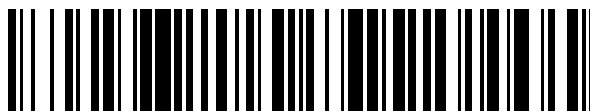


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 360**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/JP2010/062480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11007900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10799956 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2455452**

54 Título: **Célula madre pluripotente que puede aislarse de tejido corporal**

30 Prioridad:

15.07.2009 US 213788 P
24.12.2009 US 290159 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

DEZAWA, MARI (20.0%)
1-9-2-1507, Ichibancho, Aoba-ku
Sendai-shi, Miyagi 980-0811, JP;
FUJIYOSHI, YOSHINORI (20.0%);
NABESHIMA, YOUICHI (20.0%);
WAKAO, SHOHEI (20.0%) y
KITADA, MASAACKI (20.0%)

72 Inventor/es:

DEZAWA, MARI;
FUJIYOSHI, YOSHINORI;
NABESHIMA, YOUICHI y
WAKAO, SHOHEI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 647 360 T3

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

DESCRIPCIÓN

Célula madre pluripotente que puede aislarse de tejido corporal

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a células madre pluripotentes derivadas de tejido corporal.

10 Técnica anterior

Las planarias y los tritones pueden regenerar sus organismos completos incluso después de haber cortado sus organismos. Dicha alta capacidad regenerativa depende de la presencia de células madre pluripotentes que existen en los tejidos mesenquimáticos. Sin embargo, en el caso de organismos superiores, tales como seres humanos, la capacidad regenerativa del tejido es muy inferior a la de esos animales. Un grupo de células internas (o ICM: *inner cell mass*, masa celular interna) en un blastocisto de mamífero se reconoce como un conjunto de células madre pluripotentes que es capaz de diferenciarse en células de linaje de células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas. Sin embargo, dicha pluripotencia queda limitada según avanza el desarrollo, seguido por diferenciación celular para la especialización que da como resultado cada tipo de tejido.

En los últimos años, las células madre adultas o las células madre tisulares que contribuyen a la regeneración de los tejidos han estado obteniendo atención. Sin embargo, sigue sin saberse si las células madre pluripotentes están presentes o no en organismos maduros de mamífero, como en el caso de las planarias o los tritones.

Las fracciones de células estromáticas de médula ósea (MSC, *bone marrow stromal cell*) que tienen la capacidad de diferenciarse en hueso, cartílago, adipocitos, células neuronales, músculos esqueléticos y similares se han presentado como células obtenidas de un adulto que tiene potencia de diferenciación (véanse los documentos que no son patente 1 y 2). Sin embargo, las células estromáticas de médula ósea (MSC) están comprendidas de diversos tipos de poblaciones celulares. La fuerza de la diferenciación de la población de MSC varía, pero la parte principal de la misma no está claramente comprendida. Además, requiere estimulación con un compuesto específico, transferencia génica o similar para la diferenciación en células específicas. Específicamente, existe la necesidad de construir un sistema para inducir diferenciación.

Además, las células iPS (células madre pluripotentes inducidas) (véase el documento de patente 1, el documento de patente 2, el documento que no es patente 3 y similares) se han presentado como células madre pluripotentes derivadas de adulto. Sin embargo, el establecimiento de células iPS requiere una operación de inducción usando una sustancia específica, tal como introducción de un gen específico en una fracción de fibroblastos dérmicos (fibroblastos dérmicos) que es una población de células mesenquimáticas o la introducción de un compuesto específico en células somáticas.

Documento de patente 1 patente JP n.º 4183742

Documento de patente 2 publicación de patente JP (Kokai) n.º 2008-307007 A

Documento que no es patente 1 M. DEZAWA y col., The Journal of Clinical Investigation, 113, 12, pág. 1701-1710, (2004)

Documento que no es patente 2 M. DEZAWA y col., SCIENCE, 8 de julio de 2005, 309, pág. 314-317, (2005)

Documento que no es patente 3 Okita K. y col. SCIENCE, 7 de noviembre de 2008, 322 (5903), pág. 949-953

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para obtener directamente células madre pluripotentes de tejido corporal y células madre pluripotentes obtenidas por el procedimiento.

Los presentes inventores han descubierto que, en el procedimiento de investigación respecto a fracciones de células estromáticas de médula ósea (MSC: células estromáticas de médula ósea), se forman grupos de células característicos a una frecuencia extremadamente baja a partir de células MSC humanas no tratadas (vírgenes). La aparición de grupos de células iniciales se parece mucho al de células ES. Sin embargo, los grupos de células no experimentan crecimiento infinito, a diferencia de las células ES. Detienen el crecimiento cuando alcanzan un tamaño dentro de un cierto período y después forman poblaciones heterogéneas que contienen diversas células tales como células capilares y células pigmentosas. Además, se realizó inmunocitoquímica para dichos grupos de células, de modo que se detectaron diferentes células positivas para marcadores ectodérmicos, endodérmicos y mesodérmicos, respectivamente, en un grupo de células. Los presentes inventores consideraron a partir de los resultados la posible presencia de células equivalentes a células pluripotentes/multipotentes en fracciones de células MSC humanas no tratadas (vírgenes) que en general están mantenidas y cultivadas. Los presentes inventores entonces estudiaron además intensivamente la materia.

Se sabe que, cuando un organismo se expone a sobrecarga o se lesiona, las células madre tisulares en un estado latente se activan, lo que contribuye a la regeneración tisular. Los presentes inventores han proporcionado sobrecarga de estimulación a células mesenquimáticas tales como fracciones de células estromáticas de médula ósea (MSC) y fracciones de fibroblastos dérmicos mientras se cultivan de acuerdo con diversos procedimientos (por ejemplo, cultivos sin suero, cultivo usando solución salina equilibrada de Hank (HBSS), cultivo de baja concentración de oxígeno, un total de 3 horas de cultivo con tripsina un corto tiempo intermitente y 8 o 16 horas de incubación en tripsina un largo tiempo), recogieron las células supervivientes y después realizaron cultivo en suspensión en medio que contenía metilcelulosa (MC) (llamado "cultivo MC"). Como resultado, se confirmó la formación de diversos tamaños de grupos de células de tipo cuerpo embrioide (hasta un diámetro máximo de 150 μ M).

En particular, la formación de grupos celulares de tipo cuerpo embrioide se confirmó a la máxima frecuencia en fracciones de fibroblastos dérmicos humanos y fracciones de MSC humanas sometidas a incubación prolongada con tripsina.

Los presentes inventores han examinado las propiedades de células en los grupos de células de tipo cuerpo embrioide así obtenidos, y por tanto han descubierto que dichas células tienen las propiedades de las células madre pluripotentes. Los presentes inventores han descubierto además que las células en los grupos de células de tipo cuerpo embrioide obtenidos tenían propiedades de las células madre pluripotentes/multipotentes que convencionalmente no se ha informado que tengan. Los presentes inventores han examinado además proteínas expresadas por células en los grupos de células obtenidos, y por tanto han descubierto que las células ejercen patrones de expresión que difieren de los ejercidos por células madre pluripotentes convencionalmente presentados tales como células ES y células iPS.

Los presentes inventores han descubierto además que SSEA-3 se expresa como un antígeno de superficie de las células madre pluripotentes anteriores y que las células madre pluripotentes anteriores también pueden aislarse de tejido corporal usando expresión de SSEA-3 como marcador.

Los presentes inventores también han descubierto que las células madre pluripotentes anteriores son un tipo novedoso de células madre pluripotentes que difieren de las células madre pluripotentes presentadas convencionalmente tales como células ES y células iPS. Específicamente, los presentes inventores han descubierto que las células madre pluripotentes pueden obtenerse directamente de tejido corporal sin ninguna operación de inducción. Por tanto, los presentes inventores han completado la presente invención. Los presentes inventores han denominado a las células madre pluripotentes células Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring cells - células resistentes a sobrecarga que se diferencian en múltiples linajes).

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

Las células madre pluripotentes pueden aislarse de un producto de cultivo de tejido corporal tal como fibroblastos cultivados y células madre mieloides y también pueden aislarse en forma de células individuales.

En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes de la presente invención son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales a través de cultivo adherente *in vitro*. Específicamente, las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células representativas de las tres capas germinales, piel, hígado, nervio, músculo, hueso, grasa y similares a través de cultivo de inducción *in vitro*. Además, las células madre pluripotentes son capaces de diferenciarse en células características de las tres capas germinales cuando se trasplantan *in vivo* en el testículo. Además, las células madre pluripotentes son capaces de sobrevivir y diferenciarse en órganos (por ejemplo, piel, médula espinal, hígado y músculo) cuando se trasplantan a los órganos dañados mediante inyección intravenosa en un organismo vivo.

En alguna realización, las células madre pluripotentes de la presente invención tienen una propiedad tal que crecen a una tasa de crecimiento de aproximadamente 1,3 días/división celular por cultivo en suspensión, pero detienen el crecimiento en aproximadamente 10 días y también tienen una propiedad tal que cuando se trasplantan en el testículo, no se vuelven cancerosas durante al menos medio año.

En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden crecer a través de repetición de cultivo en suspensión y cultivo adherente. Además, las células madre pluripotentes de la presente invención experimentan división asimétrica, en el caso de otras células madre somáticas.

Los ejemplos de células derivadas o células inducidas incluyen células inducidas por transferencia génica o adición de un compuesto. Otro ejemplo de las mismas es una célula iPS de la célula madre de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1-1 muestra la relación entre las fracciones de células mesenquimáticas, células Muse y grupos M (grupos de células de tipo cuerpo embrioide derivados de células Muse). Como se muestra en la figura 1, las células SSEA-3 positivas se separan directamente y después se cultivan por cultivo en suspensión sin exposición

a sobrecarga prolongada, de modo que pueden obtenerse grupos M.

La figura 1-2 muestra un procedimiento para causar el crecimiento de células Muse en grandes cantidades.

La figura 2 muestra factores, la relación del nivel de expresión de los mismos en un grupo M al de una fracción de células vírgenes era elevada.

5 La figura 3 muestra factores, la relación del nivel de expresión de los mismos en un grupo M al de células ES humanas era elevado.

La figura 4 muestra protocolos para clasificación MACS.

10 La figura 5 muestra fotos (imágenes teñidas) que muestran la eliminación de células muertas cuando fracciones de fibroblastos humanos (fibroblastos H) se sometían a incubación en tripsina de 16 h (figura 5a), 3 minutos de agitación con vórtice a 1800 r.p.m.-2200 r.p.m./minuto (figura 5b), y después tinción con azul tripano.

15 La figura 6 muestra fotos de diversas células. La figura 6a muestra una célula individual (Barra = 10 µm) en una fracción de células enriquecidas en Muse, la figura 6b muestra un grupo de células de cuerpo embriode derivado de células ES humanas (Barra = 25 µm), la figura 6c muestra un grupo M (Barra = 25 µm) con un diámetro de aproximadamente 25 µm, la figura 6d muestra un grupo de células derivadas de ES humanas (en el día 4) teñido por tinción con fosfatasa alcalina (Barra = 25 µm) y las figuras 6e g muestran imágenes teñidas inmunológicamente de Oct3/4(e), Sox2(f) y PAR4(g) en grupos M.

20 La figura 7-1 muestra fotos que muestran las características de grupos de células de fracciones de fibroblastos H y fracciones de MSC humanas (H-MSC). Las figuras 7-1a y b muestran grupos de células (Barra = 100 µm) formados espontáneamente por cultivo adherente general para fracciones de MSC humanas vírgenes. Las figuras 7-1c y d muestran el estado de una fracción de fibroblastos H 1 en el día 0 (c) y el día 7 (d) sometida a incubación prolongada con tripsina, seguida por cultivo MC (Barra = 100 µm). Una cabeza de flecha en la figura 7-1d indica un grupo M. Las figuras 7-1e y f muestran grupos M formados a partir de una fracción de fibroblastos H 1 en el día 7 de cultivo MC (Barra = 50 µm).

25 La figura 7-2 muestra fotos que muestran las características de grupos de células de fracciones de fibroblastos H y fracciones de MSC humanas (H-MSC). Las figuras 7-2g-l muestran los resultados de inmunotinción; es decir, muestra la localización de Nanog (figuras 7-2g y j), Oct3/4 (figuras 7-2h), SSEA-3 (figura 7-2i), PAR4 (figura 7-2k) y Sox2 (figura 7-2l) en grupos M (figuras 7-2g, i, y k) formados a partir de fracciones de fibroblastos H y grupos M (figuras 7-2h, j y l) formados a partir de fracciones de H-MSC (Barra = 50 µm).

30 La figura 7-3 muestra fotos que muestran las características de los grupos de células de fracciones de fibroblastos H y fracciones de MSC humanas (H-MSC). Las figuras 7-3m-o muestran los resultados de tinción con fosfatasa alcalina para células ES humanas (figura 7-3m), grupos M (figura 7-3n) de fracciones de fibroblastos H y fracciones de fibroblastos H 1 vírgenes (figura 7-3o) (Barra = 50 µm).

35 La figura 7-4 muestra micrografías electrónicas que muestran las características de grupos de células de fracciones de fibroblastos H y fracciones de MSC humanas (H-MSC). Las figuras 7-4p-r muestran imágenes de microscopía electrónica de cuerpos embrioides de células ES humanas (figura 7-4p, en el día 3 de cultivo MC), grupos M derivados de la fracción de fibroblasto H 1 (figuras 7-4q y r, en el día 5 de cultivo MC) (Barra = 5 µm).

La figura 8-1 muestra la capacidad de clonación y auto renovación de grupos M. Específicamente, la figura 8-1 muestra el esquema de un experimento realizado para la determinación de la capacidad de clonación y autorrenovación de células Muse.

40 La figura 8-2 muestra la tasa de crecimiento de células Muse suspendidas.

La figura 8-3 muestra un cariotipo normal de células expandidas de forma clonal a partir de un grupo M individual (derivado de fibroblastos H 1, 1.^a generación (ciclo)).

45 La figura 9-1 muestra la diferenciación de grupos M. Las figuras 9-1a-c muestran imágenes teñidas inmunológicamente que muestran la localización de actina α de músculo liso y neurofilamentos (figuras 9-1a y b) y α-fetoproteína (figura 9-1c) en grupos de células diferenciadas de una fracción de fibroblastos H 1 (Barra = 500 µm en la figura 9-1a; Barra = 50 µm en las figuras 9-1b y c). Las cabezas de flecha en la figura 9-1a indican grupos M adherentes.

50 La figura 9-2 muestra los resultados del análisis de RT-PCR para la expresión de α-fetoproteína (α-FP), la expresión de GATA6, la expresión de MAP-2 y la expresión de Nkx2.5 en poblaciones celulares preparadas cultivando una fracción de células vírgenes y grupos M de 1.^a generación y 3.^a generación de fracciones de fibroblastos H en gelatina para inducir diferenciación espontánea. Como controles positivos, se usó hígado de feto humano para α-FP y se usaron embriones humanos completos para GATA6, MAP-2 y Nkx2.5.

55 Las figuras 9-3e-l muestran los testículos de ratones inmunodeficientes a los que se ha administrado una fracción de células enriquecidas en Muse. La figura 9-3e muestra un testículo intacto de control, un testículo obtenido mediante administración de células ES de ratón (células mES) (semana 8), un testículo obtenido mediante administración de MEF (células de alimentación) (semana 8), un testículo obtenido mediante administración de un grupo M (grupos M) (mes 6) y un testículo obtenido mediante administración de una fracción de células enriquecidas en Muse (Muse) (mes 6). Las figuras 9-3f-j muestran imágenes inmunoteñidas de neurofilamento M (figura 9-3f, teñido de verde en la foto), α-fetoproteína (figura 9-3g, teñido de verde en la foto) y actina de músculo liso (figura 9-3h, teñido de rojo en la foto) en tejido testicular obtenido mediante administración de fracciones de células enriquecidas en Muse o grupos M (Barra = 50 µm). Tres paneles en la figura 9-3i muestran imágenes de doble tinción de mitocondrias humanas (teñidas de verde) y actina de músculo liso (teñida de rojo) (Barra = 20 µm). Las figuras 9-3j-l muestran imágenes de tejido testicular obtenido mediante la administración de fracciones celulares enriquecidas en Muse (figuras 9j y k). La estructura de tipo tubo observada en la figura 9k se tiñe con un anticuerpo contra mitocondrias humanas (Barra = 500 µm en la figura 9-3j; Barra = 50 µm en las figuras 9-3k-l).

La figura 10a muestra los resultados de PCR cuantitativa para factores implicados en la pluripotencia y estados de células indiferencias de fibroblastos H (fibro 1 y fibro 2) y H-MSC (MSC-1 y MSC-2) (n.º 2). Cada patrón dado en una columna en la figura 10a indica el resultado de comparar el nivel de expresión génica en fracciones celulares enriquecidas en Muse o grupos M (día 7) con lo mismo en fracciones de células vírgenes. Un patrón blanco indica que la relación del nivel de expresión génica en las fracciones celulares enriquecidas en Muse o los grupos M al mismo en fracciones de células vírgenes es mayor de 1/3 (1: 3) pero es inferior a 3 (3: 1). Un patrón gris indica que la relación del nivel de expresión génica en las fracciones celulares enriquecidas en Muse o los grupos M al mismo en fracciones de células vírgenes es mayor de 3 (3: 1). Un patrón de líneas oblicuas indica que la relación del nivel de expresión génica en las fracciones celulares enriquecidas en Muse o los grupos M al mismo en fracciones de células vírgenes es inferior a 1/3 (1: 3).

La figura 10b muestra la actividad telomerasa de fracciones de células vírgenes derivadas de H-MSC (vírgenes), fracciones celulares enriquecidas en Muse (Muse) y grupos M (día 7). Se usaron muestras inactivadas por calor (calor) como controles negativos.

La figura 11 muestra los resultados del análisis de micromatriz de ADN para fracciones de células vírgenes derivadas de la fracción de fibroblastos H y la fracción de H-MSC, fracciones celulares enriquecidas en Muse y grupos M.

La figura 12 muestra fotos que muestran grupos celulares de tipo cuerpo embrioide formados por cultivo MSC de células Muse recogidas directamente como células SSEA-3/CD105 doble positivas de un componente de células mononucleares de médula ósea humana. La figura 12a muestra grupos M formados realizando cultivo MC (8 h-hBM-MC, 7 días) para fracciones de células mononucleares aisladas de médula ósea humana y después sometidas a incubación con tripsina de 8 h (Barra = 100 µm). La figura 12b muestra una imagen teñida con fosfatasa alcalina de grupos M formados por 8 h-hBM-MC (7 días) (Barra = 50 µm).

La figura 13 muestra los resultados de análisis por RT-PCR para α-fetoproteína (α-FP), GATA6, MAP-2 y Nkx2.5 en poblaciones de células preparadas por cultivo en gelatina de grupos M formados a partir de fracciones de H-MSC-1 vírgenes (virgen 1), fracciones de H-MSC-2 vírgenes (virgen 2) (ambas fracciones eran controles negativos) y fracciones de células mononucleares derivadas de médula ósea humana (8 h-hBM) sometidas a 8 h de incubación en tripsina o fracciones de células mononucleares derivadas de médula ósea humana (hBM vírgenes) no sometidas a incubación con tripsina, para inducir la diferenciación espontánea de las mismas.

La figura 14 muestra los resultados del análisis FACS de fracciones de fibroblastos H (células vírgenes) y fracciones de H-MSC (células vírgenes).

La figura 15-1 muestra fotos que muestran: una imagen teñida de células SSEA-3(+) (izquierda en 15 1a) en fracciones de células vírgenes; y una imagen teñida de células SSEA-3(+) (derecha en 15 1a) que se expandieron clonalmente a partir de grupos M individuales de células SSEA-3(+) recogidas por clasificación FACS. Cada barra en esta figura indica 100 µm.

La figura 15-2 muestra fotos de imágenes teñidas que muestran la localización de Numblake (verde) que es un factor implicado en la división asimétrica durante la división celular de células Muse (fibroblastos H). Cada barra en esta figura indica 100 µm.

La figura 15-3 muestra micrografías electrónicas que muestran células SSEA-3(-) derivadas de fibroblastos H (figura 15-3c) y células SSEA-3(+) (figura 15-3d). Cada barra en esta figura indica 5 µm.

La figura 15-4 muestra fotos de imágenes teñidas que muestran Oct3/4 (verde) (figura 15-4e), Sox2 (verde) (figura 15-4f) y SSEA-3 (rojo) (figura 15-4g) en células Muse derivadas de fibroblastos H.

La figura 16-1 muestra fotos que muestran la diferenciación de fracciones de células Muse SSEA-3(+) marcadas con GFP en tejido dañado de ratones muy inmunodeficientes (ratones Nog). Las figuras 16 1N y O muestran células GFP(+) de una médula espinal dañada debido a compresión (4 semanas después), que expresa neurofilamentos (rojo) y complejos de Golgi humanos (blanco). La figura 16-1O muestra una imagen ampliada de una parte rodeada por un cuadrado en la figura 16-1N. La figura 16-1P muestra células diana GFP(+) de un hígado dañado (4 semanas después), que expresa albúmina humana (rojo) y complejos de Golgi humanos (blanco).

