de lote de suero seleccionado al 10 % (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD). El sedimento celular después se resuspendió en el medio completo y se centrifugó una segunda vez (10 minutos a 500 x g).

55 El sedimento resultante se resuspendió en el medio completo y se determinó la cantidad de células viables por exclusión de azul de tripano. La suspensión celular mononuclear después se sembró en matraz T75 tratado con cultivo tisular a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> y se incubó a 37 °C en una atmósfera que consistía en 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno, y 90 % de nitrógeno. En el quinto día de cultivo, las células no adherentes y el medio condicionado (también mencionado en este documento como "medio gastado") se aspiraron de los matraces y a las células adherentes se les volvió a administrar medio completo fresco. Las unidades formadoras de colonias (CFU) adherentes se expandieron durante 3-5 días adicionales.

60 La generación de CFU se controló en placas de 6 pocillos iniciadas de forma concurrente en condiciones idénticas a los matraces T75. El medio gastado se retiró de las placas de 6 pocillos y las células adherentes se fijaron durante 5 minutos en metanol al 100 %, y después se tiñeron con azul de metileno para visualizar las CFU. Una densidad de siembra inicial de 75.000 células/cm<sup>2</sup> generó de forma eficaz CFU. Después de procesar el aspirado de médula ósea por separación en gradiente de densidad de FICOLL® o lisis con cloruro de amonio, la eficacia de CFU se vio

drásticamente afectada por la concentración de oxígeno.

Después de 7 días en cultivo, se determinó la pureza (porcentaje de células que co-expresan CD49c y CD90) de las CFU generadas por citometría de flujo. Los matraces T75 se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS; CellGro Technologies) y se trataron con tripsina al 0,1 %/solución de EDTA 1 mM (Life Technologies) durante 10 minutos a 37 °C. Los cultivos se retiraron de la incubadora y se añadieron 10 ml de medio completo. Las células se trituraron del matraz, se transfirieron a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron (500 x g durante 5 minutos). El sedimento resultante se resuspendió en 10 ml de HBSS.

Las células resuspendidas (aproximadamente  $10^6$ ) se separaron en alícuotas en 12xtubos de citometría de flujo de 75 mm y se volvieron a sedimentar a 500 x g durante 5 minutos. El HBSS se retiró y se colocaron 25 ml de los siguientes anticuerpos (todos obtenidos de Becton Dickenson), solos o en combinación, en cada tubo: IgG1k de ratón-FITC o -PE (clon MOPC-21) CD49c-PE (cl. C3II.1), CD90-FITC (cl. 5E10), CD45-FITC o -PE (cl. HI30). Los tubos se agitaron con vórtice suavemente y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células después se lavaron en HBSS/albúmina sérica bovina al 1 %, se centrifugaron (30 min, 4 °C) y el sedimento celular resultante se fijó mediante la adición de 250 microlitros de paraformaldehído al 2 %/HBSS. Se realizó análisis citométrico de flujo empleando un citómetro Becton-Dickenson FACSVantage SE y se analizó usando el software CELLQUEST®. Las Figuras 1A, 1B y 1C describen los resultados que representan los datos recogidos de 2.500-10.000 eventos por panel. Después de la compensación para tinción con anticuerpo no específico usando controles de isotipo de IgG1 de ratón, se evaluó la expresión celular de CD45, CD49c y CD90 en las células cultivadas de médula ósea. La población adherente derivada de las células mononucleares inicialmente purificada usando lisis con cloruro de amonio contenía aproximadamente un 70 % de células CD49c positivas en una fase similar de cultivo (Figura 1A). La mayoría de las células que no expresaban CD49c fueron positivas para la expresión del marcador de linaje hematopoyético/mieloide CD45 (Figura 1A, cuadrante LR), lo que demuestra que la población celular CD49c positiva derivada de médula ósea humana aislada no estaba directamente relacionada con precursores hematopoyéticos conocidos. Más del 94 % de la población adherente era CD90 y CD49c positiva (Figura 1B).

#### **Ejemplo 2: Aislamiento de CFU adherentes de aspirados de médula ósea después de separación por densidad**

Se aspiraron células de médula ósea de la cresta ilíaca de voluntarios humanos adultos sanos. El aspirado de médula ósea se diluyó con solución salina tamponada con fosfato libre de calcio y magnesio (PBS) para conseguir una concentración de células mononucleares de  $7 \times 10^6$  células/ml y se revistió con un volumen igual de HISTOPAQUE® 1.119 (Sigma, St. Louis, MO) y se centrifugó (30 min. a 700 x g). La fracción resultante de células mononucleares se transfirió a un tubo de centrifuga limpio que contenía PBS y se centrifugó (10 minutos a 500 x g). El sedimento celular se resuspendió en PBS y se centrifugó (10 minutos a 500 x g). El sobrenadante se aspiró del sedimento celular y las células se resuspendieron en medio completo.

La cantidad de células viables en la suspensión celular resultante se determinó por exclusión de azul de tripano. La suspensión celular después se sembró en matraces T75 tratados con cultivo tisular a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno y 90 % de nitrógeno. En el quinto día de cultivo, las células no adherentes y el medio condicionado (también mencionado en este documento como "medio gastado") se aspiraron de los matraces y a las adherentes se les volvió a suministrar medio completo. Las CFU adherentes se expandieron durante 3-5 días adicionales.

El análisis de citometría de las CFU generadas mostró que aproximadamente el 50 % de la población adherente expresaban el marcador CD49c a los 7 días in vitro (Figura 2A, suma de los cuadrantes UL y UR). La mayoría de las células que no expresaban CD49c eran positivas para la expresión del marcador de linaje hematopoyético/mieloide CD45 (Figura 2A, cuadrante LR), lo que demuestra que la población celular CD49c positiva derivada de médula ósea humana aislada por este procedimiento no estaba directamente relacionada con precursores hematopoyéticos conocidos. Más del 91 % de la población adherente era CD90 y CD49c positiva (Figura 2B).

#### **Ejemplo 3: Producción de bancos celulares primario y maestro a partir de CFU**

Después de 7-10 días en cultivo, las CFU generadas usando los métodos descritos en el Ejemplo 1 se retiraron de los matraces T75 con una solución de tripsina al 0,25 %/EDTA 1 mM (Life Technologies). Después de 10 minutos a 37 °C, la tripsina se inactivó con 10 ml de medio completo. Las células se lavaron una vez con HBSS y se resuspendieron en Glycerol Cell Freezing Medium® (Sigma Chemical Co.). Las alícuotas (mencionadas en este documento como el "banco celular primario" o "banco celular de siembra") de la suspensión que consiste en  $4,0 \times 10^5$  células/vial se enfriaron con vapor de nitrógeno líquido a 1 °C/minuto usando un congelador de velocidad controlada CryoMed (Forma) y se almacenaron en un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido Cryo Plus (Forma).

Se retiró una alícuota de células del banco celular primario y se cultivó a una densidad de 30 células/cm<sup>2</sup> en placas tratadas con cultivo tisular de 500 cm<sup>2</sup> (Corning) en medio completo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que consistía en 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno, y 90 % de nitrógeno. Después de dos semanas de cultivo, las células se retiraron de las placas con tripsina y se crioconservaron a  $4,0 \times 10^5$  células/vial (mencionadas en este

documento como el "banco celular maestro" o "banco celular de producción").

La pureza de las células (porcentaje de células que co-expresan CD49c/CD90) en el banco celular maestro se determinó por citometría de flujo usando el mismo método que anteriormente. La inmensa mayoría (>98 %) de la población resultante expresaba CD90 (Figura 1 C) y carecía virtualmente de cualquier expresión del marcador relacionado con linaje mieloide CD45 (Figura 1C, cuadrante LR). Por tanto, el procedimiento de expansión descrito en este documento produce una población sustancialmente homogénea de células adherentes que co-expresan CD49c y CD90 y carecen de expresión significativa del marcador CD45.

Asimismo, el banco celular maestro generado a partir de las CFU derivadas usando el método del Ejemplo 2 mostró que la mayoría de las células (>98,8 %) de la población celular resultante expresaba CD90 (Figura 2C) y carecía virtualmente de cualquier expresión del marcador relacionado con linaje mieloide CD45 (Figura 2C, cuadrante LR). Por tanto, el procedimiento de expansión descrito en este documento genera una población sustancialmente homogénea de células adherentes que co-expresan CD49c y CD90 y carecen de expresión significativa del marcador CD45.

#### **Ejemplo 4: Capacidad de expansión de la población celular que co-expresa CD49c y CD90**

Se obtuvo un banco celular primario de CFU a partir de 25 ml de aspirado de médula ósea y se almacenó como alícuotas congeladas usando los métodos de los Ejemplos 1 y 2. Se descongeló una alícuota, se expandió y se congeló para generar el banco celular maestro como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se retiró una alícuota de células del banco celular maestro y se cultivó a una densidad de 30 células/cm<sup>2</sup> en placas tratadas con cultivo tisular de 500 cm<sup>2</sup> (Corning) en medio completo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que consistía en 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno, y 90 % de nitrógeno. Después de dos semanas de cultivo, las células se retiraron de las placas con tripsina y se crioconservaron a 2-10 x 10<sup>6</sup> células/vial. El proceso se repitió en sucesión para producir bancos celulares adicionales de células que co-expresan CD49c y CD90.

La cantidad de células generada a partir de una única alícuota al final de cada expansión sucesiva se determinó por exclusión de tripano y se multiplicó por la cantidad de alícuotas para calcular el rendimiento (Figura 3). Cuatro expansiones sucesivas pueden generar potencialmente hasta 1 x 10<sup>17</sup> células a partir de 25 ml de aspirado de médula ósea obtenida de un único donante. La cantidad de duplicaciones celulares se calculó a partir de los rendimientos celulares usando la siguiente fórmula: (Log(nº de células finales) - Log (nº de células de partida))/Log(2) ("2" se refiere a duplicación). La población celular experimentó aproximadamente 8 duplicaciones durante cada expansión (Figura 4). La velocidad de duplicación (nº de días en cultivo x 24/duplicaciones) fue de 30 h y permaneció constante durante al menos 50 duplicaciones. Incluso después de 30 duplicaciones, la población retuvo de forma uniforme la morfología característica de células pequeñas en división sin evidencias aparentes de la morfología plana y alargada de las células envejecidas o diferenciadas de forma terminal.

#### **Ejemplo 5: Expresión de transcritos que codifican reguladores del crecimiento celular y diferenciación de osteoblastos por poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90**

La expresión de transcritos para telomerasa, p21, p53, CBFA1 y BSP se determinó usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). En resumen, se derivó el banco celular maestro de CFU de un aspirado de médula ósea y se almacenó como alícuotas congeladas usando el método del Ejemplo 1. Se descongeló una alícuota, se cultivó a una densidad de 30 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 tratados con cultivo tisular en medio completo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que consistía en 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno, y 90 % de nitrógeno.