La figura 16-2 muestra fotos que muestran la expresión de albúmina humana en el hígado en que se trasplantaron células Muse SSEA-3(+), examinadas por RT-PCR.

La figura 16-3 muestra fotos que muestran la diferenciación de fracciones de células Muse SSEA-3(+) marcadas con GFP en tejido dañado de ratones muy inmunodeficientes (ratones NOG). Específicamente, las fotos muestran células GFP(+) de músculo (3 semanas después) que expresa distrofina humana (rojo).

La figura 17-1 muestra fotos que muestran la diferenciación de células que han crecido a partir de grupos M formados de células Muse individuales. Las figuras 17-1A-D muestran los resultados de neutralización. La figura 17-1A muestra las esferas así formadas. Además, en cuanto a los datos de inmunotinción para las esferas, la figura 17-1B muestra la expresión de nestina, la figura 17-1C muestra la expresión. De Musashi y la figura 17-1D muestra la expresión de NuroD. La figura 17-1E muestra células MAP-2(+) obtenidas por diferenciación adicional de estas esferas en células neurales. Las figuras 17-1F G muestran los resultados de inducción de células óseas y específicamente muestran la expresión de osteocalcina (F) y ALP (G). Las figuras 17-1H e I muestran los resultados de inducción de adipocitos. La figura 17-1H muestra células que contienen gotas de lípidos y la figura 17-1I muestra el resultado de tinción con Oil Red. Las figuras 17-1J muestran el resultado de inducción de patocitos; es decir, células α-fetoproteína(+).

La figura 17-2 muestra fotos que muestran la expresión de albúmina humana y α-fetoproteína humana en células inducidas por inducción de hepatocitos, examinadas por RT-PCR.

La figura 18-1 muestra fotos que muestran la expresión de Sox10, Snail1, Slug, Tyrp1 y Dct en células Muse

SSEA-3(+), examinadas por RT-PCR.

La figura 18-2 muestra la expresión de NG2, CD34, vWF, CD117, CD146 y CD271, analizado por FACS. En fibroblastos dérmicos humanos vírgenes, se encontró que NG2, que es un marcador de pericitos y CD34 y vWF que son marcadores de células progenitoras endoteliales, eran negativos. También se encontró que eran negativos en células SSEA-3(+). Se encontró que unos pocos fibroblastos dérmicos humanos vírgenes eran positivos para CD117 que es un marcador de melanoblastos, CD146 que es un marcador de pericitos y CD271 que es un marcador de NCSC (0,2 %, 0,2% y 0,8 %, respectivamente), pero no se cree que fueran células Muse ya que eran células SSEA-3(-).

La figura 18-3 muestra que una célula Muse fagocitaba ferrita.

La figura 19 muestra fotos que muestran la formación de células iPS preparadas a partir de células Muse. La figura 19a muestra un estado de células iPS humanas inducidas a partir de células Muse derivadas de fibroblastos dérmicos (NHDF). Las figuras 19b-f muestran la expresión de marcadores de células pluripotentes ("b" muestra la expresión de Nanog, "c" muestra la expresión de Oct3/4, "d" muestra la expresión de Sox2, "e" muestra la expresión de SSEA-3 y "f" muestra la expresión de Tra-1-60).

La figura 20 muestra fotos que muestran los resultados del análisis inmunohistoquímico para Nanog (E), Oct3/4 (F), Sox2 (G) y Tra-1-81 (H).

La figura 21 muestra fotos que muestran la expresión de marcadores de pluripotencia en colonias ((-)-1 y (-)-2) que crecían a partir de células iPS derivadas de Muse (Mi-1 y Mi-2) y células SSEA-3(-), examinadas por RT-PCR.

La figura 22-1 muestra fotos que muestran los resultados de inmunotinción de Tra-1-81 de colonias formadas por células SSEA-3(+) y (-) en el día 30 después del cultivo sobre células de alimentación MEF después de introducción de Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc con retrovirus. Se usaron células ES humanas como controles. Las colonias (a1) de células SSEA-3(+) y células ES humanas (a2) eran positivas para Tra-1-81, pero todas las colonias de las células SSEA-3(-) eran negativas para lo mismo.

La figura 22-2 muestra fotos que muestran la expresión de marcadores de pluripotencia (Oct3/4 endógeno (endo Oct), Sox2 endógeno (endo Sox2), Nanog, Klf4 endógeno (endo Klf4), Rex1 y UTF1) para células SSEA-3(+) y (-) en una fase después de 30 días de cultivo en MEF como en 22-1. En la población de células SSEA-3(-), no se observaron señales de Sox2 y Nanog.

La figura 22-3 muestra fotos que muestran colonias (figuras 22-3D y D1) que crecieron a partir de células iPS (células iPS derivadas de células Muse) (figuras 22-3C y C1) inducidas a partir de células Muse y de células SSEA-3(-).

La figura 23-1 muestra fotos que muestran la diferenciación *in vitro* de células iPS inducidas a partir de células Muse derivadas de fibroblastos dérmicos (NHDF). La figura 23-1i muestra la expresión de α -fetoproteína (verde) que es un marcador endodérmico y actina de músculo liso (rojo (el azul indica ADN)) que es un marcador mesodérmico. La figura 23-1j muestra la expresión de neurofilamentos (verde) que es un marcador ectodérmico.

La figura 23-2 muestra los resultados del análisis por RT-PCR para diferenciación *in vitro* de células iPS inducidas a partir de células Muse. La figura 23-2 muestra específicamente la expresión de marcadores para las 3 capas germinales.

La figura 23-3 muestra fotos que muestran las estructuras tisulares de teratomas formados a partir de iPS inducidas a partir de células Muse derivadas de fibroblastos dérmicos (NHDF). La figura 23-3 muestra específicamente la diferenciación de células iPS en diversos tipos de tejido, como se revela con tinción HE (hematoxilina y eosina). La figura 23-3m muestra cartílago, la figura 23-3n muestra músculo, la figura 23-3o muestra epitelio neural, la figura 23-3p muestra epitelio pigmentado y la figura 23-3q muestra epitelio cilíndrico.

La figura 24 muestra los resultados de secuenciación con bisulfito (sulfito de hidrógeno) para el gen Nanog y el gen Oct3/4 de fracciones de células SSEA-3(-), grupos M y células iPS derivadas de Muse. El valor numérico en cada columna indica la posición de CpG posterior al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Un círculo abierto indica citosina no metilada y un círculo relleno indica citosina metilada.

La figura 25 muestra los resultados de PCR cuantitativa para factores implicados en el ciclo celular de fibroblastos vírgenes (vírgenes), grupos M y células iPS. Entre las columnas indicadas con "/vírgenes", las columnas abiertas indican que la relación de fracciones Muse o grupos M a las células vírgenes es de menos de 2 (2: 1) y mayor de 1/2 (1: 2). Además, las columnas rellenas indican que la misma relación es mayor de 2 (2: 1). Las columnas sombreadas son líneas oblicuas indican que la misma relación es inferior a 1/2 (1: 2). Entre las columnas indicadas con "/iPS," el símbolo "*" indica que el nivel de expresión génica en grupos M es mayor que el de células iPS. El símbolo "*" indica que el nivel de expresión génica en células iPS es mayor que en grupos M.

La figura 26 muestra los resultados de PCR cuantitativa para factores implicados en pluripotencia y el estado de células indiferenciadas de fibroblastos vírgenes (vírgenes), grupos M y células iPS. El significado de cada columna es como se define en la figura 25.

La figura 27 muestra el resumen de un informe de investigación respecto a la eficacia de inducción de líneas celulares iPS preparadas en modelos humanos y de ratón. La figura 27 muestra combinaciones de factores de transcripción que inducen la reprogramación nuclear.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se describirá en detalle de la siguiente manera.

La presente invención se refiere a células madre pluripotentes o fracciones de células madre pluripotentes que

pueden obtenerse directamente de tejido corporal de un organismo vivo (*in vivo*), un procedimiento para aislar las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes y las células madre pluripotentes derivadas de tejido corporal o fracciones de células madre pluripotentes obtenidas por el procedimiento. Las células madre pluripotentes de la presente invención se mencionan como células Muse (multilineage-differentiating stress enduring cells - células resistentes a sobrecarga que se diferencian en múltiples linajes).

En la presente invención, la expresión "fracción de células" se refiere a una población de células que contiene al menos una cantidad dada de una célula a aislar. Por ejemplo, la expresión "fracción de células madre pluripotentes" se refiere a una población de células que contiene una célula madre pluripotente en una cantidad correspondiente a un 1 % o más de las mismas, un 10 % o más de las mismas, un 30 % o más de las mismas, un 50 % o más de las mismas, un 70 % o más de las mismas, un 90 % o más de las mismas o un 95 % o más de las mismas. Los ejemplos de las mismas incluyen grupos de células obtenidos mediante cultivo de células madre pluripotentes y poblaciones de células obtenidas mediante enriquecimiento de células madre pluripotentes. Además, la fracción de células también puede mencionarse como fracción de células sustancialmente homogénea.

La expresión "organismo vivo" se refiere a un organismo de mamífero vivo y se refiere específicamente a un organismo animal que experimenta desarrollo en algún grado. En la presente invención, los ejemplos de dicho organismo vivo no incluyen óvulos fertilizados o embriones en las fases del desarrollo antes de la fase de blástula, pero incluyen embriones en fases del desarrollo en y después de la fase de blástula, tal como fetos y blástulas. Los ejemplos de mamíferos incluyen, aunque sin limitación, primates tales como seres humanos y monos, roedores tales como ratones, ratas, conejos y cobayas, gatos, perros, ovejas, cerdos, ganado vacuno, caballos, burros, cabras y hurones. Las células madre pluripotentes de la presente invención se distinguen claramente de las células madre embrionarias (células ES) o células madre germinales embrionarias (células EG) porque son de tejido corporal vivo.

La expresión "tejido mesodérmico" se refiere a tejido de origen mesodérmico que aparece en el curso del desarrollo inicial de un animal. Los ejemplos de tejido mesodérmico incluyen tejido del sistema muscular, tejido conjuntivo, tejido del sistema circulatorio, tejido del sistema excretor y tejido del sistema genital. Por ejemplo, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden obtenerse de líquido de médula ósea o tejido cutáneo tal como tejido conjuntivo de la dermis.

La expresión "tejido mesenquimático" se refiere a tejido tal como hueso, cartílago, grasa, sangre, médula ósea, músculo esquelético, dermis, ligamento, tendón y tejido cardíaco. Por ejemplo, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden obtenerse de la médula ósea o piel. Además, las células madre pluripotentes también pueden obtenerse del cordón umbilical.

La expresión "las células pueden obtenerse directamente del tejido" significa que las células pueden aislarse de tejido sin ninguna operación de inducción artificial tal como introducción de un gen foráneo o una proteína foránea o tratamiento con un compuesto (por ejemplo, administración de un compuesto). Dicho gen foráneo puede ser, aunque sin limitación, un gen capaz de reprogramar el núcleo de una célula somática, por ejemplo. Los ejemplos de dicho gen foráneo incluyen genes de la familia Oct tal como un gen Oct3/4, genes de la familia Klf tal como un gen Klf, genes de la familia Myc tal como un gen c-Myc y genes de la familia Sox tal como un gen Sox2. Además, los ejemplos de una proteína foránea incluyen proteínas codificadas por estos genes y citocinas. Además, los ejemplos de un compuesto incluyen un compuesto de bajo peso molecular capaz de inducir la expresión del gen anterior que puede reprogramar el núcleo de una célula somática, DMSO, un compuesto que puede funcionar como agente reductor y un agente de metilación del ADN. Las células madre pluripotentes de la presente invención se distinguen claramente de las células iPS (células madre pluripotentes inducidas) y las células ES porque las células madre pluripotentes de la presente invención pueden obtenerse directamente de organismos o tejido vivo. Además, en la presente invención, el cultivo celular, el aislamiento de una célula o una fracción de células usando un marcador de superficie celular como un índice, la exposición de las células a sobrecarga celular y la aplicación de un impacto físico sobre las células no se incluyen en los ejemplos de operación de inducción artificial. Además, las células pluripotentes de la presente invención también pueden caracterizarse porque pueden obtenerse sin requerir reprogramación o inducción de la desdiferenciación.

Las células madre pluripotentes de la presente invención se cree que están presentes en tejido mesodérmico o tejido mesenquimático, o similares de un organismo vivo. En la presente invención, las células o fracciones de células que existen en estos tipos de tejido se aíslan. Las células madre pluripotentes de la presente invención están presentes en la médula ósea, por ejemplo, de modo que pueden suministrarse de la médula ósea a cada tejido de un organismo vivo mediante la sangre o similares. Por tanto, las células madre pluripotentes pueden aislarse de la médula ósea, cada tejido de un organismo vivo, tal como la piel e incluso la sangre.

La expresión "célula o células madre pluripotentes" se refiere a células que tienen pluripotencia y que tienen las siguientes propiedades.

(1) Las células madre pluripotentes expresan marcadores de pluripotencia tales como Nanog, Oct3/4, SSEA-3, PAR-4 y Sox2.

(2) Las células madre pluripotentes muestran capacidad de clonación por la que se expanden desde una célula

individual y mantienen clones de producción por sí mismas.

(3) Las células madre pluripotentes muestran capacidad de autorrenovación.

(4) Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse *in vitro* e *in vivo* en las tres capas germinales (linaje de células endodérmicas, linaje de células mesodérmicas y linaje de células ectodérmicas).

5 (5) Las células madre pluripotentes se diferencian en las tres capas germinales cuando se trasplantan en el testículo o tejido subcutáneo de un ratón.

(6) Las células madre pluripotentes se hayan positivas a través de tinción con fosfatasa alcalina.

10 Las células madre pluripotentes de la presente invención se distinguen claramente de células madre adultas y células madre tisulares porque las células madre pluripotentes de la presente invención tienen pluripotencia. Además, las células madre pluripotentes de la presente invención se distinguen claramente de fracciones de células tales como células del estroma de la médula ósea (MSC) porque las células madre pluripotentes de la presente invención se aíslan en forma de una célula individual o una pluralidad de células que tienen pluripotencia.

15 Además, las células madre pluripotentes de la presente invención tienen las siguientes propiedades.

(i) La tasa de crecimiento es relativamente suave y el ciclo de división tarda 1 día o más, tal como 1,2-1,5 días. Sin embargo, las células madre pluripotentes no ejercen proliferación infinita de una manera similar a las células ES o células iPS.

20 (ii) Cuando se trasplantan en un ratón inmunodeficiente, las células madre pluripotentes se diferencian en un linaje de células endodérmicas, un linaje de células mesodérmicas y un linaje de células ectodérmicas. Las células madre pluripotentes se caracterizan porque no se vuelven cancerosas durante medio año o más, a diferencia de las células ES o células iPS, mediante las cuales los teratomas se vuelven cancerosas en un corto periodo de tiempo.

25 (iii) Las células madre pluripotentes forman grupos de células de tipo cuerpo embrioide como resultado de cultivo en suspensión.

(iv) Las células madre pluripotentes forman grupos de células de tipo embrioide como resultado de cultivo en suspensión y detienen el crecimiento en aproximadamente 10 días. Posteriormente, cuando los grupos se transfieren para cultivo adherente, empiezan a crecer de nuevo.

30 (v) La división asimétrica está asociada con el crecimiento.

(vi) Los cariotipos de las células son normales.

(vii) Las células madre pluripotentes tienen poca o ninguna actividad telomerasa. La expresión "...tienen poca o ninguna actividad telomerasa" se refiere a que se detecta poca o ninguna actividad telomerasa cuando dicha actividad se detecta usando un kit de detección de telomerasa TRAPEZE XL (Millipore), por ejemplo. La expresión "baja actividad telomerasa" se refiere a una situación en que las células tienen actividad telomerasa en la misma medida que la de los fibroblastos humanos o tienen actividad telomerasa que es 1/5 o menos y preferentemente 1/10 o menos de la de las células Hela.

35 (viii) Respecto al estado de metilación, los niveles de metilación en regiones promotoras de Nanog y Oct3/4 son bajos en células iPS inducidas a partir de células Muse.

40 (ix) Las células madre pluripotentes muestran capacidad fagocítica.

(x) Las células madre pluripotentes muestran ausencia de crecimiento neoplásico. Aquí, la expresión "...las células no muestran crecimiento neoplásico" se refiere a una situación en que, cuando se realiza cultivo en suspensión, las células detienen su crecimiento en el momento en que sus grupos alcanzan un tamaño predeterminado y no experimentan crecimiento infinito. Además, dicha expresión se refiere a una situación en que, cuando dichas células se trasplantan en el testículo de un ratón inmunodeficiente, no se forma teratoma. Además, los anteriores (i) a (iv) y similares también se refieren al hecho de que las células relevantes (grupos) no experimentan crecimiento neoplásico.

Específicamente, las células de la presente invención incluyen las siguientes células madre pluripotentes:

50 (A) células madre pluripotentes que se obtienen de tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo y pueden obtenerse directamente sin introducción de una sustancia química, un gen foráneo o una proteína foránea en dichas células;

55 (B) células madre pluripotentes que tienen la propiedad de (A) anterior, en las que el tejido mesodérmico o el tejido mesenquimático de un organismo vivo se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, piel, sangre, cordón umbilical y grasa;

(C) las células madre pluripotentes de (A) o (B) anteriores que pueden obtenerse sin reprogramación o inducción de la desdiferenciación;

60 (D) las células madre pluripotentes de (A) o (B) anteriores que no se vuelven cancerosas al menos en medio año después de trasplantarse en el testículo;

(E) las células madre pluripotentes de (A) o (B) anteriores que no experimentan crecimiento infinito, a diferencia de las células ES y las células iPS; o

(F) células madre pluripotentes de tejido mesodérmico o tejido mesenquimático de un organismo vivo, que sobreviven cuando se tratan con proteasa y, por tanto, son resistentes a proteasa.

65 Además, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden aislarse poniéndoles una sobrecarga

celular a las células del tejido mesodérmico o tejido mesenquimático de un organismo vivo y después recogiendo las células supervivientes. Aquí, la expresión "sobrecarga celular" se refiere a sobrecarga externa. Específicamente, las células se exponen a dicha sobrecarga mediante tratamiento con proteasa, cultivo en condiciones de bajo contenido de oxígeno, cultivo en condiciones de bajo contenido de fosfato, cultivo en condiciones de privación de suero, cultivo en un estado de privación de azúcar, cultivo en exposición a radiación, cultivo en exposición a choque térmico, cultivo en presencia de una sustancia tóxica, cultivo en presencia de oxígeno activo, cultivo en estimulación mecánica, cultivo en tratamiento por presión o similares. De estos ejemplos, se prefiere el tratamiento con proteasa y, específicamente, el cultivo en presencia de proteasa. La proteasa no está limitada. Puede usarse serina proteasa tal como tripsina o quimotripsina, ácido aspártico proteasa tal como pepsina, cisteína proteasa tal como papaína y quimopapaína, metaloproteasa tal como termolisina, ácido glutámico proteasa, treonina N-terminal proteasa y similares. La concentración de proteasa a añadir para el cultivo no está limitada. En general, las concentraciones a emplearse para la eliminación de células adherentes que se cultivan en placas Petri o similares pueden emplearse en el presente documento. Las células madre pluripotentes de la presente invención puede decirse que son células madre que tienen resistencia a las tensiones externas mencionada anteriormente, tales como células que tienen resistencia a tripsina.

Los ejemplos de tejido mesodérmico y tejido mesenquimático de un organismo vivo incluyen, aunque sin limitación, células mononucleares en médula ósea, fracciones de fibroblastos, tales como células cutáneas, tejido de pulpa, tejido del globo ocular y tejido de la raíz capilar. En cuanto a las células, pueden usarse tanto células cultivadas como células recogidas del tejido. Entre estas células, se desean células de médula ósea y células de la piel. Los ejemplos de dichas células incluyen una fracción de células del estroma de la médula ósea (MSC) humana y una fracción de fibroblastos dérmicos humanos. Una fracción de células del estroma de médula ósea (MSC) puede obtenerse cultivando un aspirado de médula ósea durante 2 a 3 semanas.

La mayoría de las células de tejido sometido a las diversas tensiones anteriores morirán. Las células supervivientes incluyen las células madre pluripotentes de la presente invención. Después de aplicar la sobrecarga a las células, las células muertas deben eliminarse. Sin embargo, cuando se usa proteasa, estas células muertas se lisan mediante los efectos de la proteasa.

Además, después de aplicar la sobrecarga a las células, se proporciona un impacto físico a las células haciendo que queden fácilmente alteradas, y entonces las células pueden eliminarse. Un impacto físico puede proporcionarse por pipeteo riguroso, agitación rigurosa, agitación con vórtice o similares.