Después de dos semanas de cultivo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 3000 células/pocillo. Se aisló el ARN usando los reactivos QIAGEN RNeasy y el Qiagen Biorobot 3000. Se usó una alícuota del ARN eluido para sintetizar el ADNc. El ARN se mezcló con Promega MMLV, dNTP, decámeros y RNasin y se incubó a 37 °C durante 1 hora, seguido de inactivación por calor. Para PCR cuantitativa (qPCR), se combinaron muestras de ADNc con reactivos Applied Biosystems SYBR Green PCR Core y cebadores específicos de amplicón, como se describe a continuación, en un formato de 384 pocillos. La placa de 384 pocillos después se transfirió al Applied Biosystems ABI Prism 7900 para análisis por qPCR. El programa de qPCR implicó un ciclo de 2 minutos a 50 °C, seguido de un ciclo de 10 minutos a 95 °C para activar la polimerasa. Esto estuvo seguido de 40 ciclos de amplificación que consistían en 15 segundos de fusión a 95 °C y un minuto de extensión/hibridación a 60 °C.

Los valores umbral de ciclo se convirtieron en la cantidad relativa de transcritos usando una curva patrón, después se normalizaron usando el correspondiente 18s. Los datos se expresan como una proporción de transcritos por 10<sup>6</sup> transcritos de 18s. El nombre, ID de Genbank, localización en pb y secuencia de los cebadores de qPCR son los siguientes:

18s-1F, K03432, 1742-1760 pb, 5'-ATG GGG ATC GGG GAT TGC A-3' (SEC ID N° 1);  
 18s-1R, K03432, 1871-1890 pb, 5'-CCG ATC CGA GGG CCT CAC TA-3' (SEC ID N° 2);  
 BSP-1F, NM000582, 483-508 pb, 5'-CAC TCC AGT TGT CCC CAC AGT AGA CA3' (SEC ID N° 3);  
 BSP-1R, 611-632 pb, 5'-TCG CTT TCC ATG TGT GAG GTG A-3' (SEC ID N° 4);

CBFA1-1F, L40992, 389-407 pb, 5'-GGC CGG AGT GGA CGA GGC AA-3' (SEC ID N° 5);  
 CBFA1-1R, L40992, 504-529 pb, 5'-CAT CAA GCT TCT GTC TGT GCC TTC TG-3' (SEC ID N° 6);  
 p21-1F, 567388, 52-72 pb, 5'- ACC GAG GCA CTC AGA GGA GGC-3' (SEC ID N° 7);  
 p21-1R, S67388, 171-191 pb, 5'- GCC ATT AGC GCA TCA CAG TCG-3' (SEC ID N° 8);  
 5 p53-qFP4, M14694, 521-545 pb, 5'- GAT GTT TTG CCA ACT GGC CAA GAC C-3' (SEC ID N° 9);  
 p53-qRP4, M14694, 674-698 pb, 5'- AGG AGG GGC CAG ACC ATC GCT ATC T-3' (SEC ID N° 10);  
 Telo-1F; AF015950, 1500-1525 pb, 5'-ACA ACG AAC GCC GCT TCC TCA GGA AC-3' (SEC ID N° 11); y  
 Telo-1R, AF015950, 1625-1650 pb, 5'-GCC GGA ACA CAG CCA ACC CCT GG-3' (SEC ID N° 12).

10 La actividad telomerasa es necesaria para mantener los telómeros, que son secuencias de ADN localizadas en los extremos de los cromosomas. Como la mayoría de las células humanas carecen de telomerasa, los telómeros se acortan con cada división hasta que el crecimiento de las células se detiene (Harley, C.B., Mutation Research 256(2-6):271-282 (1991); Hara, E. et al., Biochem Biophys Res Commun 179(1):528-534 (1991); Shay, J.W. et al., Exp Cell Res 196(1):33-39 (1991)). Las poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90 expresan telomerasa al nivel de aproximadamente 13 transcritos/10<sup>6</sup> transcritos de ARNr 18S, que es coherente con el hallazgo de que esta población celular seguía proliferando a una tasa constante.

20 El supresor tumoral p53 desempeña una tarea clave en la respuesta de la célula a daño del ADN y la inactivación de este gen es una etapa importante en la carcinogénesis. La expresión de p53 se regula positivamente en respuesta a daño en el ADN. Su capacidad de prevenir la proliferación de células defectuosas implica la activación de varios genes de detención del crecimiento incluyendo p21 (Bums, T.F. et al., Oncogene 20(34):4601-4612 (2001)). La población celular sustancialmente homogénea de la invención que co-expresa CD49c y CD90 expresaba aproximadamente 670 transcritos de p53/10<sup>6</sup> transcritos de ARNr 18S. Este nivel de p53 muestra que el supresor tumoral p53 no estaba inducido.

25 p21 es un potente inhibidor del ciclo celular y su expresión durante el ciclo celular está estrictamente regulado a nivel transcripcional (Gartel, A.L. et al., Exp Cell Res 246(2):280-289 (1999)). p21 se induce en células con crecimiento detenido en respuesta a estrés oxidativo además de daño en el ADN (Yin, Y., et al., Mol Carcinog 24(1):15-24 (1999)). La población celular sustancialmente homogénea de la invención que co-expresa CD49c y CD90 expresaba aproximadamente 1690 transcritos de p21/10<sup>6</sup> transcritos de ARNr 18s. Este nivel de p21 muestra que p21 no estaba inducido y es coherente tanto con un bajo nivel de p53 como con el corto tiempo de duplicación medido en el Ejemplo 4.

35 El factor de transcripción, CBFA1, es necesario para la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso (Otto, F., Cell 89(5):765-771 (1997)). La sialoproteína ósea (BSP) es una proteína prominente, asociada a mineral en la matriz extracelular del hueso y se expresa por osteoblastos completamente diferenciados (Benson, M.D., et al., J Biol Chem 275(18):13907-13917 (2000)). La población celular sustancialmente homogénea de la invención que co-expresa CD49c y CD90 expresaba aproximadamente 130 transcritos de CBFA1/10<sup>6</sup> transcritos de ARNr 18S y BSP estaba ausente, que muestra que la población celular de la invención representa un progenitor que no se ha diferenciado significativamente en osteoblastos. La diferenciación de osteoblastos se describe en Ducy, P., Dev Dyn 219(4):461-471 (2000)).

**Ejemplo 6: Secreción de factores neurotróficos y citoquinas por una población celular sustancialmente homogénea que co-expresa CD49c y CD90**

45 Se descongeló una alícuota del banco celular maestro generado en el Ejemplo 1 y se sembró en matraces T75 a 2500 células/cm<sup>2</sup> con medio completo y se incubó al 5 % de O<sub>2</sub>. El día siguiente se retiró el medio y se reemplazó con medio completo fresco. El sobrenadante se recogió 8 horas después del T75 y se contaron las células (recuento celular = 280.000 células). El sobrenadante se separó en alícuotas en tubos de 1 ml y se almacenó a -20 °C. Otro T75 se procesó del mismo modo 3 días después (recuento celular = 2,43 millones). Los sobrenadantes se descongelaron después a temperatura ambiente y se ensayaron por ELISA para la secreción de los siguientes factores neurotróficos/citoquinas usando kits disponibles en el mercado: BDNF (Chemicon), NGF (Chemicon), MCP-1 (R and D Systems), e IL-6 (R and D Systems). Se realizaron múltiples diluciones sobre el sobrenadante para asegurar que los valores medidos caían dentro de los intervalos normales del ensayo. Además, se procesaron los medios obtenidos de células de control que secretaban las cantidades determinadas previamente de citoquina en paralelo para asegurar la validez del ensayo. Los valores se obtuvieron normalizando los datos sin procesar derivados de ELISA a tiempo (24 horas) y recuento celular (1 millón) normales y por tanto se expresan como "picogramos de citoquina secretada por 1 millón de células por periodo de 24 horas del siguiente modo:

Citoquina	Cantidad secretada (pg/10 <sup>6</sup> células/día)
MCP-1	1009,15
IL-6	18567,60
BDNF	8,88
NGF	80,12

**Ejemplo 7: Trasplante de una población celular sustancialmente homogénea de la invención que co-expresa**

**CD49c y CD90 en un modelo de rata de lesión aguda de médula espinal**

Después de lesión traumática a la médula ósea neuronal se produce con el tiempo muerte, inflamación y pérdida progresiva de neuronas dañadas. Una población celular sustancialmente homogénea de la invención que co-expresa CD49c y CD90 mejoró el resultado durante lesión neurológica aguda. Se trasplantó una población celular preparada como se describe en el Ejemplo 1 en médula ósea contusa de ratas adultas hembra Sprague-Dawley.

Se expuso la médula ósea torácica de ratas Sprague-Dawley por laminectomía al nivel de T10 bajo anestesia general. Después de completarse la laminectomía, se dejó caer una barra de 10 g desde una altura de 25 mm para producir una lesión de médula espinal de severidad moderada en la médula ósea expuesta usando el impactador de médula ósea NYU (Constantini, S. et al., J Neurosurg 80(1):97-111 (1994)). Durante la cirugía, la temperatura corporal de las ratas se mantuvo a 37 °C. Durante la recuperación, las ratas se colocaron durante una noche en una cámara de temperatura y humedad controladas. Siete días después de la lesión por impacto, se volvieron a exponer las médulas óseas. Usando una jeringa Hamilton estanca al gas de 50 ml (VWR Scientific Products, Bridgeport, NJ) con una aguja de calibre 30, se trasplantaron 250.000 células de la invención a una concentración de 25.000/ml en la médula ósea. Las células se inyectaron en el epicentro de la fístula al nivel T10 a una tasa de 2 ml/minuto. La aguja se dejó en el sitio durante 5 minutos adicionales antes de retirarla de la médula ósea. Después de la cirugía, todos los animales recibieron 30 mg/kg de metilprednisolona por vía intravenosa (i.v.) inmediatamente después de la cirugía. Para evitar el inmuno-rechazo, se dio Ciclosporina A (CsA) por vía subcutánea a 10 mg/kg 3 días antes del día de trasplante y se mantuvo después de ello.

Se realizó el ensayo locomotor de campo abierto de Basso-Beattie-Bresnahan (ensayo BBB) (Basso, D.B. et al., J Neurotrauma 12(1):1-21 (1995)) el día antes del trasplante (días 6 después de la lesión). Se realizó ensayo del comportamiento para cada extremidad inferior semanalmente usando los valores BBB. La valoración se realizó de forma ciega al estado de tratamiento. A los 19 días después de la contusión, los animales que había recibido una población sustancialmente homogénea de células que co-expresan CD49c y CD90, mostraron mayor mejora en el valor BBB que los animales que recibieron solamente PBS (10,6 ± 1,2 frente a 8,5 ± 0,3) (Figura 5).