Se sitúa una sobrecarga celular sobre las células, se proporciona un impacto físico si fuera necesario y después las poblaciones de células resultantes se someten a centrifugación. Las células supervivientes resultantes se obtienen y recogen como sedimentos, de modo que pueden aislarse las células madre pluripotentes de la presente invención. Además, a partir de las células así obtenidas, pueden aislarse las células madre pluripotentes o las fracciones de células pluripotentes de la presente invención usando los siguientes marcadores de superficie como índices.

Las células madre pluripotentes o fracciones de células pluripotentes de la presente invención también pueden aislarse cultivando tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares (*in vivo*) de un organismo sometido a sobrecarga tal como traumatismo o una quemadura, y después recogiendo las células que han migrado. Las células de tejido dañado se exponen a sobrecarga. Por tanto, en la presente invención, la expresión "cultivo de tejido mesodérmico o tejido mesenquimático (*in vivo*) de un organismo dañado" también se refiere a situar una sobrecarga celular sobre células de tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo.

Como un ejemplo, a continuación, se describe un procedimiento para tratar dichas células con tripsina. La concentración de tripsina en este punto no está limitada. Por ejemplo, en cultivo general de células adherentes, las concentraciones de tripsina pueden ser concentraciones que se emplean para eliminar células adherentes que se adhieren a un recipiente de cultivo, que varían de un 0,1 % a un 1 % y preferentemente que varían de un 0,1 % a 0,5 %, por ejemplo. Por ejemplo, las células pueden exponerse a una sobrecarga externa incubando las células (100 000-500 000 células) de tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo en 5 ml de una solución de tripsina con la concentración anterior. El tiempo para la incubación con tripsina varía de aproximadamente 5 a 24 horas y preferentemente varía de aproximadamente 5 a 20 horas. En la presente invención, 8 o más horas de incubación con tripsina, tal como 8 horas o 16 horas de tratamiento, es incubación prolongada con tripsina.

Después de la incubación con tripsina, se proporciona de forma deseable un impacto físico por pipeteo, agitación, agitación con vórtice o similares, como se describieron anteriormente. Esto se realiza para eliminar las células muertas o las células que están muriendo.

Cuando se realiza cultivo en suspensión después de la incubación con tripsina, la incubación se realiza de forma deseable en gel, tal como gel de metilcelulosa, para evitar la agregación entre células. Además, un recipiente de cultivo celular se recubre de forma deseable por anticipado con poli(2 hidroxietil metacrilato) o similares para evitar la adhesión de las células al recipiente de cultivo y mantener el estado de suspensión.

Cuando las células se exponen a sobrecarga externa, se recogen por centrifugación y después se cultivan, las células forman grupos de células. El tamaño de dicho grupo de células varía en diámetro de aproximadamente 25 µm a 150 µm. Las células madre pluripotentes (células Muse) de la presente invención se incluyen en un estado enriquecido dentro de una población de células que ha sobrevivido después de la exposición a la sobrecarga externa. Dicha población de células se menciona como fracciones de células enriquecidas en Muse (poblaciones enriquecidas en Muse). El porcentaje de células Muse en dicha fracción de células enriquecidas en Muse difiere dependiendo del procedimiento de tratamiento con sobrecarga.

El hecho de que las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención sobrevivan después de la exposición a sobrecarga sugiere que las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención son resistentes a dicha sobrecarga.

Respecto al medio a usar para cultivar las células de tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo y las condiciones de cultivo, puede emplearse cualquier medio y condiciones de cultivo usados generalmente para cultivar células animales. Además, puede usarse un medio conocido para cultivar células madre. Un medio puede complementarse apropiadamente con suero tal como suero fetal de ternera, antibióticos tales como penicilina y estreptomicina y diversas sustancias bioactivas.

Además, la presente divulgación también abarca células madre pluripotentes que son células derivadas o células inducidas de las células madre pluripotentes de la presente invención que pueden obtenerse directamente del tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo. La expresión "células derivadas o células inducidas" se refiere a células o poblaciones de células obtenidas cultivando las células madre pluripotentes o células obtenidas sometiendo a las células madre pluripotentes a una operación de inducción artificial tal como introducción de un gen foráneo. Las células descendientes también se incluyen en el presente documento. Además, se dice que las células iPS que se habían presentado en el momento de la presente invención se inducen a partir de células madre pluripotentes como resultado de la reprogramación (por ejemplo, introducción de un gen foráneo en células diferenciadas en tejido corporal, tal como fibroblastos dérmicos. Las células obtenidas sometiendo a las células (que pueden obtenerse directamente del tejido de la presente invención y ya tienen propiedades como células madre pluripotentes) a una operación de inducción artificial tal como introducción de un gen foráneo se distinguen de las células iPS.

Los grupos de células de tipo cuerpo embrioide (de tipo cuerpo EB) se obtienen a través de cultivo en suspensión de las células madre pluripotentes de la presente invención. La presente invención también abarca dichos grupos de células de tipo cuerpo embrioide y células contenidas en dichos grupos de células de tipo cuerpo embrioide. Los cuerpos embrioides se forman como grupos de células a través de cultivo en suspensión de las células madre pluripotentes de la presente invención. En este momento, en la presente invención, dicho cuerpo embrioide obtenido cultivando las células madre pluripotentes de la presente invención también se menciona como grupo M (grupo de células de tipo cuerpo embrioide derivadas de células Muse). Los ejemplos de un procedimiento para el cultivo en suspensión para la formación de grupos de células de tipo cuerpo embrioide incluyen cultivo usando un medio que contiene un polímero soluble en agua tal como metilcelulosa (Nakahata, T. y col., Blood 60, 352-361 (1982)) y cultivo de gota colgante (Keller, J. Physiol. (Lond) 168: 131-139, 1998). La presente divulgación también abarca grupos de células de tipo cuerpo embrioide obtenidos mediante autorrenovación de los grupos de células de tipo cuerpo embrioide, células contenidas en dichos grupos de células de tipo cuerpo embrioide y células madre pluripotentes. En este caso, la expresión "autorrenovación" se refiere a una situación en que las células contenidas en los grupos de células de tipo cuerpo embrioide se cultivan para causar la formación de grupos de células de tipo cuerpo embrioide de nuevo. La autorrenovación puede realizarse repitiendo un ciclo de una a varias veces. Además, la presente divulgación también abarca células y tejido, que se diferencian de los grupos de células de tipo cuerpo embrioide anteriores o células contenidas en dichos grupos de células de tipo cuerpo embrioide.

La figura 1-1 muestra la relación entre fracciones de células mesenquimáticas (fibroblastos humanos, células del estroma de médula ósea humana (MSC) y líquido de médula ósea fresca), células Muse y grupos M. Cuando se impone una estimulación de sobrecarga (por ejemplo, incubación prolongada con tripsina (LTT, *long-term trypsin*) sobre los grupos de células tipo células mesenquimáticas, se enriquecen las células Muse y después se obtienen fracciones de células que contienen muchas células Muse (mencionada como fracción de células enriquecidas en Muse). A través del cultivo en suspensión de células Muse en la fracción de células, se obtiene un grupo de células de tipo cuerpo embrioide (grupo M). Cuando los grupos de células de tipo cuerpo embrioide se cultivan en una placa de cultivo recubierta con gelatina, las células se diferencian en células de las 3 capas germinales. Además, como se muestra en la figura 1-1, las células SSEA-3(+) se separan directamente y después se realiza el cultivo en suspensión sin exponer las células a sobrecarga prolongada, de modo que pueden obtenerse grupos M.

Cuando se detiene el crecimiento de las células Muse una vez mediante cultivo en suspensión, las células Muse inician el crecimiento cuando se transfieren para cultivo adherente. A través de la repetición de la separación usando cultivo en suspensión-cultivo adherente-expresión de SSEA-3 como un índice, las células Muse pueden cultivarse en grandes cantidades (figura 1-2).

Además, las células madre pluripotentes o fracciones de células pluripotentes de la presente invención también

pueden aislarse directamente del tejido corporal sin exposición a sobrecarga celular. Específicamente, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención pueden aislarse de tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo por el siguiente procedimiento sin una operación de inducción tal como introducción de un gen foráneo.

5 Los ejemplos de tejido corporal incluyen, aunque sin limitación, tejido mesodérmico y tejido mesenquimático de un organismo vivo tal como médula ósea, piel y tejido de cordón umbilical. Cuando se usa médula ósea, puede usarse una fracción de células mononucleares de la médula ósea. El aislamiento puede realizarse usando un marcador de superficie celular que se expresa mucho en la superficie de células Muse. Por ejemplo, el aislamiento puede
10 realizarse usando la expresión de SSEA-3 como índice. Las células madre pluripotentes de la presente invención también pueden mencionarse como células Muse SSEA-3(+). Además, las células Muse expresan CD105, que es un marcador de células mesenquimáticas. Las células Muse son positivas para SSEA-3 y positivas para CD105. Por lo tanto, las células Muse puede aislarse usando la expresión tanto de SSEA-3 como de CD105 como un índice. Con el uso de estos marcadores de superficie celular, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden
15 aislarse en forma de células individuales. Las células individuales así aisladas pueden cultivarse por cultivo. Además, la presente invención abarca células madre pluripotentes que pueden aislarse de tejido corporal de un mamífero diferente a un ser humano usando un marcador correspondiente a SSEA-3.

20 Sin embargo, las células Muse son negativas para NG2, CD34, vWF (factor de von Willebrand), c-kit (CD117), CD146, y CD271 (NGFR). Además, las células Muse son negativas para Sox10, Snail, Slug, Tyrp1, y Dct.

Que las células sean negativas o no para los antígenos de superficie tales como NG2, CD34, vWF, CD117, CD146, y CD271 o que la expresión de los mismos sea débil o no, puede determinarse por observación microscópica de si
25 las células se tiñen o no con anticuerpos (contra estos antígenos) marcados con una enzima cromogénica, un compuesto fluorescente o similares. Por ejemplo, las células se someten a inmunotinción con estos anticuerpos, de modo que puede determinarse la presencia o ausencia de un antígeno de superficie. La presencia o ausencia del mismo también puede determinarse usando perlas magnéticas conjugadas a anticuerpo. Además, la presencia o ausencia de un antígeno de superficie puede determinarse usando FACS o un citómetro de flujo. Como citómetro de
30 flujo, puede usarse FACS Aria (Becton Dickinson), FACS vantage (Becton Dickinson), FACS Calibur (Becton Dickinson), o similares, por ejemplo.

Respecto a los factores de transcripción tales como Sox10, Snail, Slug, Tyrp1, y Dct, en la expresión de los mismos puede examinarse por una técnica tal como RT-PCR.

35 La expresión "...son negativas para estos antígenos de superficie" se refiere a una situación en que, cuando se realiza análisis FACS como se describe anteriormente, las células no se clasifican como células positivas o cuando se examina la expresión por RT-PCR, no se confirma la expresión de los mismos. Incluso si dichos antígenos de superficie se expresan a un grado tal que son indetectables por dichas técnicas, las células se denominan negativas en la presente invención. Además, al mismo tiempo, la medición se realiza con células tales como células madre
40 hematopoyéticas que se sabe que son positivas para los marcadores anteriores. Cuando casi no se detecta expresión o el nivel de expresión es significativamente inferior en comparación con dichas células positivas, las células pueden denominarse negativas.

45 Las células de la presente invención pueden aislarse basándose en las propiedades de los antígenos de superficie celular mencionados anteriormente.

Como se describe anteriormente, las células Muse pueden aislarse usando "el ser positivas para SSEA-3" como índice. Además, las células Muse puede aislarse usando la expresión de CD105 como índice. Las células Muse pueden aislarse además usando la ausencia de expresión de al menos 1, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11, marcadores seleccionados del grupo que consiste en NG2, CD34, vWF (factor de von Willebrand), c-kit (CD117),
50 CD146, CD271 (NGFR), Sox10, Snai1, Slug, Tyrp1, y Dct, como índice. Por ejemplo, el aislamiento es posible usando la ausencia de expresión de CD117 y CD146. Además, el aislamiento puede realizarse usando la ausencia de expresión de CD117, CD146, NG2, CD34, vWF y CD271 como índice. Además, el aislamiento puede realizarse usando la ausencia de expresión de los 11 marcadores anteriores como índice.

55 Cuando se realiza el aislamiento usando un o más marcadores de superficie, puede aislarse directamente 1 o una pluralidad de células madre pluripotentes de la presente invención del tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo sin cultivo o similares. Además, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden identificarse y aislarse observando visualmente la morfología celular usando un microscopio o
60 similar.

Después de proporcionar la sobrecarga celular al tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similares de un organismo vivo, también puede realizarse el aislamiento de un grupo de células supervivientes usando un marcador de superficie.

65 Además, las células madre pluripotentes o las fracciones de células pluripotentes de la presente invención pueden

caracterizarse por una expresión de alto nivel de otro factor específico, además de uso de los marcadores anteriores.

Las células Muse que son las células madre pluripotentes de la presente invención pueden obtenerse de fracciones de células del estroma de médula ósea (MSC) virgen o fracciones de fibroblastos dérmicos. Las células Muse se cultivan adicionalmente, de modo que se obtienen grupos de células de tipo cuerpo embrioide (EB) derivadas de células Muse. A través de la comparación y examen de los factores expresados en las células Muse, las células vírgenes y los grupos de células de tipo cuerpo embrioide derivadas de Muse y las células ES humanas, puede detectarse el factor expresado a altos niveles en células Muse. Los ejemplos de dichos factores incluyen productos de transcripción génica, proteínas, lípidos y sacáridos.

La figura 2 muestra factores para los que la relación del nivel de expresión en grupos M al mismo en células vírgenes es alta. En particular, la relación es alta para los siguientes 18 factores.

- (i) SSEA-3
- (ii) homólogo del oncogén vírico del osteosarcoma murino v-fos FBJ
- (iii) familia 16 del transportador de solutos, miembro 6 (transportador 7 de ácido monocarboxílico)
- (iv) proteína 1 relacionada con tirosinasa
- (v) canal de calcio, dependiente de voltaje, de tipo P/Q, subunidad alfa 1A
- (vi) pase de lectura abierta 81 del cromosoma 16
- (vii) quitinasa 3 de tipo 1 (glucoproteína de cartílago 39)
- (viii) proteasa, serina, 35
- (ix) cinureninasa (L-cinurenina hidrolasa)
- (x) familia 16 del transportador de solutos, miembro 6 (transportador 7 de ácido monocarboxílico)
- (xi) apolipoproteína E
- (xii) sinaptotagmina de tipo 5
- (xiii) quitinasa 3-de tipo 1 (glucoproteína de cartílago 39)
- (xiv) casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 13
- (xv) angiopoyetina tipo 4
- (xvi) prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)
- (xvii) estanniocalcina 1
- (xviii) dominio superenrollado que contiene 102B

Las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención se caracterizan porque al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 de los factores anteriores se expresan a altos niveles. Por tanto, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes pueden aislarse usando expresión de alto nivel de al menos 2 factores como índice.

La figura 3 muestra los factores para los que la relación del nivel de expresión en grupos M al mismo en células ES humanas es alto. En particular, la relación es alta en los siguientes 20 factores.

- (a) metalopeptidasa 1 de matriz (colagenasa intersticial)
- (b) epipegulina
- (c) quitinasa 3 de tipo 1 (glucoproteína de cartílago 39)
- (d) locus transcrito
- (e) quitinasa 3 de tipo 1 (glucoproteína de cartílago 39)
- (f) serglicina
- (g) clon de ADNc de inserto de longitud completa de MRNA EUROIMAGE 1913076
- (h) interactor 2 Ras y Rab
- (i) lumicano
- (j) miembro 2 de la familia CLCA, regulador del canal de cloro
- (k) interleucina 8
- (l) similar a LOC166075
- (m) dermatopontina
- (n) EGF, latrofilina y que contiene siete dominios transmembrana 1
- (o) proteína 1 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina
- (p) familia 16 del transportador de solutos, miembro 4 (transportador 5 de ácido monocarboxílico)
- (q) serglicina
- (r) germilina 2, superfamilia del nudo de cisteína, homólogo (*Xenopus laevis*)
- (s) proteína 5 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina
- (t) de tipo sulfuro quinona reductasa (levadura)

Las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención se caracterizan porque al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 de los factores anteriores se expresan a altos niveles. Por tanto, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre

pluripotentes pueden aislarse usando expresión de alto nivel de al menos 2 factores como índice.

Además, en las células madre pluripotentes o en las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención, al menos 2 de los factores anteriores (i)-(xviii) y al menos 2 de los factores anteriores (a)-(t) pueden expresarse simultáneamente a altos niveles. Por tanto, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes pueden aislarse usando expresión de alto nivel de estos genes como índice.

Además, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención se caracterizan por: los factores de un grupo de receptores odoríferos (receptor olfativo) y factores de un grupo de receptores de quimiocinas, diferentes de los marcadores de pluripotencia, se expresan; es decir, son positivas para receptores odoríferos específicos o receptores de quimiocinas.

Los ejemplos de receptores odoríferos que se expresan en las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención incluyen los siguientes 22 receptores.

receptor olfativo, familia 8, subfamilia G, miembro 2 (OR8G2);
 receptor olfativo, familia 7, subfamilia G, miembro 3 (OR7G3);
 receptor olfativo, familia 4, subfamilia D, miembro 5 (OR4D5);
 receptor olfativo, familia 5, subfamilia AP, miembro 2 (OR5AP2);
 receptor olfativo, familia 10, subfamilia H, miembro 4 (OR10H4);
 receptor olfativo, familia 10, subfamilia T, miembro 2 (OR10T2);
 receptor olfativo, familia 2, subfamilia M, miembro 2 (OR2M2);
 receptor olfativo, familia 2, subfamilia T, miembro 5 (OR2T5);
 receptor olfativo, familia 7, subfamilia D, miembro 4 (OR7D4);
 receptor olfativo, familia 1, subfamilia L, miembro 3 (OR1L3);
 receptor olfativo, familia 4, subfamilia N, miembro 4 (OR4N4);
 receptor olfativo, familia 2, subfamilia A, miembro 7 (OR2A7);
 proteína de unión al nucleótido guanina (proteína G), polipéptido de actividad activadora alfa, tipo olfativo (GNAL);
 receptor olfativo, familia 6, subfamilia A, miembro 2 (OR6A2);
 receptor olfativo, familia 2, subfamilia B, miembro 6 (OR2B6);
 receptor olfativo, familia 2, subfamilia C, miembro 1 (OR2C1);
 receptor olfativo, familia 52, subfamilia A, miembro 1 (OR52A1);
 receptor olfativo, familia 10, subfamilia H, miembro 3 (OR10H3);
 receptor olfativo, familia 10, subfamilia H, miembro 2 (OR10H2);
 receptor olfativo, familia 51, subfamilia E, miembro 2 (OR51E2);
 receptor olfativo, familia 5, subfamilia P, miembro 2 (OR5P2); y
 receptor olfativo, familia 10, subfamilia P, miembro 1 (OR10P1)

Los ejemplos de un receptor de quimiocinas que se expresa en las células madre pluripotentes o fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención incluyen los 5 siguientes receptores.

receptor 5 de quimiocinas (motivo C-C) (CCR5);
 receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCR4);
 receptor 1 de quimiocinas (motivo C-C) (CCR1);
 grupo sanguíneo Duffy, receptor de quimiocinas (DARC); y
 receptor 7 de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCR7).

Las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención expresan al menos uno de los receptores olfativos anteriores o expresan al menos uno de los receptores de quimiocinas anteriores.

A causa de los efectos de estos receptores odoríferos o receptores de quimiocinas y los factores de migración que se unen a los receptores, las células madre pluripotentes de la presente invención migran a tejido dañado y después sobreviven y se diferencian en el tejido. Por ejemplo, cuando se daña el hígado, la piel, la médula espinal o el músculo, un factor de migración específico y un receptor odorífero expresado sobre las superficies celulares funcionan causando que las células madre pluripotentes migren al tejido relevante, sobrevivan en el tejido y después se diferencien en células de hígado (endodermo), piel (ectodermo), médula espinal (ectodermo) o músculo (mesodermo), de modo que pueda regenerarse el tejido.

En una fracción de células enriquecidas en Muse que contiene muchas células Muse que son las células madre pluripotentes de la presente invención, Rex1, Sox2, KLF-4, c-Myc, DPPA2, ERAS, GRB7, SPAG9, TDGF1 y similares están regulados por incremento. En un grupo de células de células Muse, DAZL, DDX4, DPPA4, Stella, Hoxbl, PRDM1, SPRY2 y similares están regulados por incremento.

Además, en células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención, la expresión de los marcadores de células madre hematopoyéticas CD34 y CD117 no se observa nunca o se observa a un nivel extremadamente bajo.

La presente divulgación abarca no solamente células Muse, sino también una población de células resultante del enriquecimiento de células Muse, una población celular resultante del crecimiento de células Muse y una población de células resultante de la diferenciación de células Muse. La presente divulgación abarca además un kit de investigación, un chip celular y un dispositivo terapéutico que contiene células Muse o células derivadas de células Muse.

Las células madre pluripotentes de la presente invención tienen pluripotencia y, por tanto, son capaces de diferenciarse en todos los tipos de tejido. Las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes pueden usarse para medicina de regeneración y similares. Por ejemplo, dichas células y fracciones de células pueden usarse para la regeneración de diversos tipos de tejido, diversos órganos y similares. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen piel, médula cerebrospinal, hígado y músculo. Las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención se administran directamente a o en un área en las cercanías del tejido lesionado o dañado, órganos y similares, de modo que las células madre pluripotentes entren en el tejido u órgano y se diferencien en células únicas para el tejido u órgano relevante. De esta manera, las células madre pluripotentes pueden contribuir a la regeneración o reconstrucción de tejido y órganos. Además, la administración sistémica de las células madre pluripotentes o fracciones de células madre pluripotentes es posible por administración intravenosa o similares. En este caso, las células madre pluripotentes están dirigidas por migración o similares a un tejido u órgano dañado, alcanzan y entran en el tejido u órgano y después se diferencian en células del tejido u órgano, para que sean capaces de contribuir a la regeneración y reconstrucción del tejido u órgano.

La administración puede realizarse mediante administración parenteral tal como inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal, administración oral o inyección intrauterina en un embrión, por ejemplo. Además, puede realizarse en el presente documento administración local o administración sistémica. La administración local puede realizarse usando un catéter, por ejemplo. La dosis puede determinarse apropiadamente dependiendo del órgano a regenerar, el tipo de tejido o el tamaño.

Los ejemplos de un órgano a regenerar incluyen, aunque sin limitación, médula ósea, médula espinal, sangre, bazo, hígado, pulmones, intestino, ojos, cerebro, sistema inmunitario, sistema circulatorio, hueso, tejido conjuntivo, músculo, corazón, vasos sanguíneos, páncreas, sistema nervio central, sistema nervioso periférico, riñón, vejiga, piel, apéndices epiteliales, glándula mamaria, tejido adiposo y membranas mucosas de la boca, el esófago, la vagina y el ano, por ejemplo. Además, los ejemplos de enfermedades a tratar en el mismo incluyen cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica, enfermedad hepática, diabetes mellitus, hepatitis, hemofilia, enfermedad del sistema sanguíneo, trastorno neurológico degenerativo o traumático tal como lesión de la médula espinal, enfermedad autoinmunitaria, defectos genéticos, enfermedad del tejido conjuntivo, anemia, enfermedad infecciosa, rechazo de injertos, isquemia, inflamación y daño a la piel o el músculo.

Las células pueden administrarse con un material de base farmacéuticamente aceptable. Dicho material de base puede estar hecho de una sustancia con alta biocompatibilidad, tal como colágeno o una sustancia biodegradable. Pueden estar en forma de partículas, placas, tubos, vasos o similares. Las células pueden administrarse después de la unión de las mismas a un material de base o después de causar que el material de base contenga las células en el mismo.

Además, se realiza inducción de diferenciación *in vitro* para células madre pluripotentes de la presente invención, se construye el tejido usando células que se han diferenciado adicionalmente y después las células o tejido diferenciado puede trasplantarse. Como las células madre pluripotentes de la presente invención no experimentan transformación tumorigénica, la probabilidad de que las células formen cáncer es baja y puede decirse que son seguras, incluso cuando las células madre pluripotentes indiferenciadas de la presente invención están contenidas en las células o tejido diferenciado trasplantado anterior. Para evitar el rechazo de células o tejido trasplantado por un destinatario en dicha medicina de regeneración, se desea que el tejido mesodérmico, tejido mesenquimático o similar se recoja de un paciente a someter a medicina de regeneración, y después las células madre pluripotentes o fracciones de células pluripotentes de la presente invención se aíslan del tejido relevante para su uso. Además, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades debidas a la degeneración o disfunción tisular. En este caso, por ejemplo, las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención se enriquecen *ex vivo*, se cultivan o se causa que se diferencien y después se devuelven al organismo. Por ejemplo, se causa que las células madre pluripotentes se diferencien en células de tejido específico y, después, las células se trasplantan al tejido a tratar. Además, puede realizarse tratamiento celular *in situ* por trasplante de dichas células. En este caso, los ejemplos de células diana incluyen células hepáticas, células neurales tales como células neuronales o células de la glía, células de la piel y células del músculo tal como células del músculo esquelético. Se causa que las células madre pluripotentes de la presente invención se diferencien en estas células, las células diferenciadas se trasplantan y entonces puede realizarse el tratamiento *in situ*. A través de dicho tratamiento, puede tratarse la enfermedad de Parkinson, el infarto cerebral, lesión de la médula espinal, miodistrofia y similares, por ejemplo. Como las células madre pluripotentes de la presente invención no experimentan transformación tumorigénica, hay poca probabilidad de que se vuelvan cancerosas y son seguras incluso si se usan para dicho tratamiento.

Además, se causa que las células madre pluripotentes de la presente se diferencien para formar sangre o componentes de la sangre, de modo que pueda formarse sangre o componentes de la sangre *ex vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de dichos componentes de la sangre incluyen eritrocitos, leucocitos y plaquetas de la sangre. La sangre o componentes de la sangre así formados pueden usarse para transfusión autóloga o transfusión cruzada.

Como se describe anteriormente, cuando las células madre pluripotentes o las fracciones de células madre pluripotentes de la presente invención se usan para tratamiento, puede causarse diferenciación *ex vivo*, *in vivo* o *in vitro*. Las células madre pluripotentes de la presente invención se diferencian en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, estroma de la médula ósea, músculo esquelético, músculo liso, miocardio, ojos, endotelio, epitelio, hígado, páncreas, sistema hematopoyético, glía, células neuronales o células de la oligodendroglía, por ejemplo. La diferenciación de las células madre pluripotentes de la presente invención puede conseguirse cultivándolas en presencia de un factor de diferenciación. Los ejemplos de un factor de diferenciación incluyen un factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un sulfóxido de dimetilo (DMSO; e isoproterenol; o un factor 4 de crecimiento de fibroblastos (FGF4) y un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La presente invención también abarca células que se han diferenciado a partir de células madre pluripotentes de la presente invención.

Cuando las células madre pluripotentes de la presente invención se usan para tratamiento, puede introducirse un gen que codifica una sustancia antitumoral proteínica, una sustancia bioactiva o similares. Por lo tanto, puede decirse que las células madre pluripotentes de la presente invención tienen una función de suministro de un agente terapéutico. Los ejemplos de dicha sustancia incluyen agentes antiangiogénicos.

La presente divulgación abarca materiales para terapia de trasplante celular o composiciones para terapia de trasplante celular o materiales para medicina de regeneración o composiciones para medicina de regeneración, que contienen células Muse, grupos de células de tipo cuerpo embrioide formados de células Muse y células o tejido/órganos obtenidos mediante diferenciación de células Muse o los grupos de células de tipo cuerpo embrioide anteriores. Dicha composición contiene un tampón, diluyente o similar farmacéuticamente aceptable además de las células Muse, un grupo de células de tipo cuerpo embrioide formadas de células Muse o células o tejido y/u órgano obtenido a través de diferenciación de células Muse o el grupo de células de tipo cuerpo embrioide anterior.

Además, se recogen células de un paciente, se aíslan las células Muse y después las células Muse pueden usarse para diversos diagnósticos. Por ejemplo, se recogen los genes de un paciente de las células Muse y después se obtiene la información genética, de modo que se vuelve posible el diagnóstico preciso que refleje la información. Por ejemplo, las células de cada tejido y/u órgano que tienen las mismas características (por ejemplo, fondo genético) como las de un sujeto, pueden obtenerse causando la diferenciación de las células Muse derivadas de células del paciente. Por tanto, respecto al diagnóstico de la enfermedad, la dilucidación de las afecciones patológicas, el diagnóstico de los efectos o reacciones adversas de los fármacos o similares, el diagnóstico apropiado puede hacerse de acuerdo con las características de cada sujeto. Específicamente, las células Muse, grupos de células de tipo cuerpo embrioide formados de células Muse y células o tejido y/u órganos obtenidos a través de la diferenciación de células Muse o los grupos de células de tipo cuerpo embrioide anteriores puede usarse como materiales de diagnóstico. Por ejemplo, la presente invención abarca un procedimiento para diagnosticar la enfermedad o similar de un sujeto usando células Muse aisladas del sujeto o usando tejido o un órgano (obtenido mediante diferenciación de las células Muse) que tiene el mismo fondo genético que el del sujeto.

Además, pueden obtenerse células somáticas en grandes cantidades mediante diferenciación de células Muse. Por tanto, puede realizarse investigación básica, tal como la dilucidación de un mecanismo de enfermedad, desarrollo de un agente terapéutico, cribado de los efectos de un fármaco o toxicidad, evaluación del fármaco y similares. Específicamente, las células Muse, los grupos de células de tipo cuerpo embrioide formados de células Muse y las células o tejido y/u órganos obtenidos a través de diferenciación de células Muse o los grupos de células de tipo cuerpo embrioide anteriores pueden usarse como materiales para la evaluación de fármacos o el cribado de fármacos. Por ejemplo, la presente invención abarca un procedimiento para cribar un fármaco o evaluar un fármaco, que comprende causar la diferenciación y/o crecimiento de las células Muse, obtener células somáticas, administrar un fármaco candidato a las células somáticas y después examinar la respuesta de las células somáticas.

Además, se construye un banco de células Muse construyendo una biblioteca de diversas células Muse (por ejemplo, diversos tipos de HLA), de modo que pueda lograrse un sistema capaz de proporcionar células Muse a sitios de aplicación de células Muse de acuerdo con la necesidad. Por ejemplo, además de los fines enumerados anteriormente, pueden proporcionarse células con ninguno (o pocos) rechazos a terapia de trasplante celular de necesidad urgente, por ejemplo. Específicamente, la presente invención abarca un procedimiento para construir una biblioteca de células Muse; es decir, un banco de células Muse, que tiene diferentes propiedades genéticas, que comprende aislar y recoger células Muse que tienen diversas propiedades genéticas. Además, también puede construirse una biblioteca o banco usando no solamente células Muse, sino también un grupo de células de tipo cuerpo embrioide formado de células Muse, y células o tejido y/u órgano obtenido a través de la diferenciación de células Muse o los grupos de células de tipo cuerpo embrioide anteriores. En la presente invención, las bibliotecas o bancos que se construyen obteniendo grupos de células de tipo cuerpo embrioide formados de estas células Muse, y células o tejido y/u órganos obtenidos a través de diferenciación de células Muse o los grupos de células de tipo

cuerpo embrioide anteriores también se mencionan como bibliotecas de células o bancos de células. La presente invención abarca las bibliotecas de células o bancos de células así contruidos. Dichas bibliotecas de células o bancos de células comprenden vasos tales como una pluralidad de tubos que contienen células y similares que tienen diferentes características genéticas. Dichas células también pueden estar congeladas. Por ejemplo, cuando se trasplanta un tejido o un órgano a un sujeto o se requiere la regeneración del mismo, se seleccionan las células apropiadas en términos de fondo genético o similares del sujeto de la biblioteca de células o banco de células anterior. Por tanto, el trasplante o la regeneración de terapia puede realizarse usando las células.

La presente divulgación abarca un procedimiento terapéutico, que comprende administrar, para tratamiento de una enfermedad, una dosis terapéuticamente eficaz de las células madre pluripotentes, una fracción de células de las mismas de la presente invención, o células derivadas o inducidas a partir de dichas células a un paciente que necesita tratamiento. La dosis eficaz puede especificarse basándose en la cantidad de células a administrar, por ejemplo, y se determina apropiadamente dependiendo de los tipos de enfermedad o la gravedad. En el procedimiento terapéutico anterior, las células madre pluripotentes de la presente invención no forman ningún teratoma, de modo que no se forma teratoma en un paciente. Además, cuando se administran células Muse derivadas de células autólogas, no hay necesidad de causar disfunción de la médula ósea sometiendo al paciente a una exposición a la radiación, quimioterapia o similares. Cuando se usan células Muse que no son células autólogas, se realiza el tratamiento anterior.

Además, las células Muse pueden ser una fuente de células iPS (células madre pluripotentes inducidas). La eficacia para la preparación de células iPS usando células Muse como fuente es mucho mayor (aproximadamente mayor en 25 o más veces) que la de un caso de uso de otro tipo de células (por ejemplo, fibroblastos dérmicos no fraccionados usando la expresión de SSEA-3 como índice) como fuente.

Las células iPS pueden prepararse introduciendo un gen específico o un compuesto específico en las células Muse para alterar los citoplasmas. Las alteraciones de los citoplasmas incluyen reprogramación y formación de cáncer, para los que pueden emplearse los procedimientos actualmente conocidos o todos los procedimientos que quedaran establecidos en el futuro.

Por ejemplo, se introduce un gen en células Muse de acuerdo con la descripción de la patente JP n.º 4182742 o la descripción de la figura 27, de modo que pueden establecerse células iPS a partir de células Muse. Además, adicionalmente al procedimiento descrito en la figura 27, puede decirse que las células iPS pueden establecerse a través de la introducción de una sustancia química, un gen foráneo o una proteína foránea. El establecimiento de células iPS a partir de células Muse puede realizarse por procedimientos descritos en los ejemplos descritos posteriormente, por ejemplo.

Las células iPS obtenidas como se describe anteriormente de células Muse también pueden mencionarse como "células iPS derivadas de Muse (Muse iPSC)". La presente divulgación abarca dichas células iPS derivadas de Muse. Puede decirse que las células iPS derivadas de Muse son células madre pluripotentes que tienen la capacidad proliferativa derivada de células Muse.

A continuación en el presente documento, se describe en mayor detalle la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no está limitada a estos ejemplos. Ejemplo 1 Preparación y caracterización de fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M

Materiales y procedimientos

Se usan las siguientes células en los ejemplos.

Se usaron dos cepas de fracciones de fibroblastos dérmicos humanos (fibroblastos H) y cuatro cepas de fracciones de MSC (células del estroma de médula ósea) humana (fracciones H-MSC) como células mesenquimáticas. Las fracciones de fibroblastos humanos fueron (1) fibroblasto H 1 (células de fibroblastos humanos normales (NHDF), Lonza) y (2) fibroblasto H 2 (fibroblastos dérmicos humanos adultos (HDFA, ScienCell, Carlsbad, CA)). Las fracciones MSC humanas, H-MSC-1, 2 y 3 se obtuvieron de Lonza, y H-MSC 4 se obtuvo de ALLCELLS. Las fracciones de MSC humanas se describen específicamente en Pittenger, M. F. y col. Science 284, 143-147 (1999); Dezawa, M. y col. J Clin Invest 113, 1701-1710 (2004); y Dezawa, M. y col. Science 309, 314-317 (2005).

Las células se cultivaron a 37 °C en α -MEM (medio esencial mínimo alfa) que contiene FBS al 10 % y 0,1 mg/ml de kanamicina con CO₂ al 5 %. Las células cultivadas directamente después de su desplazamiento se consideraron el 1^{er} cultivo. Cuando las células alcanzaban una confluencia de un 95 %, las células se expandían a una relación de 1:2 (solución de cultivo celular: medio). En este estudio, se usaron las células del 4^o al 10^o subcultivo.

Las células ES humanas (hESC) usadas en el presente documento eran kyoto hESC-1 (KhES-1) obtenidas de Kyoto University.

Las células ES de ratón (TT2) y las células ES humanas (KhES-1) se mantuvieron en células de alimentación

embrionarias (MEF) de ratón establecidas a partir de embriones de 12,5 días de ratón C57BL/6.

Los experimentos se realizaron por los siguientes procedimientos.

5 1. Condiciones de estrés para células mesenquimáticas

Para realizar la exposición a condiciones extremas incluyendo cultivo en mala nutrición, el cultivo en bajas condiciones de suero, el cultivo en bajas condiciones de O₂, incubaciones repetitivas con tripsina e incubación prolongada con tripsina se emplearon las siguientes seis condiciones:

- 1) cultivo en medio que no contiene suero (STEMPRO MSC SFM, Invitrogen) durante 2 días (sin suero);
- 2) cultivo en tampón de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Invitrogen) durante 2 días (HBSS);
- 3) cultivo en FBS al 10 % en α -MEM combinado con bajo contenido de O₂ (1 % de O₂) durante 2 días (10 % de FBS + bajo O₂);
- 4) tres incubaciones consecutivas de 1 h (un total de 3 horas de incubación con tripsina) (Try 3x1 h) en tripsina (tripsina al 0,25 %-HBSS);
- 5) incubación prolongada con tripsina (LTT) durante 8 h (LTT 8 h); y
- 6) LTT durante 16 h (LTT 16 h).

Para los controles negativos, se usaron fracciones de células mononucleares periféricas humanas.

Para las condiciones 4), 5) y 6), se suspendieron aproximadamente 1×10^5 a 5×10^5 en 5 ml de solución de tripsina y se incubaron. Las células de las condiciones extremas 1) a 3) se recogieron por una incubación con tripsina de 5 min y las células de las condiciones extremas 4) a 6) se transfirieron directamente a tubos.

Se alteraron grandes cantidades de células muertas resultantes de las condiciones extremas por agitación con vórtice. Específicamente, se transfirieron 5 ml de medio que contenía un máximo de 500 000 células en tubo Falcon de 15 ml, seguido por 3 min de agitación con vórtice a 1800-2200 r.p.m./min usando una mezcladora con vórtice (IKA Works, Inc.). La centrifugación se realizó a 2000 r.p.m. durante 15 min, para retirar el sobrenadante. La eficacia de la recogida de células vivas después de la agitación con vórtice variaba de aproximadamente un 10 % a un 80 %.

2. Cultivo MC

En los ejemplos, las células se sometieron a cultivo en suspensión en medio que contiene metilcelulosa. El cultivo en medio que contiene metilcelulosa se menciona como "cultivo MC". El cultivo MC es como se describe en Nakahata, T. y col., Blood 60, 352-361 (1982).

Las placas de cultivo se recubrieron primero con poli-HEMA (poli(2-hidroxietil metacrilato)) para evitar la adhesión de células al fondo de la placa. En resumen, se disolvieron 600 mg de poli-HEMA (SIGMA) en 40 ml de EtOH al 95 % agitando a 37 °C, se añadieron a la placa (por ejemplo, 40 μ l/pocillo para una placa de cultivo de 96 pocillos y 200 μ l/pocillo para una placa de cultivo de 12 pocillos) y la placa se secó al aire durante una noche.

El MC (MethoCult H4100, StemCell Technologies) se suspendió en FBS al 20 % + α -MEM hasta una concentración final del 2 %. La concentración celular en el medio MC semisólido se ajustó a 8×10^3 células/mililitro a esta concentración, de modo que la distancia de una célula a otra fuera suficientemente grande para minimizar la agregación de las células. Las células y el medio MC se mezclaron minuciosamente por pipeteo suave, y la mezcla se transfirió a una placa recubierta con poli-HEMA. Para evitar el secado, se añadió suavemente un volumen igual a una décima parte de cultivo MC inicial de FBS al 10 % en α -MEM a la placa cada 3 días.

Los grupos de células (mencionados como grupo de células de tipo cuerpo embrioide derivadas de células Muse = grupos M ya que estos grupos de células eran grupos de las células madre pluripotentes, células Muse, de la presente invención) se clonaron en el día 7. Se añadió PBS 0,01 M al medio, las células se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 20 min y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces para lavar las células. El sedimento celular recogido se suspendió finamente en 10 μ l de PBS 0,01 M que contenía azul tripano, se aplicó a un portaobjetos de vidrio y se tomaron imágenes automáticamente del área completa usando microscopia de contraste de fases. Solamente los grupos multicelulares mayores de 25 μ m que eran negativos para azul tripano y tenían un aspecto similar a las células hES se contaron como grupos M. La frecuencia de formación de grupos M se calculó como la cantidad de grupos M dividida por la cantidad de todas las células vivas (todas las células negativas a azul tripano). Como la determinación de la cantidad precisa de células en cada grupo M era difícil, cada agregado se contó como una célula, independientemente de su tamaño.

Para preparar grupos de células a partir de células hES, se aislaron cuidadosamente de las células de alimentación para no incluir las células de alimentación, se transfirieron a cultivo MC como se describe anteriormente, y se tomaron imágenes por microscopia de contraste de fases en el día 3 de cultivo.

3. Cultivo en suspensión de células individuales

Se recubrió una placa de 96 pocillos con poli-HEMA como se describe anteriormente. Después de una dilución limitante de las células con FBS al 10 % en α -MEM, se sembraron células individuales en cada pocillo. Después de la siembra en placa, se determinó la cantidad real de células depositadas en cada pocillo por inspección visual usando un microscopio de contraste de fases. Los pocillos vacíos o pocillos con más de una célula se marcaron y se excluyeron del análisis. El cálculo de formación de grupos M se realizó en el día 10 de cultivo. La frecuencia de formación de grupos M se calculó a partir de 3 experimentos para cada cepa con un mínimo de 250 pocillos por experimento.