A las 2 semanas después del trasplante, las médulas óseas contusas de algunos animales se retiraron y se examinaron para evidencias sobre la regeneración de fibras nerviosas. Se usó anticuerpo SMI 32 (Sternberger Monoclonals, Inc, Lutherville, MD) para inmunotemplar fibras en regeneración en la fístula a una dilución de 1:4000. Se observaron numerosas fibras creciendo en la fístula contusa.

**Ejemplo 8: Expresión de transcritos que codifican reguladores de la diferenciación neuronal por una población sustancialmente homogénea de células que co-expresan CD49c y CD90**

La expresión de transcritos para Sox-2 y Musashi se determinaron usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). En resumen, se derivó un banco celular maestro de CFU de un aspirado de médula ósea y se almacenó como alícuotas congeladas usando el método del Ejemplo 1. Se descongeló una alícuota y las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 2000 células/pocillo en medio completo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que consistía en 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno y 90 % de nitrógeno durante 3 días. En el tercer día de cultivo, las células se trataron con nifedipina 5 mM (un bloqueante de canales de calcio tipo L). Después de 24 horas de tratamiento, se aisló el ARN usando los reactivos QIAGEN®RNeasy y el Qiagen Biorobot 3000. Se usó una alícuota del ARN eluido para sintetizar ADNc. Específicamente, se mezcló el ARN con Promega MMLV, dNTP, decámeros y RNasin y se incubó a 37 °C durante 1 hora, seguido de inactivación por calor.

Para PCR cuantitativa, se combinaron muestras de ADNc con reactivos Applied Biosystems SYBR Green PCR Core y cebadores específicos de amplificación, como se describe a continuación, en un formato de 384 pocillos. La placa de 384 pocillos después se transfirió al Applied Biosystems ABI Prism 7900 para análisis por qPCR. El programa de qPCR implicó un ciclo de 2 minutos a 50 grados, seguido de un ciclo de 10 minutos a 95 grados para activar la polimerasa. Esto después estuvo seguido de 40 ciclos de amplificación que consistían en 15 segundos de fusión a 95 grados y un minuto de extensión/hibridación a 60 grados. Los valores umbral de ciclo se convirtieron en cantidad relativa de transcritos usando una curva patrón, después se normalizaron usando el correspondiente 18s. Los datos se expresan como una proporción de transcritos por 10<sup>6</sup> transcritos de 18s.

El nombre, ID de Genebank, localización en pb y secuencia de los cebadores de qPCR son los siguientes:

- 18s-1F, K03432, 1742-1760 pb, 5'-ATG GGG ATC GGG GAT TGC A-3' (SEC ID N° 1);
- 18s-1R, K03432, 1871-1890 pb, 5'-CCG ATC CGA GGG CCT CAC TA-3' (SEC ID N°2);
- Sox-2F, Z31560, 517-541 pb, 5'-GGC AGC TAC AGC ATG ATG CAG GAC C-3' (SEC ID N° 13);
- Sox-2R, 624-647 pb, 5'-CTG GTC ATG GAG TTG TAC TGC AGG-3' (SEC ID N° 14);
- Musashi-1F, AB012851, 370-389 pb, 5'-CAA GAT GGT GAC TCG AAC GA-3' (SEC ID N° 15);
- Musashi-1R, 480-499 pb, 5'-GGT TTT GTC AAA CAT CAG CA-3' (SEC ID N° 16).

El gen Sox-2 codifica un factor de transcripción nuclear conservado relacionado con el gen de determinación de testículos de mamífero que se expresa en todo el tubo neural durante el desarrollo del cerebro y es esencial para la

supervivencia del ectodermo neural primitivo (Uwanogho, Mech. Dev. 49:23-36 (1995)). Además, la expresión de Sox-2 persiste más allá del desarrollo en poblaciones restringidas de células madre neurales adultas, lo que sugiere una tarea adicional para este factor en la regulación del destino neural (Zappone, Development 127:2367-2382 (2000)). En condiciones no estimuladas en medio completo, las células que co-expresaban CD49c y CD90 expresaban aproximadamente 4 transcritos de Sox-2/10<sup>6</sup> transcritos de ARN 18S. Sin embargo, en respuesta a nifedipina, las células que co-expresaban CD49c y CD90 expresaban 28 transcritos de Sox-2/10<sup>6</sup> transcritos de ARN 18S, un aumento aproximado de 7 veces. Este aumento en la expresión de Sox-2 sugiere que, en respuesta a ciertos tratamientos epigenéticos, las células que co-expresaban CD49c y CD90 pueden presentar rasgos asociados con poblaciones neurales tempranas.

El gen Musashi codifica una proteína de unión a ARN que se expresa elevadamente dentro del sistema nervioso en desarrollo y, como Sox-2, también se expresa en células madre neurales de mamífero (Sakakibara, Dev Biol 176:230-242 (1996)). Además, la expresión de Musashi es necesaria para el desarrollo normal de múltiples poblaciones neuronales (Nakamura, Neuron 13:67-81 (1994)). En condiciones no estimuladas en medio completo, las células que co-expresaban CD49c y CD90 expresaban aproximadamente 0,005 transcritos de Musashi/10<sup>6</sup> transcritos de ARN 18S. Sin embargo, en respuesta a 24 horas de estimulación con nifedipina, las células que co-expresaban CD49c y CD90 expresaban 0,093 transcritos/10<sup>6</sup> transcritos de ARN 18S, un aumento aproximado de 17 veces. Este aumento en la expresión de Sox-2 sugiere que, en respuesta a ciertos tratamientos epigenéticos, las células que co-expresaban CD49c y CD90 pueden presentar rasgos asociados con poblaciones neurales tempranas.

#### **Ejemplo 9: El efecto de inyección intra-cardiaca de células madre de médula ósea adulta humana (hABM-SC) sobre infarto de miocardio**

Se determinó la capacidad de hABM-SC en la restauración de la función cardiaca después de inyección intra-cardiaca directa en un modelo animal de rata inducido con infarto de miocardio experimental. Puede determinarse la distribución y disposición de las hABM-SC en estos animales.

#### **Materiales y métodos**

##### **Células determinadas miocíticas tempranas (EMD) para inyección intra-cardiaca**

Se cultivaron hABM-SC en condiciones que inducen la expresión de factores de transcripción relacionados con músculo cardiaco para producir células determinadas miocíticas tempranas. Las células determinadas miocíticas tempranas se obtuvieron cultivando hABM-SC en presencia de un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, azacitidina) y un inhibidor de proteína quinasa C (por ejemplo, queleritrina). Las células determinadas miocíticas tempranas de la invención co-expresan CD49c, CD90 y al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco tal como Nkx2.5, Irx4 y GATA4.

"Células determinadas miocíticas tempranas ("EMD")", como se usa en este documento, se refiere a células que están parcialmente diferenciadas en cardiomiocitos. Los criterios para determinar si una célula es una célula determinada miocítica temprana incluyen, por ejemplo, expresión de al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco por la célula. Las células determinadas miocíticas tempranas pueden convertirse en células cardiacas (por ejemplo, células de músculo cardiaco, también mencionadas en este documento como cardiomiocitos).

La cardiomiogénesis, el desarrollo o diferenciación de cardiomiocitos, se caracteriza por una expresión específica de tiempo y específica de distribución de diversas proteínas y genes. El gen Nkx2.5/CSX (homeocaja cardio-específica) se ha identificado como uno de los genes más tempranos expresados durante el desarrollo del corazón, seguido muy de cerca por otra gen de homeocaja, el gen 4 de homeocaja Iroquois (Irx4) (Bao, Z., et al., Science 283: 1161-1164 (1999); Auda-Boucher, G., et al., Dev. Biol. 225: 214-225 (2000)). El regulador de la transcripción, factor de transcripción 4 de unión a GATA (GATA4), es abundante en el corazón y es importante en la diferenciación de miocitos (Auda-Boucher, G., et al., Dev. Biol. 225:214-225 (2000)). La co-expresión de Nkx2.5, Irx4 y GATA4 es única para células de músculo cardiaco (Mably, J.D., et al., Circulation Rec. 79(1):4-13 (1996)). La co-expresión de transcritos para Nkx2.5, Irx4 y GATA4 en hABM-SC se consiguió cultivando hABM-SC en las siguientes condiciones.

Se cultivaron células del banco celular maestro en un formato de 96 pocillos en medio completo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que consistía en 5 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno y 90 % de nitrógeno. Después de 2 días en cultivo, las células se cultivaron en presencia de 5-azacitidina 30 μM (un inhibidor de la metilación del ADN) y queleritrina 5 μM (un inhibidor de proteína quinasa C) durante 3-7 días en medio completo. También puede emplearse otros inhibidores de proteína quinasa C, tales como H-7 diclorhidrato, K252a, estaurosporina, bisindolilmaleimida I-V, y calfofostina C, en los métodos y condiciones de cultivo de la invención para producir células diferenciadas miocíticas tempranas. Además, también pueden usarse otros inhibidores de la metilación del ADN, tales como 5-aza-2-desoxicitida, 5-azaguanina, 5-aza-2-desoxiguanina, en los métodos y condiciones de cultivo de la invención para producir células diferenciadas miocíticas tempranas.

Después de 2 días de cultivo en presencia de azacitidina y queleritrina, se aisló el ARN de las células en cultivo. Se usó una alícuota del ARN eluido para sintetizar los ADNc para el análisis de la expresión de factores de transcripción relacionados con músculo cardiaco. El ARN se mezcló con transcriptasa inversa de virus de leucemia murina de Moloney Promega (MMLV). Los ADNc, dNTP, decámeros y RNasin se incubaron durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 37 °C, seguido de inactivación por calor. Para reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), las muestras de ADNc se combinaron con Applied Biosystems SYBR GREEN PCR 2X MASTER MIX® y cebadores específicos de amplicón en un formato de 384 pocillos. El ABI PRISM 7900 HT® realizó la qPCR usando un programa convencional de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 95 °C, aproximadamente 40 ciclos de amplificación que consisten en aproximadamente 15 segundos de fusión a aproximadamente 95 °C y un minuto de hibridación/extensión a aproximadamente 60 °C. Los valores umbral de ciclo se convirtieron en cantidad relativa de transcrito usando una curva patrón y después se normalizaron a los correspondientes transcritos de ARN 18s. Los datos se expresaron como una proporción de transcritos por 10<sup>6</sup> transcritos de ARN 18s. Los valores de control para transcritos evaluados estuvieron en el intervalo de 0,001-0,003. GATA4 se indujo a 0,71 transcritos, Irx4 a un nivel de 0,023 transcritos y Nkx2.5 a 0,023 transcritos, todos respecto a 10<sup>6</sup> ARN 18s. Las células que expresaban al menos un factor de transcripción relacionado con músculo cardiaco, por ejemplo, GATA4, Irx4 y Nkx2.5, son células determinadas miocíticas tempranas o hABM-SC determinadas miocíticas tempranas.

Las células determinadas miocíticas tempranas, que co-expresan GATA4, Irx4 y Nkx2.5, se sembraron a aproximadamente 30 células/cm<sup>2</sup> con medio completo y se incubaron a aproximadamente 37 °C en una atmósfera que consistía en aproximadamente 5 % de dióxido de carbono, aproximadamente 5 % de oxígeno y aproximadamente 90 % de nitrógeno. Después de 7 días en cultivo se reemplazaron todos los medios con nuevo medio completo que contenía 5-azacitidina 30 µM y queleritrina 5 µM y las células se cultivaron durante aproximadamente 3 días seguido de un cambio de medio completo y se cultivaron 7 días adicionales. Las células determinadas miocíticas tempranas tuvieron un tiempo de duplicación aproximadamente dos veces el de células no modificadas. Las células determinadas miocíticas tempranas pueden secretar factores tróficos tales como IL-6, VEGF, MCP1 y BDNF.

#### Células no modificadas para inyecciones intra-cardiacas

Las hABM-SC derivadas del donante 059, que no se cultivaron en presencia de un inhibidor de la metilación del ADN (por ejemplo, 5-azacitidina) y un inhibidor de proteína quinasa C (por ejemplo, cloruro queleritrina) se mencionan en este documento en este ejemplo como "hABM-SC no modificadas" o "células no modificadas". Las hABM-SC no modificadas eran una población celular sustancialmente homogénea que co-expresaba CD49c, CD90 y telomerasa; y se prepararon como se describe en los Ejemplos 1-8.

#### Inducción experimental de infarto de miocardio

Se indujo de forma experimental infarto de miocardio en ratas Sprague-Dawley macho y hembra (edad de aproximadamente 3 meses) mediante la colocación de una ligadura permanente de seda alrededor de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) a través de una esternotomía en la línea media de acuerdo con métodos establecidos (Müller-Ehmsen, J. et al., Circulation 105:1720-1726 (2002)). Cinco días después del procedimiento, las ratas se trataron con un régimen convencional de 10 mg/kg de tratamiento con ciclosporina A que duró durante todo el estudio de 4 semanas.

Aproximadamente siete a ocho días después de la inducción del infarto, las ratas se anestesiaron, se intubaron y se hizo una incisión intercostal para exponer el vértice del corazón. Se insertó un catéter ultrasónico Millar a través de la pared ventricular, y se obtuvieron mediciones de presión en el tiempo, dp/dt, durante aproximadamente 30-60 segundos. Este modelo de producción de infarto y las mediciones de presión/tiempo de la función cardiaca es un modelo convencional bien caracterizado por el cual se evalúan los efectos de terapias celulares sobre la función cardiaca (Müller-Ehmsen, J. et al., Circulation 105:1720-1726 (2002)). Después de las mediciones iniciales, las ratas se colocaron en uno de tres grupos de tratamiento resumidos en la Tabla 1.

**TABLA 1**

Grupo	Tratamiento	Nº Animales	Duración de tratamiento
Vehículo	100 µl	7 Machos 7 Hembras	4 semanas
Células no modificadas	5 X 10 <sup>6</sup> hABM-SC/100 ml	7 Machos 7 Hembras	4 semanas
Células determinadas miocíticas tempranas	5 X 10 <sup>6</sup> hABM-SC/100 ml	7 Machos 7 Hembras	4 semanas

Las células determinadas miocíticas tempranas, células no modificadas o vehículo (4,5 % de glucosa en PBS) se suministraron al corazón usando una jeringa Hamilton de 100 µl con una aguja de calibre 30, de bajo espacio muerto. La dosis de células determinadas miocíticas tempranas o células no modificadas fue cinco (5) inyecciones

de 20  $\mu$ l de PBS/glucosa al 4,5 % que contenía  $1 \times 10^6$  células (total  $5 \times 10^6$  células en 100 ml de PBS/glucosa al 4,5 %). Se realizaron cinco inyecciones diferentes de 20  $\mu$ l durante el curso de 2-3 minutos. Se realizaron cuatro inyecciones a distancias iguales alrededor del infarto visualizado, mientras que la quinta se puso directamente en el centro de la región con el infarto determinado por el área de decoloración indicativa del infarto. Después de la inyección, la incisión se suturó cerrada, se redujo el neumotórax, y los animales se desconectaron del respirador y se extubaron. Las ratas se devolvieron a sus jaulas tras recuperar la conciencia. Se anotaron observaciones clínicas diarias durante el periodo restante del estudio.

Cuatro semanas después de la inyección (5 semanas post-infarto), los animales se re-anestesiaron, se expuso el corazón a través de una esternotomía de línea media, y se insertó un catéter Millar. Las mediciones de dp/dt se tomaron como se ha descrito anteriormente, después de lo cual se sacrificó a las ratas mediante exanguinación. Los corazones se recogieron, se fijaron por inmersión, se incrustaron en parafina, se seccionaron, se tiñeron con hematoxilina/eosina (H y E) y tricromo y se analizaron histológicamente con la ayuda de un microscopio óptico.

Los datos se analizaron de forma ciega por una tercera parte.

Los datos se expresan como una media  $\pm$  error típico de la media (ETM). Las diferencias estadísticamente significativas en los valores medios se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA).

## Resultados

El tratamiento con células modificadas o células no modificadas provocó mejoras significativas en varios indicadores de función cardíaca 4 semanas después del tratamiento en comparación con ratas infartadas de control tratadas con vehículo. El análisis histológico del tejido cardíaco apoya los datos funcionales.

### Mediciones funcionales de tejido cardíaco:

Los análisis estadísticos se realizaron sobre datos funcionales. Debido a las muertes de algunas ratas en el momento del tratamiento, así como la pérdida de dos archivos de datos post-tratamiento, se generaron datos funcionales para 6 animales/sexo/grupo de tratamiento. Los datos funcionales se analizaron como los siguientes indicadores: +dp/dt (Figuras 6A y 6B), delta +dp/dt (Figuras 6C y 6D), delta -dp/dt (Figuras 7A y 7B) y como tau (Figuras 8A y 8B).

Como se muestra en la Figura 6A, el tratamiento con células no modificadas y células modificadas produjo un aumento significativo en la tasa máxima de desarrollo de presión (+dp/dt) 4 semanas después de la inyección. Los valores pretratamiento no fueron significativamente diferentes entre grupos.

Como se muestra en la Figura 6B, los machos tratados con vehículo tuvieron un valor +dp/dt significativamente inferior en comparación con las hembras. Sin embargo, el grado de aumento respecto al vehículo fue aproximadamente igual en machos y hembras y menor en ratas tratadas con células modificadas.

Como confirmación final de que las mejoras en las mediciones de +dp/dt no eran significativas, se obtuvo un indicador mencionado como "delta +dp/dt". Delta +dp/dt es el cambio absoluto entre los valores +dp/dt pretratamiento y post-tratamiento tomados sobre cada animal individual y promediado por el valor del grupo de tratamiento (Figura 6C). Las mediciones de delta +dp/dt muestran que aunque los animales con vehículo mostraban una disminución en este indicador (delta negativo que indica función cardíaca disminuida) durante el curso del estudio, los animales que recibieron células modificadas o células no modificadas mostraron un aumento significativo en la función cardíaca (delta positivo que indica función cardíaca aumentada) como se define por el indicador de generación de presión.

Como se muestra en la Figura 6D, los machos tratados con vehículo tuvieron una mayor disminución en la función cardíaca (delta negativo) en comparación con hembras tratadas con vehículo. Sin embargo, los machos y las hembras mostraron aumentos equivalentes (delta positivo) después del tratamiento con células modificadas o células no modificadas.

También se determinó la tasa mínima de desarrollo de presión ("-dp/dt"). Se realizaron análisis similares a los descritos para +dp/dt (Figuras 7A y 7B). Los resultados se expresan como "delta -dp/dt", aunque se observó un patrón similar para mediciones pre- y post-tratamiento. Cuatro semanas después del tratamiento, las ratas que recibieron células no modificadas o células modificadas mostraron valores -dp/dt significativamente mayores (no mostrados). A diferencia de los valores +dp/dt, no se observaron diferencias en -dp/dt entre ratas macho y hembra.

Como se muestra en la Figura 7A, el delta -dp/dt disminuyó en animales tratados con vehículo. Sin embargo, los animales que recibieron células modificadas o células no modificadas mostraron aumentos significativos y robustos en la función cardíaca como se define por delta -dp/dt. La Figura 7A muestra que expresar los cambios en la función cardíaca sobre el curso del estudio sustrayendo los valores +dp/dt de semana 0 de los valores +dp/dt de semana 4 ("delta -dp/dt") demostró que aunque las ratas tratadas con vehículo tuvieran disminuciones en la función cardíaca

sobre el curso del estudio (delta negativo), los animales tratados con células modificadas o células no modificadas mostraron mejoras significativas en la función cardiaca. A diferencia de +dp/dt, no hubo diferencias significativas en la respuesta entre machos y hembras (Figura 7B).

5 Un tercer indicador obtenido en este estudio fue la constante de tiempo de la caída de la presión ventricular izquierda isovolumétrica, llamada tau (t) (Figuras 8A y 8B). Se han presentado valores elevados de tau en varias patologías cardiacas en el hombre, incluyendo arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, y fallo cardiaco diastólico y, por tanto, son un índice de función cardiaca (Bolognesi, R., et al., J. Am. Soc. Echocardiogr. 14(8):764-72 (2001); Dawson, J.R., et al., Br. Heart J. 61(3):248-257 (1989)). Coherente con la medición de +dp/dt y -dp/dt, las ratas que  
10 recibieron células modificadas o células no modificadas mostraron un valor disminuido de tau 4 semanas después del tratamiento (Figura 8A), lo que sugiere una distensibilidad ventricular izquierda aumentada. Como se observa con +dp/dt, los machos tratados con vehículo tendieron a mayores disminuciones en tau sobre el curso del estudio, pero ambos sexos mostraron grados iguales de recuperación en tau en respuesta a ambos artículos de ensayos cuando se normalizaron al respectivo control de vehículo (Figura 8B).

15

**Análisis histológico de tejido cardiaco:**

Se tiñeron secciones de corazones con H y E y Tricromo. La tinción con Tricromo permite la visualización de colágeno frente a tejido muscular. Como el colágeno puede indicar la presencia de tejido cicatrizal y, por tanto, la ausencia de regeneración, la tinción con H y E y Tricromo puede ser útil para cuantificar las cantidades relativas de colágeno en tejido cardiaco obtenido de animales en los grupos de tratamiento experimental (vehículo, células no modificadas, células determinadas miocíticas tempranas) en comparación con músculo cardiaco normal. La escala representada en la Tabla 2 se empleó para correlacionar los datos funcionales cuantitativos con el análisis histológico.