4. Tinción con fosfatasa alcalina

Los grupos M de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC se lavaron varias veces con un volumen suficiente de solución salina. La tinción se realizó usando el kit de fosfatasa alcalina de leucocitos (Sigma).

5. Diferenciación *in vitro* de grupos M

Después de 7 a 10 días de cultivo MC o cultivo en suspensión de células individuales, los grupos M individuales de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC se recogieron con una micropipeta de vidrio y se transfirieron a una placa de cultivo o cubreobjetos de vidrio recubierto con gelatina. Después de otros 7 días de incubación, las células se dispersaron de los grupos de células. Las células se sometieron a análisis inmunohistoquímicos y de RT-PCR para determinar la presencia o ausencia de diferenciación de las células.

6. Inmunohistoquímica

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS 0,01 M. Las fracciones de células enriquecidas en Muse y los grupos M ambos de fibroblastos H y fracciones de H-MSC se recogieron por centrifugación, se incluyeron en compuesto OCT y se cortaron en criosecciones de 8 μ m de grosor. Los grupos de células se fijaron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con gelatina y después se sometieron a análisis inmunohistoquímico.

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios contra: Nanog (1:500, Chemicon), Oct3/4 (1:800, proporcionado amablemente por el Dr. H. Hamada, Osaka University, Japón), Sox2 (1:1000, Abcam), PAR4 (1:100, Santa Cruz), SSEA-3 (1:20, DSHB), actina de músculo liso (1:100, Lab Vision), neurofilamento M (1:200, Chemicon), α -fetoproteína (1:100, DAKO), Numblake de ratón (1:500, proporcionado amablemente por el Dr. Yuh-Nung Jan, University of California San Francisco) y colágeno de tipo 1 (1:20, Southern Biotech). Se usaron anticuerpos anti-IgG de conejo, anti-IgG de ratón o anti-IgM de ratón conjugados con Alexa 488 o Alexa 568 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) como anticuerpos secundarios para análisis inmunohistoquímicos. 7.

Determinación de cariotipos

Los cariotipos de las células expandidas de forma clonal a partir de grupos M (obtenidos a través de repetición (1 a 3 veces) de un ciclo de recogida de células individuales de grupos M y después causando que las células formen grupos de células nuevamente) tanto de fracciones de fibroblastos H como de fracciones H-MSC se determinaron por tinción con quinacrina-Hoechst.

8. Inyección de células en los testículos de ratones inmunodeficientes

Se usaron fracciones de células vírgenes y fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M tanto de fracciones de fibroblastos H como de fracciones H-MSC. Las fracciones de células enriquecidas en Muse se prepararon añadiendo suero a las células después de LTT y seguido por tres lavados con PBS 0,01 M. Los grupos M se recogieron de grupos MC y también se lavaron tres veces con PBS. Se suspendieron 1×10^5 células en PBS y se inyectaron usando microtubos de vidrio en los testículos de ratones NOG (marca registrada, ratón NOD/Shi-scid, IL-2RyKO Jic, 8 semanas de edad, International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) Monitoring Center Japón). El volumen promedio de las células en los grupos M se midió usando el software de análisis gráfico 3D proporcionado con el microscopio confocal láser (se midieron 50 grupos M y los volúmenes totales de los grupos se dividieron por el número de núcleos), que produjo $1,5 \times 10^5$ células por 1 μ l de volumen de sedimento de grupos M recogido. A cada testículo de un ratón NOG se le inyectó entonces el volumen correspondiente a 1×10^5 células y los ratones se sometieron al experimento para el análisis 6 meses después de la inyección.

Como controles, se inyectaron 1×10^6 células ES de ratón (para el control positivo, n=3) y células MEF tratadas con mitomicina C (células de alimentación embrionarias de ratón para el control negativo, n=3) en testículos de ratones SCID y los ratones se sometieron al experimento 8 semanas después de la inyección.

9. Análisis de alta resolución de células por microscopía óptica

Se observaron células Muse y grupos M de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC usando un microscopio

óptico de alta resolución para los tipos de células tales como MSC humanas, fibroblastos y células neuronales.

10. Seccionamiento ultrafino por microscopia electrónica

- 5 Se centrifugaron grupos M, células SSEA-3(+) y SSEA-3(-) tanto de fracciones de fibroblastos H como de fracciones H-MSC, así como grupos de células formados por células hES. Los sedimentos se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato 100 mM (pH 7,2) durante 30 min. Las muestras fijas se incluyeron en agar al 1 %. Las muestras incluidas se recortaron a 1 mm³, se lavaron con PBS y se tiñeron con OsO₄ al 2 % en tampón fosfato 100 mM (pH 7,2) durante 10 minutos a 4 °C. Las muestras se lavaron con agua destilada y después se tiñeron con 5
10 gotas de acetato de uranilo al 2 % (UA) durante 20 minutos a 4 °C. Después del lavado con agua destilada, las muestras teñidas se deshidrataron gradualmente con etanol al 50 %, al 70 % y al 90 % durante 10 min cada uno a 4 °C y después se deshidrataron completamente con tres intercambios de etanol al 100 %. Las muestras se incubaron con óxido de propileno durante 5 min (para el intercambio) y se incluyeron en resina epoxi al 50 % en óxido de propileno durante 60 min, seguido por inclusión en resina epoxi al 100 % y endurecimiento a 60 °C durante
15 una noche. Las secciones ultrafinas se cortaron con un grosor de 70-80 nm y se observaron en un microscopio electrónico de 100 kV usando una cámara CCD.

11. Tasa de crecimiento de los grupos M

- 20 Para calcular el tiempo de duplicación de la población para células en los grupos M tanto de fracciones de fibroblastos H como de fracciones H-MSC, los grupos se transfirieron cada uno a placas de 96 pocillos y se trataron con tripsina durante 15 min, seguido por pipeteo con una micropipeta de vidrio. Se contó la cantidad de células en cada pocillo. Se analizaron al menos 20-30 grupos M en puntos temporales predeterminados (día 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13 y 14).

25 12. RT-PCR

- Se usaron fracciones de células vírgenes (aproximadamente 10 000 células por pocillo de una placa de 24 pocillos) y células diferenciadas *in vitro* de grupos M individuales (de 1 a 3 ciclos) tanto de fracciones de fibroblastos H como de fracciones H-MSC (aproximadamente 10 000 células por pocillos de una placa de 24 pocillos). Se extrajo el ARN total y se purificó usando NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel). Se generó el ADNc de primera hebra usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron usando cebadores apropiados diseñados y la ADN polimerasa Ex Taq (TaKaRa Bio Inc.). Los cebadores usados fueron de la siguiente manera.

- 35 Se extrajo el ARN total y se purificó usando NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel). Se generó el ADNc de primera hebra usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron usando cebadores apropiados diseñados y la ADN polimerasa Ex Taq (TaKaRa Bio Inc.). Como controles positivos, se usó hígado fetal humano (Clontech) para cebadores de α -fetoproteína y se usaron embriones completos humanos para otros.

40 13. PCR cuantitativa (Q-PCR)

- Se recogió el ARN total de fracciones de células vírgenes, fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M de fibroblastos H 1, fibroblastos H 2, H-MSC-1 y H-MSC-2 usando el kit RNeasy Mini (Qiagen GmbH) y se sintetizó el ADNc usando el kit de primera hebra RT² (SA Biosciences). Se adquirieron cebadores personalizados de SA Biosciences y se amplificó el ADN por PCR cuantitativa con el sistema de PCR a tiempo real 7300 (Applied Biosystems). Los datos se procesaron usando el procedimiento $\Delta\Delta C_T$ (Livak KJ y col., Methods 25: 402-408, 2001).

50 14. Análisis de micromatriz de ADN

- Se usaron fracciones de células vírgenes, fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M de fibroblastos H 1, fibroblastos H 2, H-MSC-1 y H-MSC-2, así como la mezcla de células mononucleares periféricas humanas obtenidas de 4 voluntarios sanos. Se recogió el ARN total usando el kit RNeasy Mini (Qiagen) y se analizó por micromatriz de ADN (TaKaRa Bio Inc.). Las señales de la matriz se procesaron y normalizaron usando el software Affymetrix Expression Console V1.1. Se usó Pathway Studio 6.0 (Ariadne Genomics) para asignar los genes expresados de forma diferencial a categorías funcionales en the Gene Ontology. Se realizó la agrupación jerárquica a una distancia euclidiana basada en genes expresados de forma diferencial con una agrupación de vinculación promedio por MeV4 (Saeed AI y col., Biotechniques 34(2): 374-378, 2003).

60 15. Detección de actividad telomerasa

- Se usaron fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC y células Hela. La actividad telomerasa se detectó usando el kit de detección de telomerasa TRAPEZE XL (Millipore) y la polimerasa Ex Taq (TaKaRa Bio Inc.). Se midió la intensidad de la fluorescencia con un lector de microplaca (Tecan).

16. Secuenciación con bisulfito

El ADN genómico (1 µg) de fracciones de células vírgenes, fracciones de células enriquecidas en Muse o grupos M de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC se trató usando el kit de modificación de ADN CpGenome (Chemicon). El ADN se purificó usando una columna QIAquick (Qiagen). Las regiones promotoras de los genes humanos Oct3/4 y Nanog se amplificaron por PCR y después los productos de PCR se subclonaron en pCR2.1-TOPO. Se verificaron hasta 10 clones de cada muestra por secuenciación usando cebadores universales M13, de modo que se detectó la metilación en cada región promotora. Los cebadores descritos en Shimazaki T y col., EMBO J, 12:4489-4498, 1993 se usaron para la amplificación por PCR.

17. Formación de grupos M a partir de aspirados de médula ósea humana

Se adquirieron tres aspirados de médula ósea humana de donantes sanos de ALLCELLS. Se recogieron las fracciones de células mononucleares usando el Lymphoprep Tube (Axis-Shield PoC AS) y se sometieron a cultivo MC directamente (sin incubación con tripsina) o después de LTT durante 8 h como se describe anteriormente. Los grupos M se contaron en el día 7.

18. Clasificación MACS

Las fracciones de células mononucleares de aspirados de médula ósea humana de tres donantes sanos (ALLCELLS) primero se hicieron reaccionar con microperlas conjugadas con anticuerpo anti-CD105 y se clasificaron usando columnas MS (Miltenyi Biotech). Las células CD105(+) se recogieron como fracción 1 (población de células mesenquimáticas). Las células CD105(-) se incubaron con una mezcla de anticuerpos anti-CD34 y anti-CD117 conjugados a microperlas y se clasificaron de nuevo para obtener células CD34(+)/CD117(+) (fracción 2 correspondiente a una población de células madre hematopoyéticas) y células CD105(-)/CD34(-)/CD117(-) (fracción 3) (figura 4). Las muestras así recogidas se sometieron a LTT durante 8 h y después se determinó la formación de grupos M.

19. Inmunohistoquímica

Se fijaron testículos de ratón con paraformaldehído al 4 % en PBS 0,02 M y se usó un criostato para cortar secciones de 10 µm de grosos. Las muestras se lavaron con PBS 0,02 M, se incubaron con tampón que contenía BlockAce al 20 % (Yukijirushi) para el bloqueo y después se incubaron con anticuerpos primarios para el análisis inmunohistoquímico. Los anticuerpos primarios usados fueron: anticuerpo contra actina de músculo liso (1: 200, Lab Vision), anticuerpo anti-MAP-2 (1: 200, Biogenesis) y anticuerpo anti-α-fetoproteína (1: 10, DAKO).

Se incubaron anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con Alexa 488 o Alexa 568 y anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con Alexa 568 usados como anticuerpos secundarios en presencia de DAPI. Las muestras se inspeccionaron con un sistema de microscopio confocal C1 si Nikon (Nikon Corporation).

20. Citometría de flujo y clasificación de células

Las células se incubaron con anticuerpos marcados con ficoeritrina contra CD11c, CD29, CD34, CD44, CD45, CD49f, CD54, CD71, CD90, CD105, CD166, CD271 o vWF (Becton Dickinson) o con anticuerpos anti-SSEA-3 (Millipore). En el caso de marcaje con el anticuerpo anti-SSEA-3, las células se incubaron adicionalmente con anticuerpos anti-IgM de rata conjugados con FITC. Se usó PBS 0,02 M sin calcio y magnesio complementado con EDTA 2 mM y soroalbúmina bovina al 0,5 % como diluyentes de anticuerpo FACS. Los datos se adquirieron y analizaron usando FACSCalibur (Becton Dickinson) y el software CellQuest o usando FACSaria y el software DIA. Para la clasificación de células, las células se incubaron con anticuerpo anti SSEA-3 en los diluyentes de anticuerpo FACS y se clasificaron por FACSaria (Becton Dickinson) usando una velocidad baja de corriente y en el modo de clasificación de pureza de 4 direcciones.

21. Análisis estadístico

Los datos se expresan con el promedio ± ETM. Los datos se compararon mediante comparación por parejas de acuerdo con el procedimiento de Bonferroni usando ANOVA.

Resultados

A. Condiciones extremas para fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC

Los ejemplos de los resultados de exposición de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC a condiciones extremas se muestran en la tabla 1.

Después de exponer las células a condiciones extremas y agitar con vórtice, se usó tinción con azul tripano para contar la cantidad de células vivas, a partir de lo cual se calculó la tasa de supervivencia. Las células supervivientes

se recogieron y cultivaron en cultivo MC durante 7 días. Las condiciones extremas 2) produjeron una gran cantidad de células muertas y una baja eficacia para recoger células supervivientes. Por lo tanto, no fue posible determinar de forma precisa la cantidad de grupos M formados y la cantidad de grupos M para las condiciones extremas 2) se indica, por tanto, como ND (no determinado) en la tabla 1.

Entre las 6 condiciones extremas ensayadas, la incubación con tripsina durante 16 h fue la más eficaz para las fracciones de fibroblastos H y la incubación con tripsina durante 8 h para las fracciones H-MSC. Cuando se repitió este experimento usando dos cepas de fracciones de fibroblastos H y cuatro cepas de fracciones H-MSC, se observó la misma tendencia. Los grupos M no pudieron reconocerse en el control negativo usando células mononucleares periféricas humanas. Los ejemplos de valores observados típicos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.

Tasas de supervivencia después de exposición a condiciones extremas y formación de grupos M en cultivo MC en fibroblastos H, H-MSC y células mononucleares periféricas humanas.				
Fibroblastos H 1				
		Número inicial de células	Supervivencia después de sobrecarga (%)	Formación de grupos de células en cultivo MC (>25 µm) (% a las células supervivientes)
1	Sin suero	30 000	75	7
2	HBSS	2 000 000	6	ND
3	FBS al 10 % + O ₂ bajo	30 000	99	8
4	Trip 3x1 h	2 000 000	0,3	6
5	LTT 8 h	2 000 000	1	15
6	LTT 16 h	500 000	5	20
H-MSC-1				
1	Sin suero	30 000	44	5
2	HBSS	2 000 000	2	ND
3	FBS al 10 % + O ₂ bajo	300 000	99	8
4	Trip 3x1 h	380 000	0,9	9
5	LTT 8 h	380 000	10	21
6	LTT 16 h	500 000	3	14
Células mononucleares periféricas humanas				
5	LTT 8 h	300 000	2	0
6	LTT 16 h	300 000	1	0

ND (no determinado): No pudieron calcularse los grupos M de forma precisa, porque la fracción final contenía una gran cantidad de células muertas y la eficacia para recoger células supervivientes fue baja.

Entre las 6 condiciones extremas ensayadas, la incubación con tripsina durante 16 h (fracciones de fibroblastos H) y la incubación con tripsina durante 8 h (fracciones H-MSC) fueron las más eficaces para la formación de grupos M. Una serie de procedimientos, incluyendo incubación con tripsina durante 16 h u 8 h seguida por agitación con vórtice a 1800-2200 r.p.m./min durante 3 min y centrifugación a 2000 r.p.m. durante 15 min., se denominó "incubación prolongada con tripsina (LTT)" y se usó para el enriquecimiento de células Muse. La eficacia de recogida de células vivas después de la agitación con vórtice varió de aproximadamente un 70 % a un 80 % (figura 5).

B. Criterios para grupos M

En los ejemplos, se establecieron los criterios para los grupos M. El diámetro promedio de células individuales en fracciones de células enriquecidas en Muse tanto de fracciones de fibroblastos H como de fracciones H-MSC fue 10-13 µm (figura 6a). Cuando estas células se transfirieron a cultivo MC, las células empezaron a dividirse. El tamaño de las células individuales se hizo más pequeño después de la división celular, y los grupos multicelulares de formación gradual comprendían células de 8-10 µm de diámetro (figuras 7e y 7f). El tamaño y el aspecto de las células fueron similares a los de células ES humanas sometidas a cultivo MC (figuras 6b y 6c). En el día 7, la mayoría de los grupos multicelulares se hicieron más grandes de 25 µm, teniendo un diámetro de 100-150 µm. Los grupos de células tenían un aspecto muy similar a los grupos de células formados por células ES. Los grupos de células mayores de 25 µm se recogieron usando filtros de Φ25 µm (figura 6b) y después se analizaron (hasta 100 grupos M de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC) por inmunocitoquímica. La mayoría de los grupos M eran positivos para los marcadores de pluripotencia Nanog, Oct3/4, Sox2, PAR4 y SSEA-3 y también positivos para tinción por fosfatasa alcalina (figura 6e g). Los marcadores de pluripotencia pudieron detectarse o no detectarse en grupos de células más pequeños de 25 µm, pero su localización a veces era atípica y el aspecto de las células era más similar al de las células en fracciones de células enriquecidas en Muse.

Basándose en estos hallazgos, solamente los grupos multicelulares mayores de 25 µm de diámetro se contaron como grupos M.

C. Análisis de grupos de células generados a partir de fracciones de células mesenquimáticas humanas

Es bien sabido que las células madre de tejido latente se activan cuando el tejido se expone a sobrecarga, cargas o daños. En los ejemplos, se expusieron fracciones H-MSC y fracciones de fibroblastos H a condiciones extremas por diversos procedimientos. Específicamente, las condiciones extremas ensayadas fueron: tratamiento con medio sin suero; tratamiento con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS); tratamiento con baja concentración de O₂; e incubación prolongada con tripsina (LTT) durante un total de 3, 8 o 16 horas. Las células que habían sobrevivido a las condiciones extremas se recogieron y después se suspendieron en medio que contenía metilcelulosa (MC) (mencionado como cultivo MC), seguido por 7 días de cultivo MC a una densidad de 8000 células/ml (figura 7-1d). Cada condición dio lugar a grupos de células con tamaños de hasta 150 µm de diámetro (figuras 7-1e y f). La figura 7-1c muestra cultivo MC de fracciones de fibroblastos H 1 en el día 0. La figura 7-1d muestra cultivo MC de las mismas en el día 7. La formación de la mayor cantidad de grupos de células se observó en fracciones de fibroblastos H sometidos a LTT de 16 h y en fracciones H-MSC sometidas a LTT de 8 h. Las figuras 7-1e y f muestran grupos de células (grupos M) formados a partir de fracciones de fibroblastos H 1. La figura 7-1e muestra el cultivo MC en el día 7 y la figura 7-1f muestra el cultivo en suspensión de células individuales en el día 10. Los grupos de células se clasificaron usando filtros con diferentes tamaños de poro de acuerdo con su tamaño, de modo que se realizó análisis inmunocitoquímico. Los grupos de células con un diámetro mayor de 25 µm contenían células positivas para los marcadores de células madre pluripotentes Nanog, Oct3/4, SSEA-3, PAR-4 y Sox2 (figuras 7-2g-l) y positivas para tinción con fosfatasa alcalina (figuras 7-3m-o). La microscopía electrónica reveló que los grupos de células generados a partir de fracciones de fibroblasto H y fracciones H-MSC tenían las mismas características que los grupos formados por células ES. Las células mostraron una relación de núcleo/citoplasma similar, menos orgánulos y presencia de uno o dos nucléolos grandes en el núcleo (figuras 7-4p-r).

Se encontraron células capaces de formar grupos de células positivas para marcadores de pluripotencia y tinción con fosfatasa alcalina por cultivo en suspensión a partir de fracciones H-MSC y fracciones de fibroblastos H de un organismo vivo. Los presentes inventores llamaron a estas células "células Muse" (multilineage differentiating stress enduring cells - células resistentes a sobrecarga que se diferencian en múltiples linajes). Las poblaciones de células formadas a partir de fracciones de fibroblastos H sometidas a LTT de 16 h y fracciones H-MSC sometidas a LTT de 8 h se mencionan como "fracciones de células enriquecidas en Muse" (poblaciones de células enriquecidas en Muse). Las células individuales obtenidas de las poblaciones de células se sometieron a cultivo en suspensión. Se observó formación de grupos M en el 9 %-10 % de las fracciones de células enriquecidas en Muse. Esto indica que las fracciones de células enriquecidas en Muse contenían aproximadamente un 9 %-10 % de células Muse.