20

25

**TABLA 2**

Escala	Área de tejido fibrótico/viable (AF:AV)
0	Muy poca
1	Poca
2	Leve
3	Moderada
4	Grande
5	Muy grande

Las Figuras 10A y 10B ilustran las diferencias relativas entre una rata tratada con vehículo (Figura 10A, Valor 4) y una rata tratada con células no modificadas (Figura 10B, Valor 1). Los valores se obtuvieron tras inspección visual de tres portaobjetos de tejido cardiaco, partiendo del vértice cardiaco, con cada sección separada aproximadamente 4 mm. El valor se interpretó basándose en un promedio a través de las tres regiones del corazón.

30

Un valor de 0 se caracterizó por poca a ninguna fibrosis desde el vértice del corazón hasta la aurícula en el tejido cardiaco. Un valor de 1 se caracterizó por poca fibrosis en el vértice del corazón y pequeñas cantidades de fibras hacia la aurícula. Un valor de 2 se caracterizó por fibrosis leve en el vértice del corazón y rápidas disminuciones en la proporción de tejido fibrótico:viable hacia la aurícula en el tejido cardiaco. Un valor de 3 se caracterizó por fibrosis moderada en el vértice del corazón y rápidas disminuciones en la proporción de tejido fibrótico:viable hacia la aurícula en el tejido cardiaco. Un valor de 4 se caracterizó por fibrosis grande en el vértice del corazón y disminuciones menos rápidas en la proporción de tejido suave a fibrótico:viable hacia la aurícula en el tejido cardiaco. Un valor de 5 se caracterizó por fibrosis muy grande en el vértice del corazón y disminuciones lineales en la proporción de tejido fibrótico:viable hacia la aurícula en el tejido cardiaco.

35

40

El valor medio obtenido de ratas tratadas con vehículo solamente fue (4,4 ± 0,68). El valor medio obtenido de ratas tratadas con células modificadas (1,33 ± 0,68) o no modificadas (1,00 ± 0,45). Para la representación visual de un valor de 4 y 1, remítase a la Figura 10A y 10B, respectivamente.

45

Estos datos muestran que se observó una reducción significativa en el tamaño del infarto en ratas tratadas con células determinadas miocíticas tempranas y células no modificadas. Generalmente, el tamaño del infarto en hembras fue más pequeño que en machos. Las ratas tratadas con células determinadas miocíticas tempranas o células no modificadas tuvieron valores histológicos aproximadamente dos puntos inferiores que los controles de vehículo de género coincidente (Figuras 9, 10A y 10B).

50

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Neuronyx, Inc.  
Ho, Tony W.  
Kopen, Gene C.  
Righter, William F.  
Rutkowski, J. Lynn

55

Wagner, Joseph  
 Herring, W. Joseph  
 Ragalia, Vanessa

- 5 <120> Poblaciones celulares que co-expresan CD49c y CD90  
 <130> 2831.2003003  
 <150> 09/960.244  
 <151> 21-09-2001
- 10 <160> 16  
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 15 <210> 1  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
 <223> Cebadores oligonucleotídicos
- 25 <400> 1  
 atggggatcg gggattgca 19  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
 <223> Cebadores oligonucleotídicos
- 35 <400> 2  
 ccgatccgag ggcctcacta 20  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
 <223> Cebadores oligonucleotídicos
- 45 <400> 3  
 cactccagtt gtccccacag tagaca 26  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
 <223> Cebadores oligonucleotídicos
- 55 <400> 4  
 tcgctttcca tgtgtgaggt ga 22  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 60 <220>  
 <223> Cebadores oligonucleotídicos
- 65 <220>  
 <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 5  
 ggccggagtg gacgaggcaa 20

5        <210> 6  
          <211> 26  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

10       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 6  
 catcaagctt ctgtctgtgc cttctg 26

15       <210> 7  
          <211> 21  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

20       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 7  
 accgaggcac tcagaggagg c 21

25       <210> 8  
          <211> 21  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

30       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 8  
 gccattagcg catcacagtc g 21

35       <210> 9  
          <211> 25  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

40       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 9  
 gatgttttgc caactggcca agacc 25

45       <210> 10  
          <211> 25  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

50       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 10  
 aggaggggcc agaccatcgc tatct 25

55       <210> 11  
          <211> 26  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

60       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 10  
 aggaggggcc agaccatcgc tatct 25

65       <210> 11  
          <211> 26  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

70       <220>  
          <223> Cebadores oligonucleotídicos

<400> 11  
 acaacgaacg ccgcttctc aggaac 26  
 5      <210> 12  
       <211> 23  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 10     <220>  
       <223> Cebadores oligonucleotídicos  
  
       <400> 12  
       gccggaacac agccaacccc tgg 23  
 15     <210> 13  
       <211> 25  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 20     <220>  
       <223> Cebadores oligonucleotídicos  
  
       <400> 13  
       ggcagctaca gcatgatgca ggacc 25  
 25     <210> 14  
       <211> 24  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 30     <220>  
       <223> Cebadores oligonucleotídicos  
  
       <400> 14  
       ctggtcatgg agttgtactg cagg      24  
 35     <210> 15  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
       <220>  
       <223> Cebadores oligonucleotídicos  
 45     <400> 15  
       caagatggtg actcgaacga 20  
  
       <210> 16  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 50     <220>  
       <223> Cebadores oligonucleotídicos  
  
       <400> 16  
       ggttttgtca aacatcagca 20  
 55     <220>  
       <223> Cebadores oligonucleotídicos

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una población celular aislada derivada de médula ósea humana, en el que entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y en el que la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que comprende las etapas de:
- 5 a) cultivar una fuente de la población celular en condiciones de bajo contenido de oxígeno de menos del 15 % de oxígeno para producir una población celular adherente; y,  
b) cultivar la población celular adherente a una densidad de siembra de menos de 2500 células/cm<sup>2</sup>.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la fuente de la población celular en la reivindicación 1, parte a) se cultiva a una densidad de siembra de menos de 75000 células/cm<sup>2</sup> y la población celular adherente en la reivindicación 1, parte b) se cultiva a una densidad de siembra de menos de 100 células/cm<sup>2</sup>.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la población celular adherente en la reivindicación 1, parte b) se cultiva en una concentración de oxígeno disuelto de menos del 20 % a una densidad de siembra seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 20 a) menos de 1000 células/cm<sup>2</sup>;  
b) menos de 100 células/cm<sup>2</sup>;  
c) menos de 50 células/cm<sup>2</sup>; y,  
d) menos de 30 células/cm<sup>2</sup>.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las condiciones de bajo contenido de oxígeno se seleccionan entre el grupo que consiste en:
- 30 a) entre el 1 y el 10 % de oxígeno;  
b) entre el 2 y el 7 % de oxígeno;  
c) menos del 10 % de oxígeno;  
d) menos del 5 % de oxígeno; y,  
e) el 5 % de oxígeno.
- 35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, y 2 a 4, que incluye adicionalmente lisar la fuente de la población celular antes de cultivar la fuente de la población celular.
- 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye adicionalmente seleccionar una fuente fraccionada de la población celular por paso a través de un gradiente de densidad antes de cultivar la fuente de la población celular.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de la población celular que co-expresa CD49c y CD90, no expresa CD34 y/o CD45.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células de la población celular que co-expresa CD49c y CD90 expresan adicionalmente al menos un factor de transcripción relacionado con el corazón seleccionado entre el grupo que consiste en GATA-4, Irx4, y Nkx2.5.
- 50 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células de la población celular que co-expresa CD49c y CD90 expresan adicionalmente al menos un factor trófico seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 55 a) Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF);  
b) Cistatina-C;  
c) Interleuquina-6 (IL-6);  
d) Interleuquina-7 (IL-7);  
e) Interleuquina-11 (IL-11);  
f) Factor de crecimiento nervioso (NGF);  
g) Neurotrofina-3 (NT-3);  
h) Proteína-1 quimioatrayente de macrófagos (MCP-1);  
i) Metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9);  
60 j) Factor de células madre (SCF); y,  
k) Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
- 65 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células de la población celular que co-expresa CD49c y CD90 expresan adicionalmente p21 o p53, y en el que la expresión de p53 es una expresión relativa de hasta 3000 transcritos de p53 por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s y la expresión de p21 es una expresión relativa de hasta 20.000 transcritos de p21 por 10<sup>6</sup> transcritos de un ARNr 18s.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la población celular aislada se ha cultivado *in vitro* a través de varias duplicaciones de población seleccionadas entre el grupo que consiste en:

- 5
- a) al menos 20 duplicaciones de población;
  - b) al menos 30 duplicaciones de población;
  - c) al menos 40 duplicaciones de población; y
  - d) al menos 50 duplicaciones de población,

10 en el que la población celular aislada no expresa sustancialmente un marcador de senescencia seleccionado entre el grupo que consiste en P21 o P53, o en el que la población celular aislada expresa P53 a una expresión relativa de hasta 3000 transcritos de P53 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s, o en el que la población celular aislada expresa P21 a una expresión relativa de hasta 20.000 transcritos de p21 por  $10^6$  transcritos de un ARNr 18s.

15 12. Una población celular aislada derivada de médula ósea humana, en la que entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y en la que la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que puede obtenerse por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

20 13. El método de la reivindicación 1, en el que antes de las etapas a) y b) en la reivindicación 1, el método comprende adicionalmente las etapas de:

- 25
- a) lisar el componente de glóbulos rojos de un aspirado de médula ósea humana;
  - b) sembrar las células de médula ósea no lisadas en un dispositivo de cultivo tisular;
  - c) permitir que las células de médula ósea no lisadas se adhieran a una superficie del dispositivo de cultivo tisular;

y en el que las etapas a) y b) de la reivindicación 1 corresponden a las etapas d) y e) que comprenden:

- 30
- d) cultivar las células adherentes en condiciones del 5 % de oxígeno; y
  - e) pasar las células adherentes a una densidad de siembra de 30 células/cm<sup>2</sup>.

35 14. Una población celular aislada derivada de médula ósea humana, en la que entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y en la que la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que puede obtenerse por el método de la reivindicación 13.

40 15. El método de la reivindicación 1, en el que antes de las etapas a) y b) en la reivindicación 1, el método comprende adicionalmente las etapas de:

- 45
- a) seleccionar una fuente fraccionada de la población celular de un aspirado de médula ósea humana por paso a través de un gradiente de densidad;
  - b) sembrar las células fraccionadas en un dispositivo de cultivo tisular;
  - c) permitir que las células fraccionadas se adhieran a una superficie del dispositivo de cultivo tisular;

y en el que las etapas a) y b) de la reivindicación 1 corresponden a las etapas d) y e) que comprenden:

- 50
- d) cultivar las células adherentes en condiciones del 5 % de oxígeno; y
  - e) pasar las células adherentes a una densidad de siembra de 30 células/cm<sup>2</sup>.

16. Una población celular aislada derivada de médula ósea humana, en la que entre el 100 % y el 90 % de las células de la población celular co-expresan CD49c y CD90, y en el que la población celular tiene un tiempo de duplicación de menos de 30 horas, que puede obtenerse por el método de la reivindicación 15.

Figura 1A

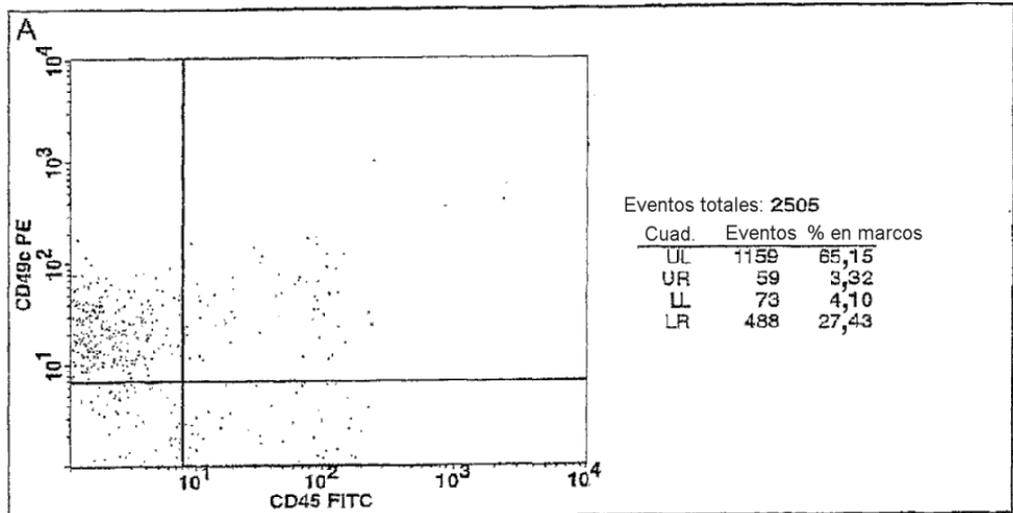


Figura 1B

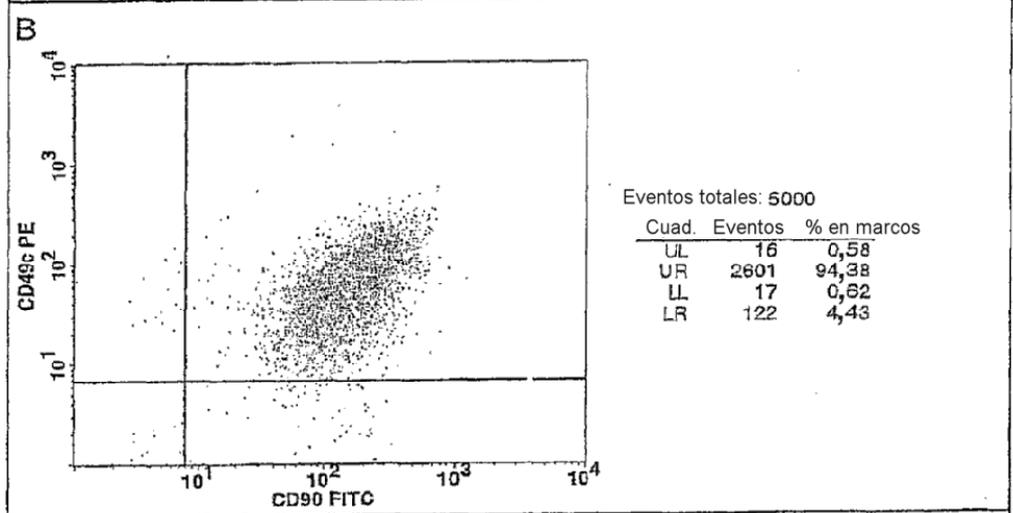


Figura 1C

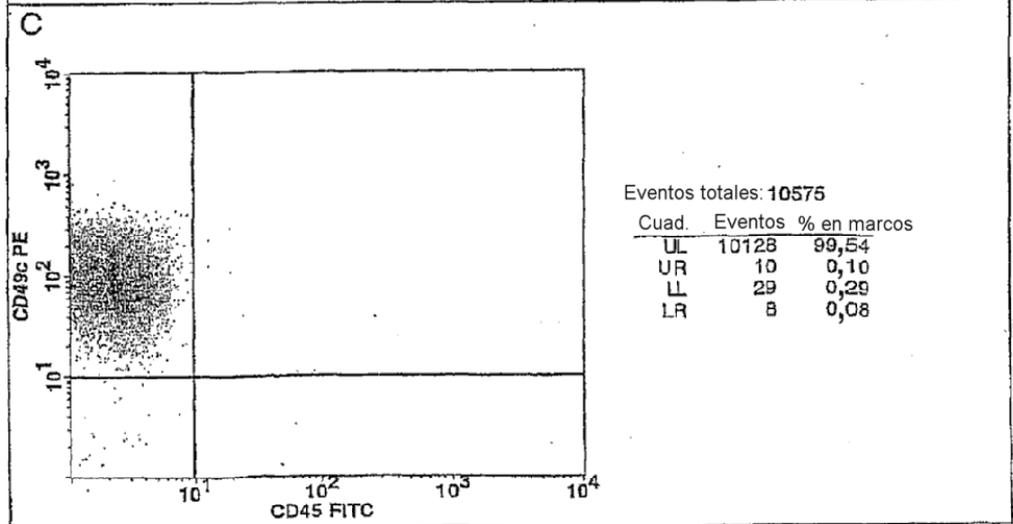


Figura 2A

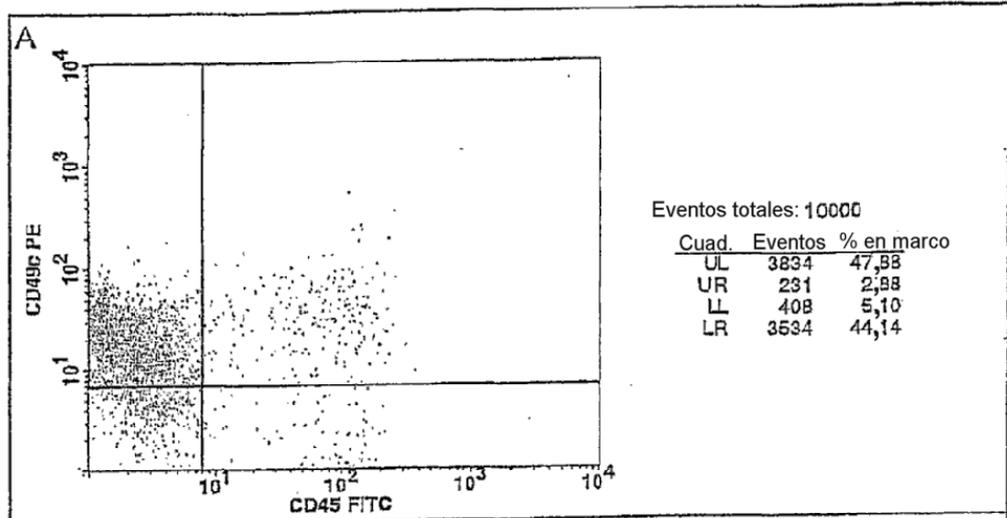


Figura 2B

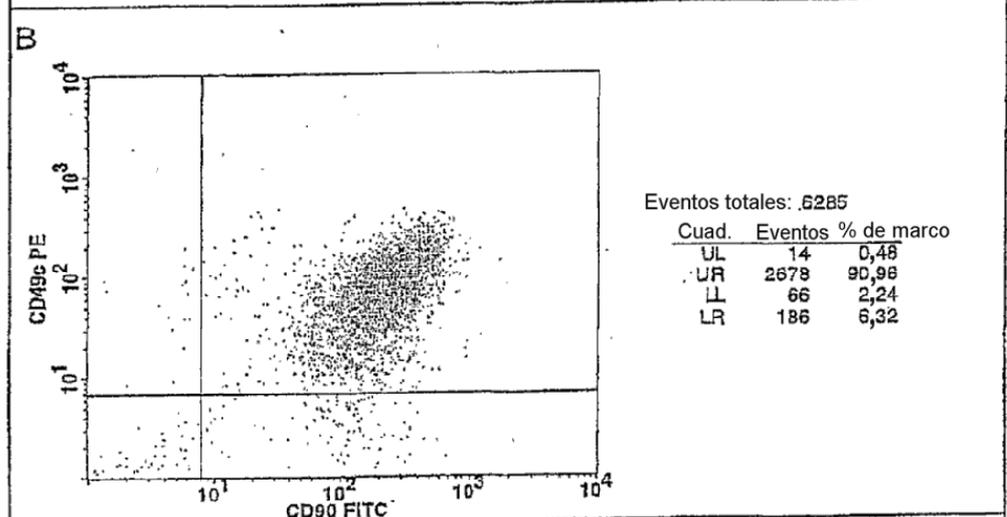
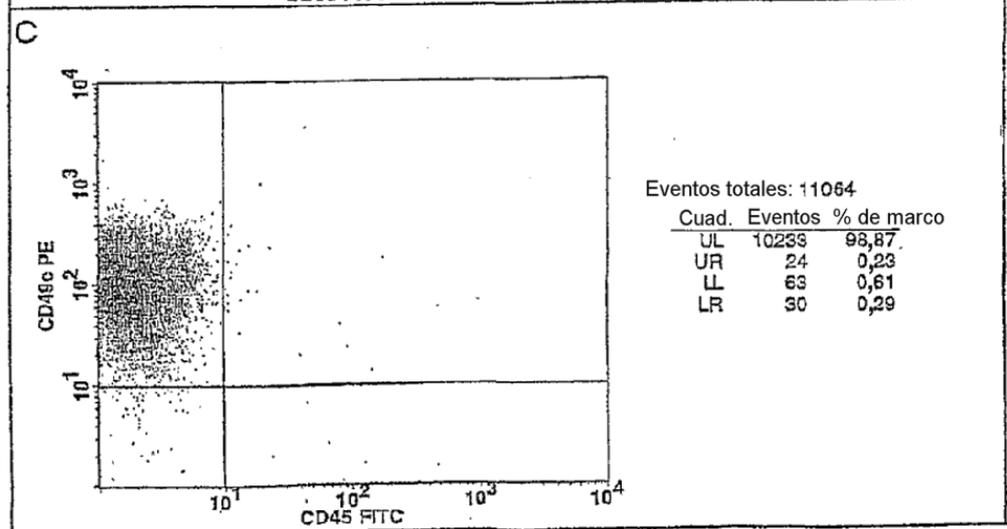