Se examinó el crecimiento de células Muse aisladas. Las células empezaron a dividirse después de 1 2 días en cultivo MC y se mantuvieron dividiéndose en una tasa de aproximadamente 1,3 días/división celular hasta el día 10 (figura 8-2). Sin embargo, el crecimiento celular se ralentizó gradualmente en los días 11-12 y se detuvo en aproximadamente el día 14, con grupos de células que alcanzaron un tamaño máximo de 150 µm de diámetro. Cuando los grupos M formados se disociaron directamente en células individuales por una incubación con tripsina de 5 min y se devolvieron al cultivo en suspensión de células individuales, las células permanecieron vivas, pero se dividían muy lentamente (5-7 días/división celular) o a veces en nada en absoluto (figura 8-1 (1)). Por tanto, una vez se ha limitado su proliferación (o una vez se ha disminuido su tasa de crecimiento), las células Muse no vuelven a acelerar su proliferación siempre que se mantengan en cultivo en suspensión. Sin embargo, la transferencia de grupos M individuales a cultivo adherente reiniciaba la proliferación celular. Después de 5-7 días, cuando las poblaciones de células a escala relativamente pequeña, a una fase de 3000 a 5000 células, se disociaban en 5 minutos de incubación con tripsina y se sometían a cultivo MC, el 40 % de las células formaban nuevos grupos de células (figura 8-1 (2)). Cuando se permitía que las poblaciones de células expandidas de forma clonal alcanzaran una escala de aproximadamente 5-10x10⁴ células y después se sometían a LTT para producir células Muse (2^o ciclo) de nuevo, casi el 10 % de estas células formaba grupos M (figura 8-1). Este ciclo de cultivo se repitió cinco veces, que consistía en LTT cultivo en suspensión cultivo adherente, de modo que cada generación de células mostraba el comportamiento similar y frecuencia de la formación de grupos M. Los grupos M de 5.^a generación (en el 5.^o ciclo) aún eran positivos par marcadores de pluripotencia y tinción con fosfatasa alcalina.

Para confirmar que estos fenómenos no se debían a células anómalas que habían experimentado mutación o similares, se determinaron los cariotipos de las células. Los cariotipos de la mayoría de las células expandidas de forma clonal a partir de grupos M eran normales y no mostraban anomalías cromosómicas detectables (figura 8-3). Estos resultados demuestran que los fenómenos se producían por células normales.

Estos resultados demuestran la capacidad de las células Muse de autorrenovación y expansión clonal. Las células Muse crecen a través de la serie del ciclo, "células Muse - grupos M - expansión clonal". Podría ser posible obtener grandes cantidades de células Muse a partir de poblaciones de células mesenquimáticas.

D. Diferenciación de grupos M en las tres capas germinales

Para confirmar la capacidad de diferenciación, se transfirieron grupos M individuales a placas recubiertas con gelatina y se analizaron para la diferenciación. En el día 7, se detectaron α actina de músculo liso (marcador mesodérmico), desmina (marcador mesodérmico), neurofilamento M (marcador ectodérmico), α -fetoproteína (marcador endodérmico) o citoqueratina 7 (marcador endodérmico) (figura 9-1a-c). La RT-PCR confirmó que los grupos M de 1.^a y 3.^a generación (1.^o a 3.^{er} ciclo) expresaban α -fetoproteína y GATA6 (marcador endodérmico), proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) (marcador ectodérmico) y Nkx2.5 (marcador mesodérmico) mientras que no se observaba diferenciación en fibroblastos H vírgenes o poblaciones MSC cultivadas en placas recubiertas con gelatina (figura 9-2).

Las fracciones de células enriquecidas en Muse, los grupos M o las células ES se inyectaron en los testículos de ratones inmunodeficientes, para confirmar la formación de teratoma (figura 9-3e). El examen histológico de los testículos reveló que en 8 semanas todos los ratones a los que se habían inyectado células ES desarrollaban teratomas. Sin embargo, las células humanas trasplantadas restantes y la diferenciación en diversas especies de células se detectaron en los testículos de 10 de 13 ratones a los que se habían inyectado fracciones de células enriquecidas en Muse y 10 de 11 ratones a los que se habían inyectado grupos M como se muestra en la figura 9-3e. La formación de teratoma nunca se detectó hasta al menos 6 meses en los grupos a los que se habían trasplantado fracciones de células enriquecidas en células Muse o grupos M. Las células humanas trasplantadas se marcaron con un anticuerpo antimitocondria humana. Simultáneamente se confirmó que estas células expresan marcadores ectodérmicos (neurofilamento), endodérmicos (α -fetoproteína) y mesodérmicos (actina de músculo liso) (figura 9-3f-i).

Estos datos sugieren que las células Muse derivadas de la fracción de fibroblastos H y derivadas de la fracción H-MSC, y los grupos M con capaces de diferenciarse en las 3 capas germinales tanto *in vitro* como *in vivo*.

E. PCR cuantitativa

La expresión de marcadores respecto al estado de pluripotencia y diferenciación se muestra en la figura 10. Los niveles de expresión de Nanog no eran tan altos en fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos de células, en comparación con células vírgenes. Algunas células madre pluripotentes no expresaban Nanog a altos niveles (Chou YF y col., Cell 135, 449-461 (2008)); Bui HT y col., Development. 135(23):3935-3945 (2008)). De forma similar a Nanog, Oct-4 se expresaba a un bajo nivel en células somáticas de reprogramación en comparación con células ES de ratón, como se determina por Q-PCR (Bui HT y col., Development. 135(23): 3935-3945 (2008)). Por lo tanto, los niveles de expresión de Nanog y otros marcadores de pluripotencia no son tan importantes para pluripotencia.

F. Expresión génica de fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M

Usando PCR cuantitativa se descubrió que algunos marcadores de pluripotencia y un estado de células indiferenciadas estaban regulados por incremento en diversos grados tanto en fracciones de células enriquecidas en Muse como en grupos M. Las fracciones de células enriquecidas en Muse simplemente contenían un 9 %-10 % de células Muse como se describe anteriormente. Sin embargo, en comparación con las fracciones de células vírgenes, los genes mostraban tendencia de regulación por incremento de mayor grado o moderada en fracciones de células enriquecidas en Muse: Rex1 (ZFP42), Sox2, KLF-4, c-Myc, DPPA2 (asociado a pluripotencia en el desarrollo 2), ERAS, GRB7 (proteína 7 de unión al receptor del factor de crecimiento), SPAG9 (antígeno 9 asociado a esperma) y TDGF1 (factor 1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma). Los genes que mostraron tendencia de regulación por incremento de mayor grado o moderada en grupos M fueron: DAZL (de tipo azoospermia), DDX4 (VASA), DPPA4 (asociado a pluripotencia en el desarrollo 4), Stella, Hoxbl, PRDM1 y SPRY2 (homólogo 2 de sprouty) (figura 10a) en comparación con células vírgenes.

La expresión génica global en fracciones de células vírgenes derivadas de la fracción de fibroblastos H y la fracción H-MSC, las fracciones de células enriquecidas en Muse y los grupos M se compararon con la de una fracción de células mononucleares periféricas humanas como control. Como resultado, se observaron fluctuaciones en los patrones de expresión de algunos genes en las fracciones de células vírgenes, fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M (figura 10a).

Las fracciones de células enriquecidas en Muse y los grupos M mostraron baja actividad telomerasa, lo que sugiere que la actividad telomerasa no está muy relacionada con la actividad de proliferación de las células Muse (figura 10b).

G. Análisis en micromatriz de ADN de la expresión génica global

Se realizó análisis de correlación de Pearson de 108 sondas para células mononucleares de sangre periférica humana (como control negativo, fracciones de células vírgenes y las fracciones de células enriquecidas en Muse y grupos M de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC (figura 11).

Además, se recogieron receptores odoríferos y receptores de quimiocinas expresados por análisis en micromatriz de ADN.

H. Las células Muse existen *in vivo*

Los experimentos descritos hasta ahora se realizaron con células cultivadas estables, que pueden haber adquirido características que difieren de células *in situ* cuando se obtienen de un organismo adulto y después se cultivan. Por tanto, no puede negarse la posibilidad de que las células Muse o los grupos M sean productos de artefacto. Por lo tanto, se intentó obtener directamente grupos M de un organismo; es decir, células de médula ósea humana sin cultivo. Las fracciones de células mononucleares se aislaron de aspirados de médula ósea humana y se cultivaron directamente en MC (hBM-MC vírgenes) o se sometieron a LTT de 8 h antes del cultivo MC (hBM-MC de 8 h; la tasa de supervivencia de las células mononucleares después de LTT era de aproximadamente un 3,5 %). Después de 7 días, los cultivos se ensayaron para la formación de grupos M. hBM-MC de 8 h formó grupos M a una frecuencia de aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente 75 veces mayor que la de hBM-MC virgen (aproximadamente un 0,004 %) (figura 12a). Los grupos M eran positivos para tinción con fosfatasa alcalina (figura 12b). La RT-PCR de las células expandidas de forma clonal a partir de grupos M individuales tanto de hBM-MC virgen como de hBM-MC de 8 h mostró expresión de α -fetoproteína, GATA6, MAP-2 y Nkx2.5 (figura 13). Estos resultados demuestran que las células Muse existen *in vivo* en médula ósea humana, que pueden enriquecerse por LTT de 8 h y que pueden formar grupos M. También se confirmó que, entre muchos tipos de células en la médula ósea, la mayoría de las células Muse pertenecen a fracciones de células mesenquimáticas CD105(+).

Como se describe anteriormente, hBM-MC sin tratar formaba grupos M a una frecuencia extremadamente baja de aproximadamente un 0,004 % en fracciones de células mononucleares directamente aisladas del aspirado de médula ósea humana. Como es concebible que el cultivo de las células cambie la composición de la población de células, las células en cultivo estable pueden tener una propensión diferente a formar grupos M en comparación con células mononucleares vírgenes aisladas de la médula ósea. Para confirmar esta posibilidad, se cultivó un aspirado de médula ósea humana para recoger MSC primarias y después las células se sometieron directamente a cultivo MC. Este protocolo produjo una frecuencia mucho mayor de formación de grupos M de aproximadamente un 0,2 %. Cuando estas MSC primarias se cultivaban adicionalmente, hasta el 2º y el 5º subcultivo, la frecuencia de formación de grupos M aumentó en aproximadamente un 0,5 % y aproximadamente un 1,0 %, respectivamente, con respecto a las fracciones de células vírgenes. Coherente con este hallazgo, aproximadamente un 1,2 % de las fracciones de fibroblastos H vírgenes y las fracciones H-MSC formaban grupos M. Estos resultados sugieren que las células Muse tienen una alta tolerancia a la sobrecarga y pueden resistir el entorno de cultivo *in vitro* tal como procedimientos de subcultivo. Las fracciones de células subcultivadas estables mostraron, por tanto, una mayor frecuencia de formación de grupos M que las fracciones de células mononucleares aisladas directamente del aspirado de médula ósea.

La médula ósea contiene muchos tipos de células de células mononucleares incluyendo MSC, células de linaje hematopoyético y células endoteliales. Para determinar la fracción que contiene las células Muse, se aislaron fracciones de células mononucleares de un aspirado de médula ósea humana y después se sometieron directamente a clasificación MACS usando anticuerpos contra CD34, CD117 (marcadores para células hematopoyéticas) y CD105 (marcador para MSC). Las fracciones después se trataron con LTT de 8 h y las células se cultivaron en cultivo MC durante 7 días. Casi no se detectaron grupos M en la fracción CD34+/CD117+, pero la fracción CD34-/CD117-/CD105+ contenía 50 veces más grupos de células que la fracción CD34-/CD117-/CD105-. Este resultado sugiere que la mayoría de las células Muse pertenecen a la fracción de células mesenquimáticas CD105(+).

I. Clasificación MACS

Las tres fracciones de células mononucleares de médula ósea contenían los siguientes porcentajes de células totales: fracción 1 (fracción CD105+): 1,8 %; fracción 2 (fracción CD34+/CD117+): 8,5 %; y fracción 3 (fracción CD34-/CD117-/CD105-): 89,7 %. Las frecuencias de formación de grupos de células en las fracciones 1, 2 y 3 fueron de un 0,5 %, 0 % y 0,01 %, respectivamente. La formación de grupos de células en la fracción 1 era, por tanto, aproximadamente 50 veces mayor que la de la fracción 3.

J. Clasificación FACS

Como un ejemplo, se realizó clasificación FACS usando SSEA-3 como marcador.

Tanto para fibroblastos H como para H-MSC, se separaron las células SSEA-3(+) y SSEA-3(-) por clasificación FACS y se sometieron a cultivo en suspensión de células individuales. Aproximadamente un 50 %-60 % de las células SSEA-3(+) generaron grupos M, mientras que se formaron solamente unos pocos grupos M a partir de células SSEA-3(-).

K. Rasgos característicos de las células Muse

El análisis FACS reveló que las fracciones de fibroblastos H vírgenes y las fracciones H-MSC contenían fracciones positivas para CD44, CD49f, CD54, CD90 y CD105 expresados en células mesenquimáticas, pero eran negativas para CD11c, CD34, CD45, CD71, CD166, CD271 y el factor de von Willebrand (vWF). Las fracciones de células

enriquecidas en Muse contenían aproximadamente un 0,7 %-1,9 % de fracciones SSEA-3(+) (negativas para CD44 y CD54) (figura 14).

SSEA-3 es uno de los marcadores conocidos de pluripotencia. En fracciones de fibroblastos H vírgenes y fracciones H-MSC, la frecuencia de formación de grupos M (aproximadamente un 1,2 %) y la frecuencia de formación de fracciones de células enriquecidas en Muse (9 %-10 %) eran similares al porcentaje relevante de células SSEA-3(+) (fracción de células vírgenes: aproximadamente un 0,7 %-0,9 %; y fracción de células enriquecidas en Muse: 7 %-8,3 %). Dicho porcentaje de células SSEA-3(+) puede indicar un estado de células Muse. El análisis inmunohistoquímico reveló que el porcentaje (número) de células SSEA-3(+) en fracciones de fibroblastos H vírgenes y fracciones H-MSC era menor de un 1 %. Las células SSEA-3(+) entonces se clasificaron a partir de las fracciones de células enriquecidas en Muse derivadas de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC y después se sometieron a cultivo en suspensión de células individuales. Como resultado, un 50 %-60 % de las células SSEA-3(+) generó grupos M. Este resultado es aproximadamente 6-7 mayor que el de formación de grupos M en fracciones de células enriquecidas en células Muse y aproximadamente 60 veces mayor que el de formación de grupos M en fracciones de células vírgenes. Sin embargo, no se observó formación de grupos M en fracciones de células SSEA-3. (-). Cabe observar, en células expandida de forma clonal (3000 a 5000 células) a partir de un grupo de células individual derivado de fracciones de células SSEA-3(+) clasificadas por FACS, que aproximadamente el 45 % de las células eran SSEA-3(+) (figura 15-1a). Este hallazgo sugirió que estaba implicada la división celular asimétrica en la formación de grupos M y que esto también puede mencionarse en la expansión clonal de un grupo M individual. Realmente, existe Numblike (que se sabe que está implicado en la división celular asimétrica) en solamente una de las dos células hijas después de la división celular (figura 15-2b). Estos resultados sugieren que la división celular asimétrica está implicada en el crecimiento de células Muse.

La microscopia electrónica reveló la presencia de deformidades nucleares y vacuolas en el citoplasma en células SSEA-3(-) de fracciones de fibroblastos H y fracciones H-MSC clasificadas después de LTT, lo que indica daño celular. La microscopia electrónica no reveló diferencias morfológicas claramente reconocibles entre células SSEA-3(-) y SSEA-3(+) (figura 15-3c y d). SSEA-3(-)

La importancia de las células SSEA-3(+) también se demostró en los experimentos de trasplante. Cuando se trasplantaban fracciones de células SSEA-3(-), una cantidad muy pequeña de células eran positivas para los marcadores tisulares en comparación con el trasplante de fracción de células SSEA-3(+).

La mayoría de las células SSEA-3(+) en las fracciones de células enriquecidas en Muse expresaban tanto Oct3/4 como Sox2, que se detectaron en el citoplasma (figura 15-4e y g) y una cantidad muy pequeña de células los expresaba en el núcleo (figura 15-4f). Este resultado indica que SSEA-3 puede ser un buen marcador de células Muse. Por el contrario, en células de grupos M, Oct3/4 y Sox2 se localizaban predominantemente en el núcleo (figuras 7-2h y i). Es posible que esta diferencia en la localización intracelular de los dos marcadores refleje una diferencia en el estado de la célula.

Sigue existiendo la posibilidad de que las células Muse se induzcan de forma artificial por LTT. Como se describe anteriormente, la mayoría de las células Muse existen en la fracción de células CD105(+) de médula ósea. Además, las células SSEA-3(+) también mostraban propiedades de células Muse. Por lo tanto, se intentó obtener directamente células Muse de aspirados de médula ósea humana adulta aislándolas como células doblemente positivas a SSEA-3/CD105. Las células doblemente positivas, que constituían un 0,025 % a un 0,05 % de las células mononucleares derivadas de médula ósea, se sometieron directamente a cultivo en suspensión de células individuales sin LTT. Después de 7 días, un 11,4 % $\pm$ 61,2 % de las células (correspondiente a un 0,003 % hasta un 0,005 % de las células mononucleares) formaban grupos M, que eran ALP(+). Los grupos M individuales entonces se expandieron de nuevo por cultivo adherente hasta 3000 células y posteriormente se sometieron a cultivo en suspensión de células individuales. De estas células, un 33,5 % $\pm$ 3,1 % de las células formaban grupos M de 2.^a generación, y la RT-PCR de las células que se expandieron a partir de un grupo M individual en placas recubiertas con gelatina indicó la expresión de α -fetoproteína, GATA6, MAP-2 y Nkx2.5, lo que sugiere que las células con propiedades coherentes con las de las células Muse residen en médula ósea humana adulta.

Como se describe anteriormente, se eliminaron las células que no eran troncales por exposición a condiciones extremas, de modo que las células madre pudieran enriquecerse. Las células Muse pudieron recogerse de forma eficaz por el LTT y la siguiente clasificación de células SSEA-3(+). Las células Muse expresaban marcadores de pluripotencia, eran positivas para tinción con fosfatasa alcalina y formaban grupos M capaces de diferenciarse en células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas. Además, las células Muse no tienen características relacionadas con la proliferación tumorigénica ni la actividad telomerasa, según se revela por la medición de la tasa de crecimiento. Esto sugiere que las células Muse tienen un sistema de seguridad multiestratificado que evita una explosión en la proliferación. Dicha propiedad no tumorigénica de las células Muse también se confirmó por un experimento en el que se inyectaron células Muse en testículos de ratón. Esta propiedad es conveniente para mantener el equilibrio de las funciones biológicas. La ausencia de dicha propiedad puede destruir un organismo vivo debido al crecimiento anómalo o displasia, que produce tumorigénesis o formación de teratoma.

La pluripotencia de las células Muse no llegó a ser obvio en un sistema de cultivo adherente, pero se observó en

cultivo en suspensión.

En general, se cree que las células Muse están en un estado latente, pero se activan en respuesta a señales relacionadas con una crisis aguda o a condiciones continuadas de sobrecarga tales como lesión grave, privación o isquemia. Tras la activación, las células Muse pueden contribuir a la regeneración tisular, las interacciones intercelulares y, por tanto, la organización tisular.

Ejemplo 2 Caracterización de células Muse aisladas usando SSEA-3

10 El examen del ejemplo 1 reveló que las fracciones de células SSEA-3(+) obtenidas por FACS tenían las propiedades de células madre pluripotentes; es decir, eran células muse (J, K, y similares anteriormente). Además, la capacidad de diferenciación *in vitro* y la capacidad de diferenciación *in vivo* se examinaron usando células SSEA-3(+) aisladas y después se establecieron células iPS derivadas de Muse.