Figura 2C



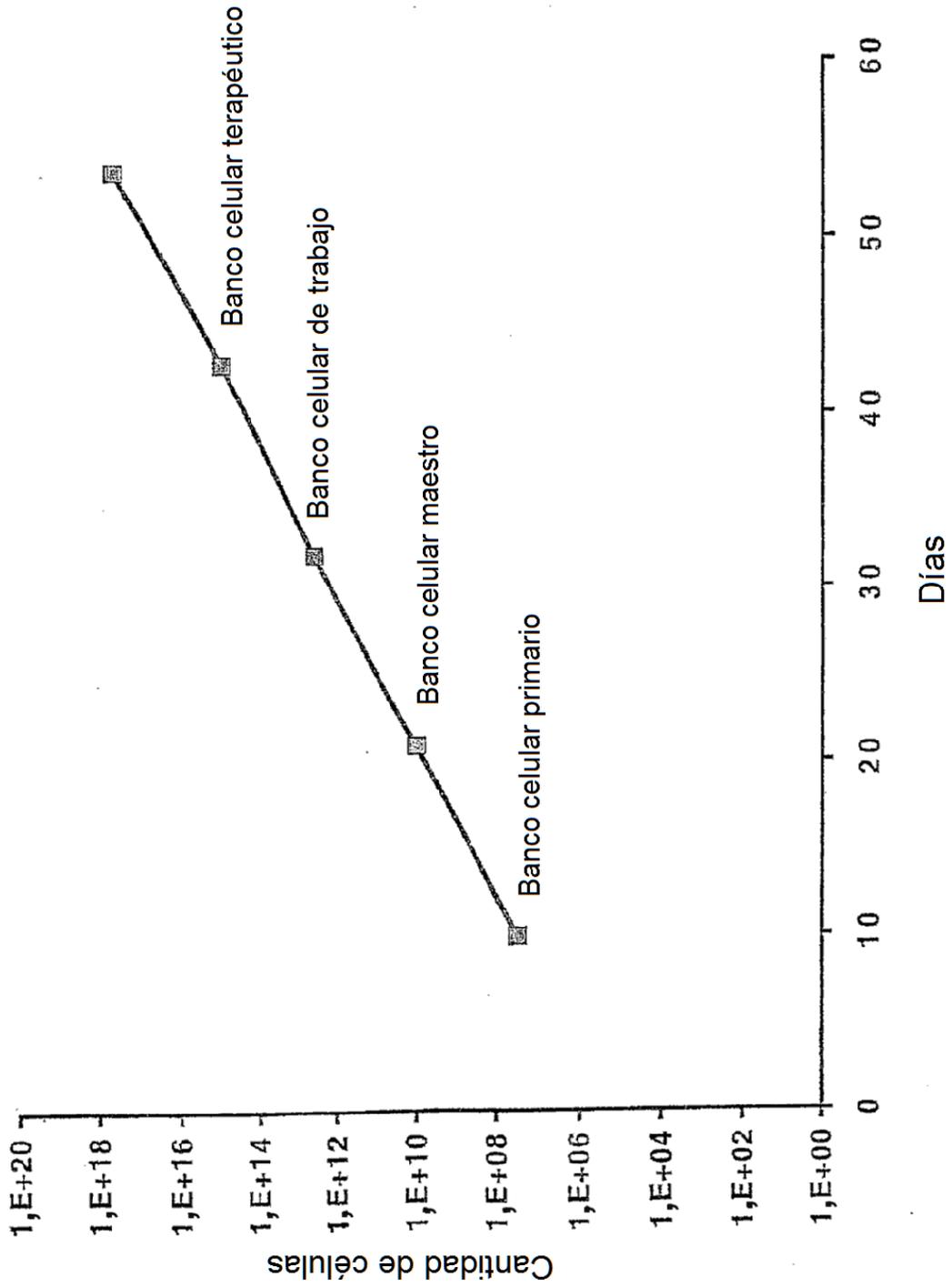


Figura 3

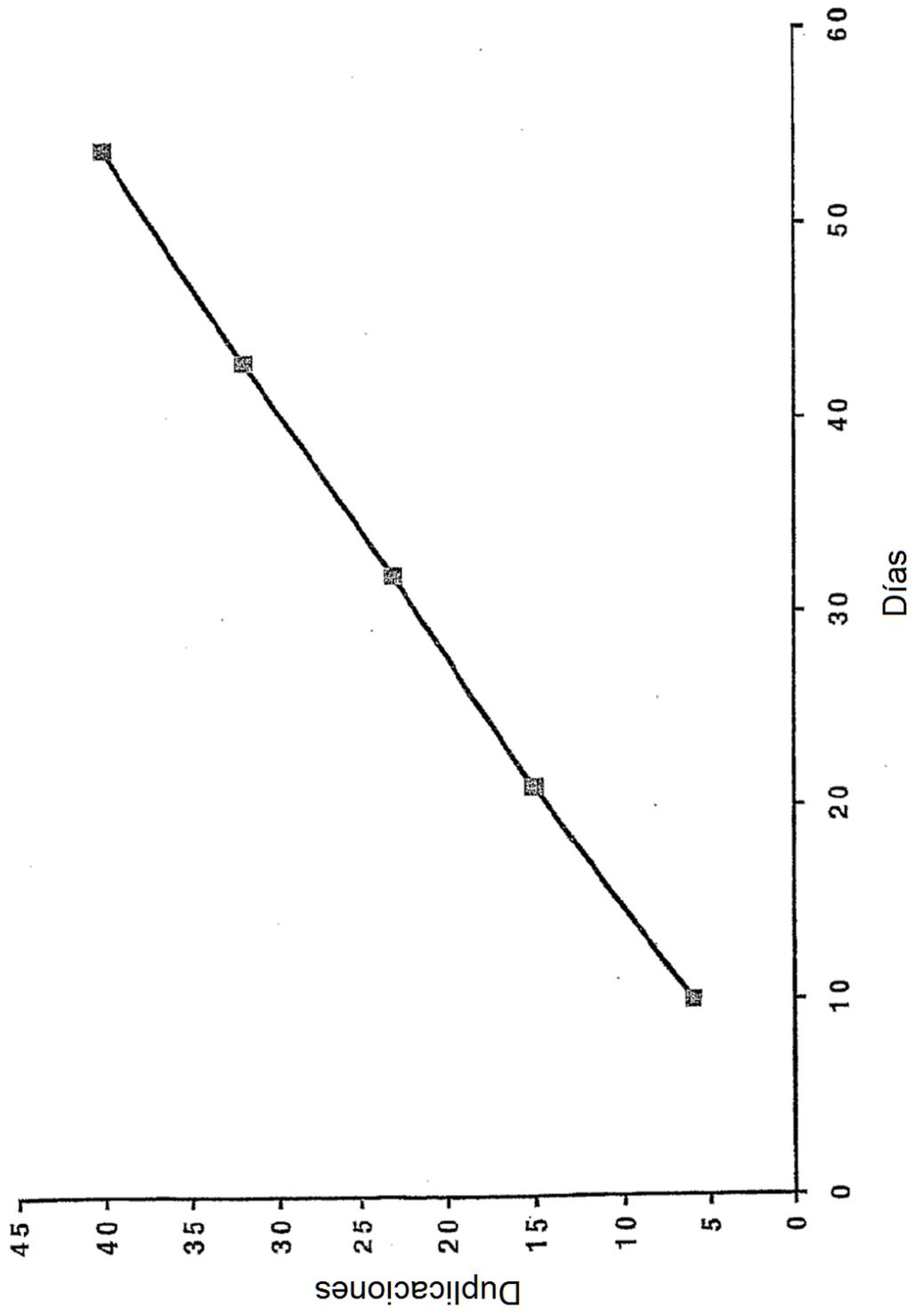


Figura 4

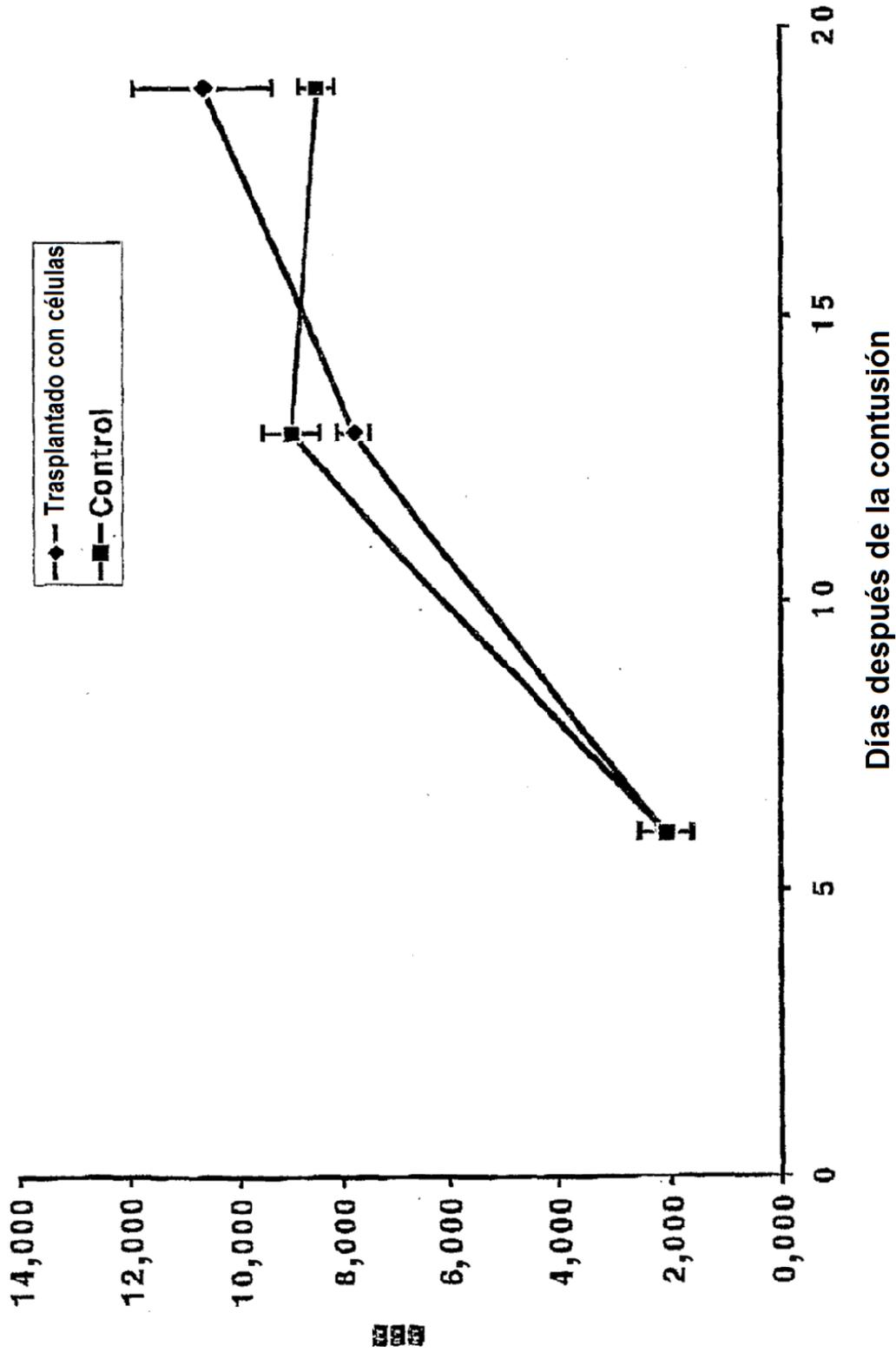


Figura 5

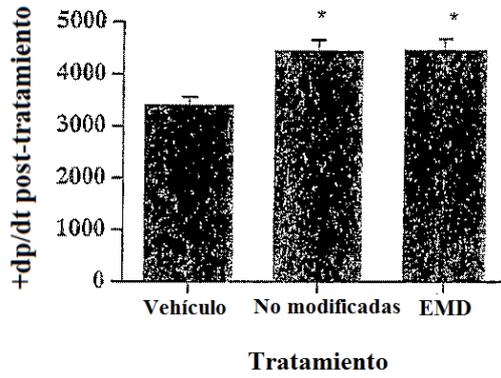


Figura 6A

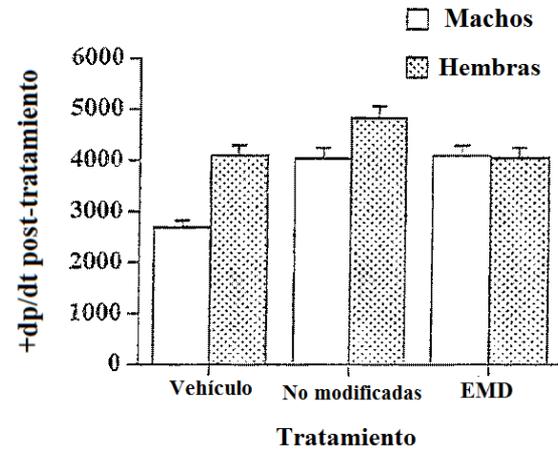


Figura 6B

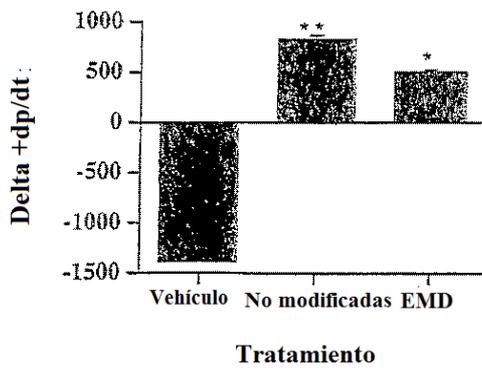


Figura 6C

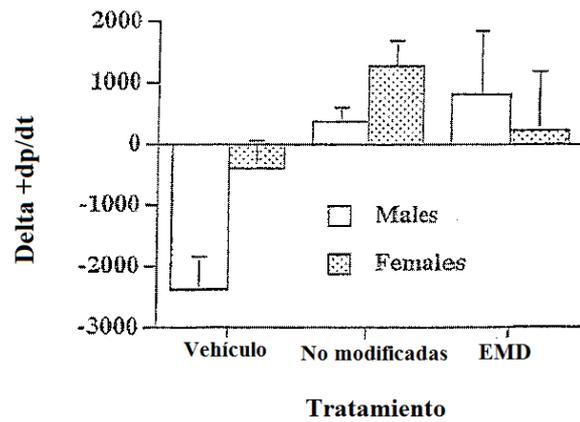