15 1. Examen de la capacidad de diferenciación *in vivo* por trasplante de células en tejidos dañados

Se aislaron células Muse SSEA-3(+) marcadas con GFP (proteína fluorescente verde)-lentivirus y después se trasplantaron mediante inyección intravenosa en ratones inmunodeficientes (ratones NOG) con medula espinal dañada (lesión por aplastamiento de la médula espinal), hígado dañado (inyección intraperitoneal de CCl₄, modelo de hepatitis fulminante) o gastrocnemio dañado (músculo) (inyección de cardiotoxina). Las células Muse derivadas de células de piel humana se marcaron con GFP (proteína fluorescente verde)-lentivirus (Hayase M y col., J Cereb Blood Flow Metab. 29(8): 1409-20, 2009) y después se confirmó, usando GFP, que los grupos M derivaban de las células marcadas. La lesión por aplastamiento de la médula espinal se realizó al nivel de Th9 (Farooque M y col., Acta Neuropathol., 100; 13-22, 2000) para ratones NOG. La cardiotoxina se inyectó en el gastrocnemio (músculo) de ratones NOG para inducir degeneración muscular. Se administró tetracloruro de carbono a ratones NOG por inyección peritoneal para inducir degeneración hepática. Se plantaron 1x10⁵ células Muse por inyección intravenosa 2 días después para el músculo y el hígado y 7 días después para la médula espinal. se usaron seis ratones para cada condición. Se usaron ratones intactos que recibieron inyección intravenosa de una población MEC marcada con GFP como controles. A las 3 o 4 semanas después del trasplante, los ratones se fijaron con paraformaldehído al 4 % y después se sometieron a análisis inmunohistoquímico y observación en microscopio láser confocal.

Después de 4 semanas, en ratones con lesión de la médula espinal, se descubrió que: las células positivas para GFP y complejo de Golgi humano expresaban neurofilamentos (figura 16-1N y O); y que, en ratones con daño hepático, las células positivas para GFP y complejo de Golgi humano (en hígado regenerado) expresaban albúmina humana (figura 16-1P). La RT-PCR confirmó adicionalmente la expresión de albúmina humana en hígado de ratones NOG a los que se han trasplantado células Muse (figura 16-2). Las células GFP(+) inyectadas en el músculo en regeneración y a las 3 semanas expresaban distrofina humana (figura 16-3). En contraste con estos resultados, el trasplante de fracciones de fibroblastos dérmicos humanos SSEA-3(-) producían una cantidad significativamente más pequeña de células integradas y menos células que eran positivas para los marcadores tisulares respectivos. Estos hallazgos sugieren que las células Muse tienen una capacidad de integrarse en tejidos dañados y también de diferenciarse *in vivo* en células de linaje ectodérmico, endodérmico y mesodérmico.

2. Diferenciación de células expandidas derivadas de grupos M generados a partir de células Muse individuales

45 Se examinó si un sistema de inducción es eficaz para la regulación de la diferenciación de células Muse. Se transfirieron individualmente grupos M derivados de células Muse SSEA-3(+) individuales a cultivo adherente para la expansión. Las células expandidas derivadas de una única célula Muse se recogieron, se dividieron en cuatro poblaciones y después cada una se sometió a inducción neural, de osteocitos, de adipocitos y de hepatocitos (n=5).

50 Para la inducción neural, se cultivaron células a una densidad de 1,0x10⁵ células/ml en medio NEUROBASA1 (Gibco) suministrado con suplemento B-27 en placa recubierta con poli-HEMA y se cultivaron durante 7 días para la formación de esferas. Para la diferenciación, las esferas se transfirieron a vidrio recubierto con poli L lisina y se incubaron en FBS al 2 % suministrado con 25 ng/ml de FGF y 25 ng/ml de BDNF durante 10 días.

55 Para la inducción de osteocitos, se incubaron células a una densidad de 4,2x10³ células/cm² con medio de inducción de osteocitos del kit de identificación funcional de células madre mesenquimáticas humanas (R&D Systems, SC-006) durante 14 días.

60 Para la inducción de adipocitos, se incubaron células a una densidad de 2,1x10⁴ células/cm² con medio de inducción de adipocitos del kit de identificación funcional de células madre mesenquimáticas humanas (R&D Systems) y se incubaron durante 14 días.

65 Para la inducción de hepatocitos, se incubaron células a una densidad de 2,0x10⁴ células/cm² con DMEM (+FBS al 10 %, 10xITS (GIBCO) suministrado con dexametasona 10 nM y 100 ng/ml de HGF, 50 ng/ml de FGF4) en placa recubierta con colágeno durante 14 días.

La inducción neural generó esferas que contenían células positivas para los marcadores de células madre neurales nestina, Musashi y NeuroD (figuras 17-1A-D), que se diferenciaron adicionalmente en células positivas a MAP-2 o GFAP cuando se cultivaban en medio de diferenciación (figura 17-1E; $89 \pm 5,7$ % positivas para MAP-2 o GFAP). La inducción de osteocitos producía células positivas para osteocalcina ($97 \pm 3,5$ %) y fosfatasa alcalina (figuras 17-1F-G). La diferenciación de adipocitos produjo células con gotas de lípidos que se teñían con Oil Red ($90 \pm 4,9$ %) (figuras 17-1H-I). La inducción de hepatocitos generó células positivas para α -fetoproteína humana (figura 17-1J; $87 \pm 7,6$ %) y la RT-PCR confirmó la expresión de albúmina humana y α -fetoproteína (figura 17-2). Estos resultados demuestran que las células Muse pueden regularse (mediante inducción) para diferenciarse en células de tres linajes con eficacia muy elevada.

3. Recogida de células SSEA-3(+) de la piel humana adulta

Se intentó aislar directamente células Muse de piel humana adulta sin incubación de células cultivadas o formación de grupos M.

Se obtuvo piel humana de donantes sanos ($n=3$) de BIOPREDIC International. Se retiró cuidadosamente la epidermis y los tejidos adiposos para separar la dermis, y la dermis se incubó con colagenasa/dispasa en α -MEM que contenía FBS al 10 % durante 36 h a 37°C . Las células se recogieron filtrando la dermis digerida y se sometieron a centrifugación a 1500 r.p.m. durante 20 min, se lavaron con α -MEM y se incubaron con tripsina al 0,25 %-HBSS durante 5 min. Las células se lavaron adicionalmente con tampón FACS y se incubaron SSEA-3 para recoger las células SSEA-3(+) por clasificación celular usando FACS. A partir de aproximadamente 7 cm^2 del tejido de piel, finalmente pudieron recogerse $1,3 \pm 0,3 \times 10^4$ células individuales. Las células SSEA-3(+) representaban un $1,7 \pm 0,2$ % de estas células individuales recogidas.

Un $21,0 \pm 1,7$ % de las células SSEA-3(+) formaron grupos M en 7 días de cultivo en suspensión de células individuales por dilución limitante. Los grupos M eran positivos para tinción con ALP y la RT-PCR mostró que las células expandidas a partir de un grupo M individual sobre placas recubiertas con gelatina expresaban MAP-2, Brachyury, Nkx2.5, GATA6 y α -fetoproteína. Estos hallazgos sugieren que la dermis humana adulta contiene células con las mismas propiedades que las de células Muse como en el caso de aspirados de médula ósea humana adulta.

La dermis adulta humana contiene varios tipos de células madre o progenitoras, tales como SKP (células progenitoras derivadas de piel), NCSC (células madre de la cresta neural), melanoblastos (MB), células perivasculares (PC), progenitores endoteliales (EP) y células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC). Para descartar la posibilidad de que las células Muse sean idénticas a una de estas células madre conocidas, las células Muse se analizaron para la expresión de Snai1 (marcadores para SKP), Slug (marcadores para SKP), Sox10 (marcadores para NCSC), CD271 (marcadores para NCSC), Tyrp1 (marcadores para MB), Dct (marcadores para MB), CD117 (marcadores para MB), CD146 (marcadores para PC y ADSC), NG2 (marcadores para PC), CD34 (marcadores para EP y ADSC) y factor de von Willebrand (marcadores para EP). Ninguno de estos marcadores se detectó en células SSEA-3(+) por FACS o análisis por RT-PCR (figura 18-1 y figura 18-2), lo que sugiere que las células Muse difieren de estas células madre o progenitoras que se sabe que están presentes en dermis humana adulta.

Se determinó la actividad fagocítica de las células Muse usando partículas de ferrita. Las células Muse incorporaron fácilmente las partículas de ferrita, lo que sugiere que las células Muse tienen una alta actividad fagocítica (figura 18-3).

4. Establecimiento de células iPS derivadas de Muse (Muse iPSC)

Las células iPS se preparan por introducción del gen *Oct3/4*, el gen *Sox2*, el gen *Klf4*, el gen *c-Myc*, el gen *Nanog* el gen *Lin28*, por ejemplo. Las células Muse tienen propiedades análogas a las células iPS porque expresan marcadores de pluripotencia y pueden diferenciarse en células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas. Se examinó si las células Muse podían ser buenos materiales para células iPS.

Un procedimiento empleado para este fin es el siguiente.

Se introdujeron cuatro factores (Nanog, Oct3/4, KLF4 y c-Myc) en células SSEA-3(+) y células SSEA-3(-) de fracciones de fibroblastos H usando vectores retrovíricos de acuerdo con la descripción de Takahashi y col., Cell, 131, 861-872 (2007) y después se cultivaron. El procedimiento se describe específicamente a continuación.

Establecimiento del plásmido

Se insertaron las fases de lectura abierta de Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc humanos en los vectores retrovíricos pMXs (Cell Biolabs).

Infección con retrovirus y establecimiento de células iPS

Se sembraron células PLAT-A a una densidad de 5×10^6 células por placa de 100 mm y después se cultivaron durante una noche. El siguiente día, se realizó transfección usando Eugene HD. A las 24 horas después de la transfección, se realizó el intercambio del medio. Se recogieron los sobrenadantes después de 3 días y después se filtraron a través de un filtro de 0,45 μ m. Después se añadió polibreno (4 μ g/ml). Los NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales) sembrados a una densidad de 1×10^5 células por placa de 60 mm se infectaron con una solución de virus. Después de 24 horas, el medio se intercambió con medio nuevo que no contenía virus. Las células se retiraron usando tripsina en el día 4 después de la infección vírica y después se sembraron en MEF (células de alimentación) a una densidad de 3×10^4 células. En el siguiente día, el medio se intercambió con medio Primate ES suplementado con 4 ng/ml de bFGF. Después de 2 días, se realizó el intercambio del medio en días alternos. Después de 30 días, se recogieron colonias y después se sembraron sobre una placa de 24 pocillos.

Análisis por PCR

Se purificó el ARN usando un kit RNeasy mini (QIAGEN). El ARN (500 ng) se transcribió de forma inversa usando Super-ScriptII. Los cebadores de Oct, Sox2, Klf4, Myc y Nanog endógenos, las condiciones de PCR y similares son como se describe en Takahashi y col., Cell, 131, 861-872 (2007).

Diferenciación de células iPS *In vitro*

Se recogieron células iPS usando colagenasa. Los grupos de células se colocaron en placas recubiertas con poli-Hema y después se cultivaron en medio DMEM/F12 que contenía remplazo de suero de inactivación al 20 % (Invitrogen), L glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 1×10^{-4} M, 2 mercaptoetanol 1×10^{-4} M (Nacalai) y penicilina al 0,5 %/estreptomycin. El medio se intercambió en días alternos. Después de 7 días, se sembraron cuerpos embrioides en placas recubiertas con gelatina, seguido por 1 semana de cultivo en el mismo medio.

Formación de teratomas

Las células iPS en una placa de 60 mm se trataron con un inhibidor Rock, se recogieron usando Accutase (marca registrada) en un tubo, se sometieron a centrifugación y después se suspendieron en PBS. Estas células se inyectaron en el testículo de un ratón NOG (marca registrada) (Central Institute for Experimental Animals). Después de 12 semanas, los resultantes se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Las secciones de parafina se sometieron a tinción con HE (hematoxilina y eosina).

Se obtuvieron los siguientes resultados.

Se introdujeron cuatro factores, Nanog, Oct3/4, KLF4 y c-Myc en células SSEA-3(+) y (-) derivadas de la fracción de fibroblastos H usando vectores retrovíricos de acuerdo con el procedimiento descrito por Takahashi y col., Cell, 131, 861-872 (2007). Las células se sembraron de nuevo en MEF después de 5 días y después se cultivaron. Inmediatamente antes de recoger las colonias, es decir, en el día 30 de cultivo en MEF, las colonias generadas en células SSEA-3(-) eran colonias no del tipo de células ES y ninguna de ellas era positiva para Tra-1-80 (marcador de células ES). Por el contrario, muchas células SSEA-3(+) formaban colonias aproximadamente siete veces la cantidad de colonias formadas por las poblaciones de células SSEA-3(-), que eran positivas para Tra-1-80. De forma importante, los genes estrechamente relacionados con la pluripotencia, tales como Nanog y Sox2 eran todos negativos en células SSEA-3(-) (se recogieron todas las colonias y células que no formaban colonias) incluso inmediatamente antes de la recogida de colonias en el día 30 en MEF, como se determina por RT-PCR. Sin embargo, las células SSEA-3(+) mostraron regulación por incremento de Oct3/4, KLF4 y Rex1 endógenos y expresaban Nanog y Sox2. Como se esperaba, las células SSEA-3(+) se sometieron a recogida de colonias y después se transfirieron a MEF nuevo (células de alimentación), las células iPS pudieron generarse satisfactoriamente en una eficacia aproximadamente 30 veces mayor que la de las células de la fracción de fibroblastos H vírgenes. Estas células iPS mostraron regulación por incremento o nueva aparición de Tra-1-60, Tra-a-80, Rex1, UTF-1, transcriptasa inversa telomerasa (TERT) y factores expresados en células ES humanas, como se revela por inmunocitoquímica, RT-PCR y Q-PCR (figuras 19 y 21). Además, se expresaron Nanog, Oct3/4, Sox2 y TRA-1-81 en las células iPS derivadas de células Muse así obtenidas (figura 19). La RT-PCR reveló que se expresaban Nanog, Oct3/4 y Sox2 en células iPS derivadas de células Muse, pero no se expresaban en colonias derivadas de células SSEA-3(-) (figura 21).

Las eficacias de transducción del gen Oct3/4, el gen Sox2, el gen Klf4 y el gen c-Myc fueron casi idénticas para las fracciones de células SSEA-3(+) y SSEA-3(-). Las células transducidas con más de cuatro factores entonces se transfirieron a y se cultivaron en células de alimentación de ratón a una densidad de 1×10^5 células por placa. La generación de colonias se observó en ambas poblaciones, pero las fracciones de células SSEA-3(+) formaban siete veces más colonias que las células SSEA-3(-). Además, en contraste con las derivadas de las fracciones de células SSEA-3(+), ninguna de las colonias derivada de las fracciones de células SSEA-3(-) se encontraron positivas para el marcador de células madre pluripotentes humanas Tra-1-81 incluso en el día 30 de cultivo inmediatamente antes de la recogida de colonias (figura 22-1). La RT-PCR reveló que Sox2 y Nanog endógenos se expresaban solamente en fracciones derivadas de células SSEA-3(+) pero no en fracciones de células SSEA-3(-) (figura 22-2).

Todas las colonias generadas a partir fracciones de células SSEA-3(+) y SSEA-3(-) se recogieron y pasaron a pocillos individuales para establecer líneas de células iPS. Después de 3 pases, todas las colonias que mostraban morfología de tipo célula ES humana (colonias planas) se sometieron individualmente a RT-PCR (figuras 22-3C y C1). Las colonias que expresan los tres factores (*Oct3/4* endógeno, *Sox2* endógeno y *Nanog*) se contaron como colonias iPS. Este análisis reveló que solamente las colonias originadas a partir de células SSEA-3(+) generaban células iPS y la eficacia era de un 0,03 %, mientras que ninguna de las colonias originada a partir de células SSEA-3(-) generaba células iPS (figura 22-3D y D1).

Además, las células iPS establecidas a partir de células Muse se diferenciaban en células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas, y formaban teratomas en testículos de ratón (figuras 23-1 a 23-3).

La actividad de proliferación de las células Muse no fue tan alta en términos de tasa de crecimiento y actividad telomerasa. De forma coherente, aunque las células Muse se diferenciaban en células triploblásticas en los testículos de ratón, no se desarrollaban en teratomas. Esto puede ser razonable porque si las células Muse se mantienen en tejido humano adulto tal como en piel y médula ósea, su proliferación debe estar estrictamente regulada, de lo contrario se desarrollarían fácilmente en tumores en casi cualquier parte del organismo. Además, incluso las células pluripotentes no siempre muestran formación de teratoma ya que las células madre del epiblasto cultivadas en ciertas condiciones no demostraban formar teratomas en testículos de ratón (Chou y col., Cell, 135, 449-461(2008)). Como las células Muse mostraban originalmente algunas de las características de las células pluripotentes tales como expresión de marcadores de pluripotencia y su capacidad de diferenciación, se sugiere que las células Muse podían llegar a ser fácilmente células iPS únicamente por una elevación de la actividad proliferativa y formaban teratomas en los testículos de ratón. El mecanismo de inducción de iPS aún no está aclarado, pero la obtención de proliferación tumorigénica en células Muse entre la población de células mesenquimáticas podría ser una de las posibilidades.

Las células iPS podrían establecerse a una eficacia de aproximadamente un 0,001 % a partir de fracciones de fibroblastos dérmicos humanos vírgenes. Esto coincide con el informe de K. Takahashi y col., Cell 131, 861 (2007). Por lo tanto, la eficacia de preparación de células iPS a partir de células SSEA-3(+) fue 30 veces mayor que la de a partir de fibroblastos vírgenes. Esto sugiere que las células Muse contribuyen principalmente a la generación de células iPS.

El análisis inmunohistoquímico y el análisis por RT-PCR de cuerpos embrioides que se desarrollaban a partir de células iPS derivadas de Muse mostraron que las células se diferenciaban en células ectodérmicas que expresan neurofilamento y MAP-2, células mesodérmicas que expresan SMA, Brachyury y Nkx2.5, y células endodérmicas que expresan α -fetoproteína y GATA-6 *in vitro*. Además, la inyección de células iPS derivadas de Muse en testículos de ratones inmunodeficientes produjo la formación de teratoma. Por el contrario, los testículos a los que se inyectó grupos M no desarrollaban teratomas durante hasta 6 meses, y la mayoría no eran significativamente más grandes que los testículos de control a los que se inyectó MEF inactivados. Sin embargo, se identificaron células positivas para mitocondria humana, y para SMA, α -fetoproteína y neurofilamento. Estos resultados muestran que a diferencia de las células iPS derivadas de Muse, las células Muse originales no forman teratoma, pero se diferencian en células de linaje mesodérmico, ectodérmico y endodérmico en ratones inmunodeficientes.

Los grupos M y las células iPS derivadas de Muse se sometieron a PCR cuantitativa (Q-PCR). Estos resultados se muestran en las figuras 25 y 26. Los patrones de expresión de los genes relacionados con la regulación del ciclo celular diferían sustancialmente. Los genes relacionados con la progresión del ciclo celular estaban principalmente regulados por disminución en grupos M pero regulados por incremento en células iPS derivadas de Muse. La expresión de los genes relacionados con pluripotencia y un estado células indiferenciado fue similar en grupos M y células iPS derivadas de Muse, pero los niveles de expresión de *Nanog*, *Oct3/4* y *Sox2* fueron muy inferiores en grupos M que en células iPS derivadas de Muse. Además, los dinucleótidos de citosina y guanina (CpG) en las regiones promotoras de los genes *Nanog* y *Oct3/4* estaban menos metilados en células iPS derivadas de Muse que en grupos M, y la región promotora del gen *Nanog* mostró un nivel inferior de metilación de CpG en grupos M que en fracciones de células SSEA-3(-) vírgenes (figura 24). Este resultado puede explicar parcialmente las diferencias en el nivel de expresión de los marcadores de pluripotencia entre las células Muse y las células iPS derivadas de Muse.