Figura 6D

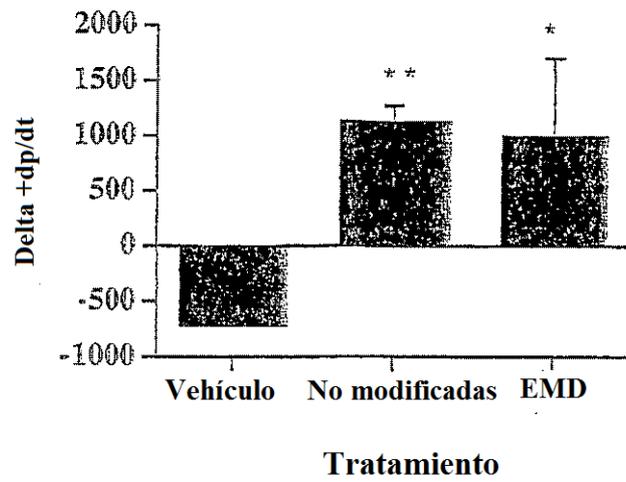


Figura 7A

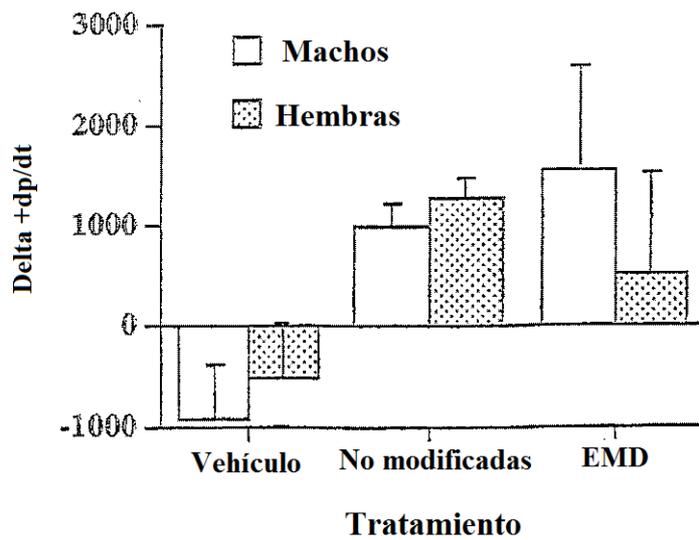


Figura 7B

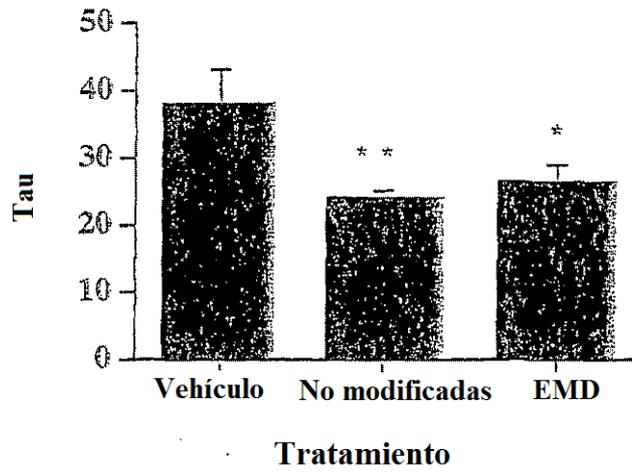


Figura 8A

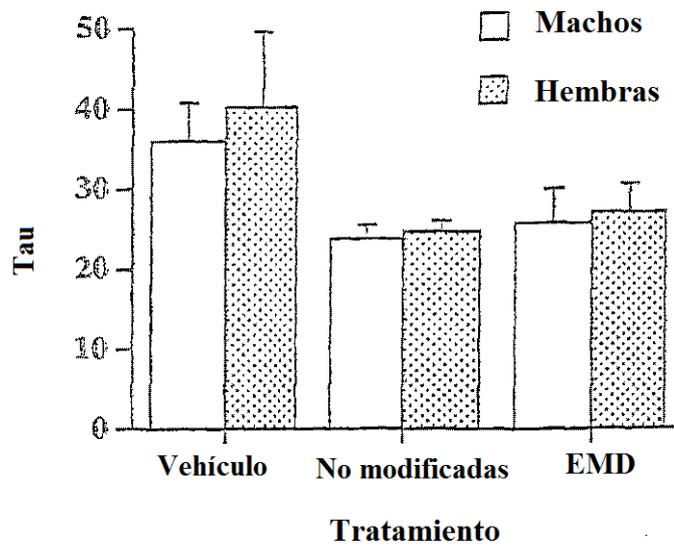
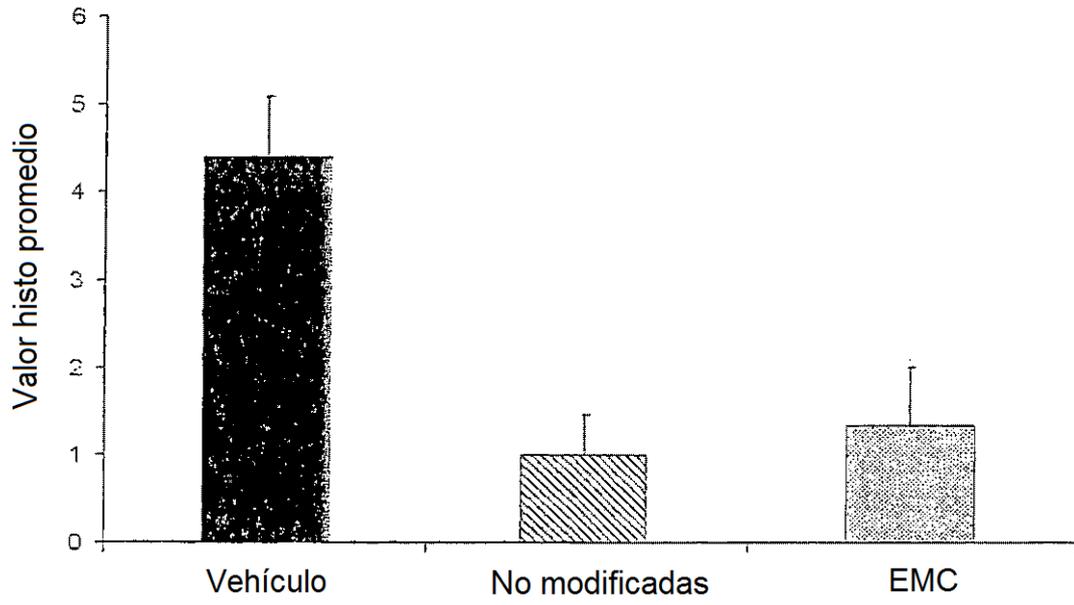


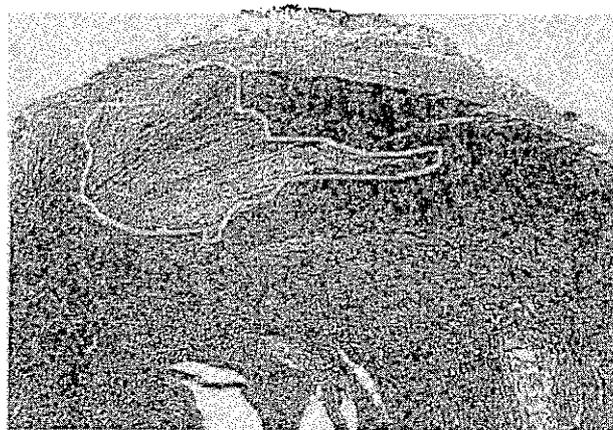
Figura 8B



**Figura 9**



**Figura 10A**



**Figura 10B**