55 Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, las células madre pluripotentes pueden obtenerse de tejido corporal sin usar ninguna célula germinal o embriones prematuros y sin usar una operación de inducción artificial tal como transferencia de genes foráneos o introducción de un compuesto específico. Las células madre pluripotentes de la presente invención pueden prepararse de forma eficaz sin usar una operación artificial tal como transferencia de genes foráneos, de modo que pueden usarse de forma segura cuando se aplican para tratamiento. Además, las células madre pluripotentes de la presente invención pueden usarse para medicina de regeneración y tratamiento de tejido disfuncional o similares, y pueden usarse además para investigar la división celular o regeneración tisular, por ejemplo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula madre pluripotente SSEA-3(+) aislada o células madre pluripotentes SSEA-3(+) aisladas, que se pueden obtener de tejido mesodérmico o tejido mesenquimático y no muestran actividad telomerasa o muestran actividad telomerasa tan baja como la de un fibroblasto humano; y que son:
 - (i) positivas para CD105; y/o uno cualquiera de los siguientes (ii)(a) a (ii)(c)
 - (ii) (a) negativas para CD117 y negativas para CD146; o
 - 10 (ii) (b) negativas para CD117, negativas para CD146, negativas para NG2, negativas para CD34, negativas para vWF y negativas para CD271; o
 - (ii) (c) negativas para CD34, negativas para CD117, negativas para CD146, negativas para CD271, negativas para NG2, negativas para vWF, negativas para Sox10, negativas para Snail, negativas para Slug, negativas para Tyrp1 y negativas para Dct.
- 15 2. La células o células madre pluripotentes de acuerdo con la reivindicación 1, que tienen las siguientes propiedades:
 - (i) son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales;
 - (ii) no muestran proliferación neoplásica; y
 - 20 (iii) capacidad de autorrenovación.
3. La célula o células madre pluripotentes de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que son resistentes a sobrecarga.
- 25 4. La célula o células madre pluripotentes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tienen capacidad fagocítica.
5. Una fracción de células sustancialmente homogénea, que contiene las células madre pluripotentes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. Un procedimiento para aislar una célula madre pluripotente o una fracción de células madre pluripotentes a partir de tejido mesodérmico o tejido mesenquimático, que usa la propiedad de ser positivo para SSEA-3 como un índice.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, que usa además cualquiera de las siguientes propiedades (ii) a (vi) como un índice:
 - 35 (ii) ser positivas para CD105;
 - (iii) ser negativas para CD117 y negativas para CD146;
 - (iv) ser negativas para CD117, negativas para CD146, negativas para NG2, negativas para CD34, negativas para vWF y negativas para CD271;
 - 40 (v) ser negativas para CD34, negativas para CD117, negativas para CD146, negativas para CD271, negativas para NG2, negativas para vWF, negativas para Sox10, negativas para Snail, negativas para Slug, negativas para Tyrp1 y negativas para Dct; y
 - (vi) no tener actividad telomerasa o tener baja actividad telomerasa que sea tan baja como la de los fibroblastos humanos.
 - 45
8. Un procedimiento para aislar una célula madre pluripotente o una fracción de células pluripotentes, que comprende exponer células derivadas de tejido corporal a sobrecarga celular y después recoger las células supervivientes.
- 50 9. El procedimiento para aislar una célula madre pluripotente o una fracción de células madre pluripotentes de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la sobrecarga celular se selecciona entre tratamiento prolongado con proteasa, cultivo en condiciones de privación de suero, cultivo en un estado de privación de azúcar, cultivo en exposición a radiación, cultivo en exposición a choque térmico, cultivo en presencia de una sustancia toxica, cultivo en presencia de oxígeno activo, cultivo bajo estimulación mecánica y cultivo bajo tratamiento por presión.
- 55 10. El procedimiento para aislar una célula madre pluripotente o una fracción de células pluripotentes de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la sobrecarga celular es incubación prolongada con tripsina.
- 60 11. Un procedimiento para obtener una célula madre pluripotente, que comprende obtener o inducir una célula a partir de la célula madre pluripotente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
12. Un procedimiento para obtener una célula diferenciada, que comprende obtener o inducir una célula a partir de la célula madre pluripotente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 65 13. Una composición farmacéutica, que comprende la célula madre pluripotente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Fig. 1-1

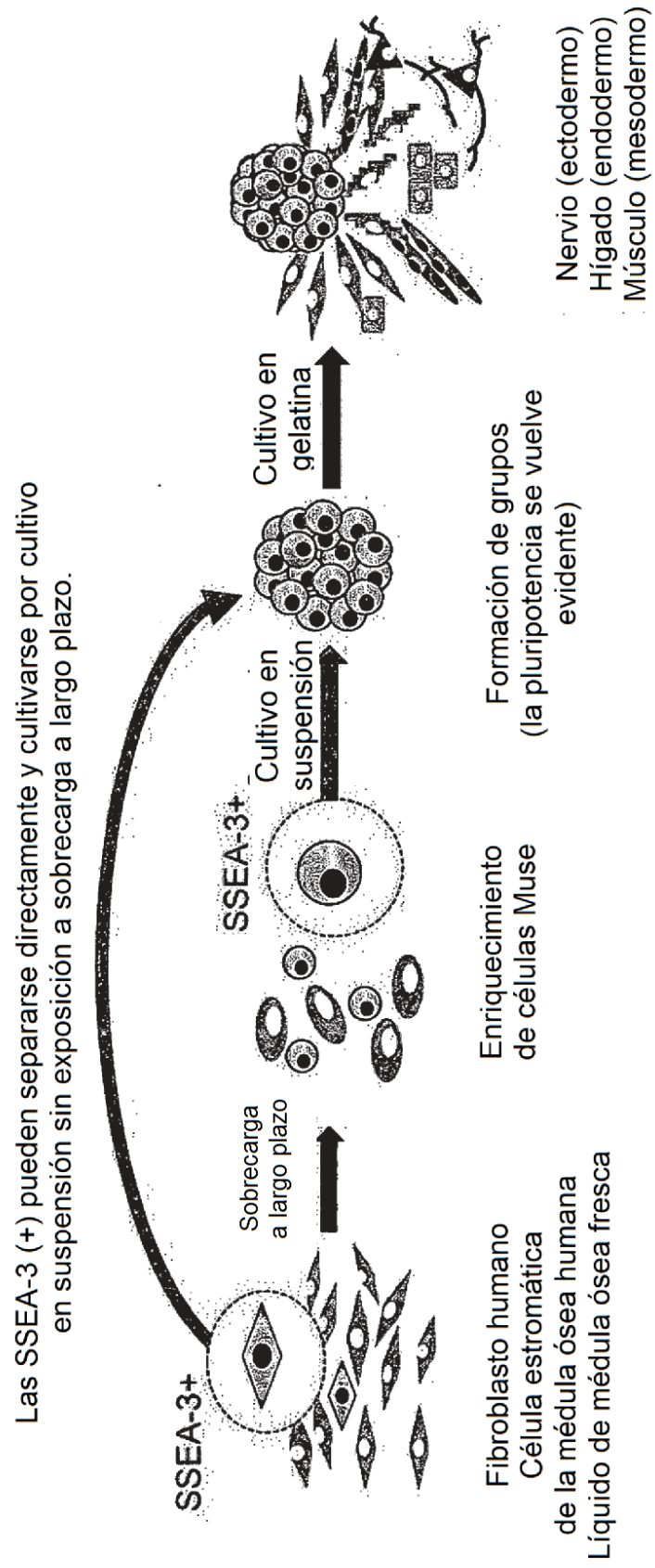


Fig. 1-2

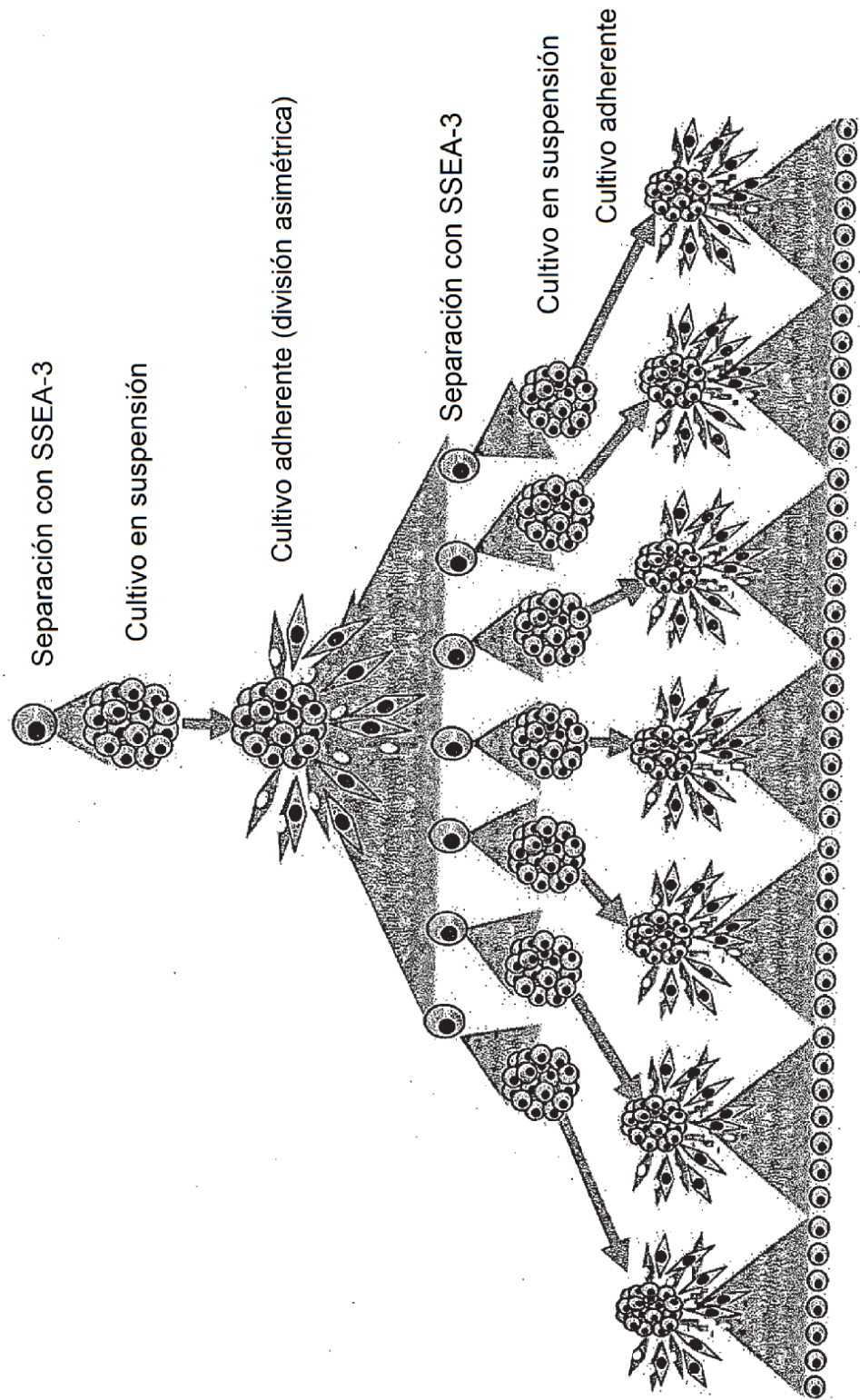


Fig. 2

Símbolo del gen	Total	Organismo D24 EB/D24 nativo	Organismo NHDF EB/NHDF nativo	Título del gen
THBD	1267.42467	42.96487494	1224.459795	trombomodulina
IL1RN	960.4457022	12.0038603	948.4418419	antagonista del receptor de interleucina 1
FOS	954.4076469	88.7202031	865.6874438	homólogo del oncogén vírico del osteosarcoma murino
SLC16A6	849.437506	715.7799818	133.6575242	familia 16 del transportador de solutos, miembro 6
TYRP1	768.3374259	11.67216252	756.6652634	proteína 1 relacionada con tirosinasa
CACNA1A	685.5302732	3.084442121	682.445831	Canal de calcio, dependiente de voltaje, tipo P/G, subunidad alfa 1A
C16orf81	531.0858738	528.3969782	2.688895627	fase de lectura abierta 81 del cromosoma 16
CHI3L1	489.924397	373.8511267	116.0732704	quitinasa 3-tipo 1 (glucoproteína-39 de cartilago)
PRSS35	441.7622409	371.6403738	70.12186703	proteasa, serina, 35
KYNU	420.8532931	182.1885786	238.6647145	cinureninasa (L-cinurenina hidrolasa)
SLC16A6	407.4159044	315.8163678	91.59953662	familia 16 del transportador de solutos, miembro 6 (transportador 7 de ácido monocarboxílico)
AP0E	357.4991884	105.5807107	251.9184778	apolipoproteína E
THBD	347.7592226	34.12473279	313.6344898	trombomodulina
SYTL5	320.0330513	15.80876986	304.2242814	sinaptotagmina-tipo 5
CHI3L1	299.4142542	260.1989748	39.21527948	quitinasa 3-tipo 1 (glucoproteína-39 de cartilago)
ABCA13	290.3969665	271.9782856	18.41868089	casete de unión a ATP, subfamilia A (ABCI), miembro 13
ANGPTL4	284.3113469	11.53113972	272.7802072	angiopoyetina-tipo 4
PTGS2	273.0706903	201.4865123	71.58417805	prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)
STC1	255.0878156	29.28287475	225.8049409	estanniocalcina 1
CCDC102B	253.1960755	37.22467468	215.9714008	dominio superenrollado que contiene 102B

Fig. 3

Símbolo del gen	Total	D24 EB/hES	NHDF EB/hES	Título del gen
MMP1	36528. 90821	6836. 563387	29692. 34482	metalo peptidasa 1 de matriz (colagenasa intersticial)
EREG	19813. 4402	18961. 45781	851. 9823837	epiregulina
CHI3L1	9641. 34444	8842. 305483	799. 038957	quitinasa 3-tipo 1 (glucoproteína-39 de cartílago)
---	7940. 341316	7298. 64809	641. 6932268	Locus transcrito
CHI3L1	5714. 359227	5385. 877946	328. 4812811	quitinasa 3-tipo 1 (glucoproteína-39 de cartílago)
SRGN	4655. 28423	4636. 821662	18. 46256778	serglicina
---	4397. 855874	3959. 205654	438. 6502206	clon de ADNc de inserto de longitud completa de MRNA EUROIMAGE
RIN2	3611. 379317	859. 9132609	2751. 466056	Interactor 2 de Ras y Rab
LUM	3396. 245648	1797. 976375	1598. 269272	Iumicano
CLCA2	3331. 259662	747. 5657674	2583. 693895	miembro 2 de la familia de CICA, regulador del canal
IL8	3143. 389365	2638. 045747	505. 3436182	interleucina 8
LOC401097	3012. 485859	1860. 366679	1152. 119181	Similar a LOC166075
DPT	2807. 405266	56. 39203934	2751. 013226	dermatopontina
ELTD1	2658. 65006	1751. 976082	906. 6739784	EGF, latrofilina y de siete dominios transmembrana
IGFBP1	2423. 035758	2405. 299722	17. 73603586	proteína 1 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina
SLC16A4	2305. 561138	1826. 823338	478. 7378001	familia 16 del transportador de solutos, miembro 4 (transportador 5 de ácido monocarboxílico)
SRGN	2293. 730946	2279. 537455	14. 19349126	serglicina
GREM2	2053. 928699	159. 813291	1894. 115408	gremlina 2, superfamilia de nudo de cisteína, homólogo (Xenopus laevis)
IGFBP5	1960. 755393	1915. 425977	45. 3294163	proteína 5 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina
SORDL	1918. 477233	1217. 387684	701. 0895492	tipo sulfuro quinona reductasa (levadura)

Fig. 4

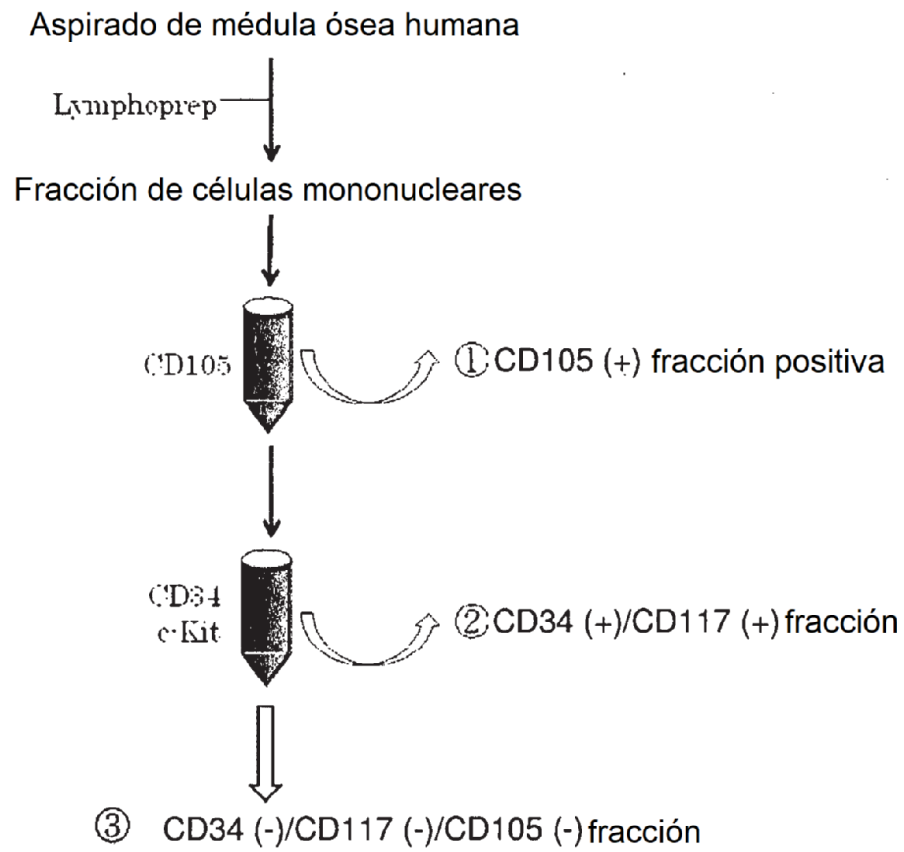


Fig. 5

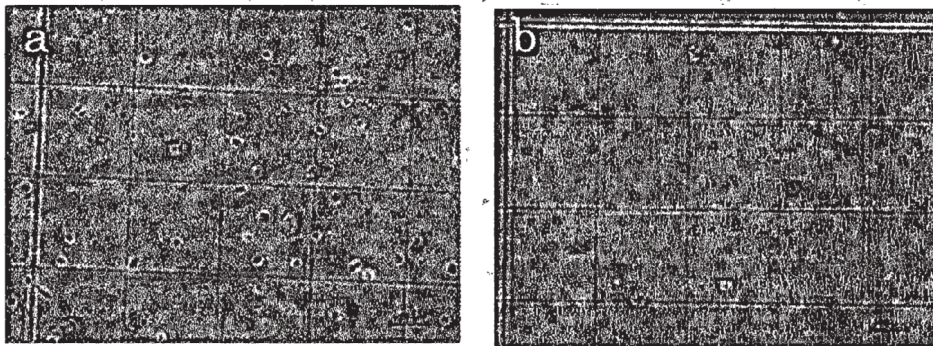


Fig. 6

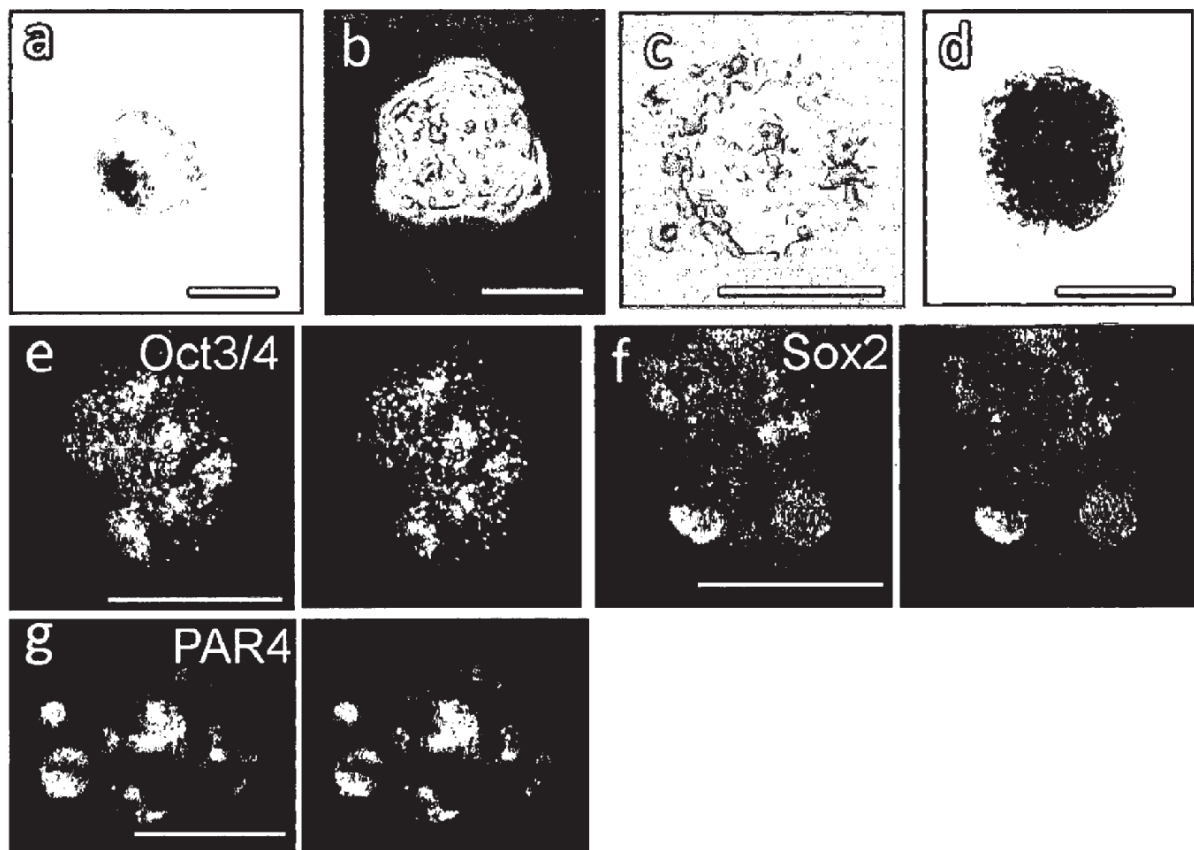


Fig. 7-1

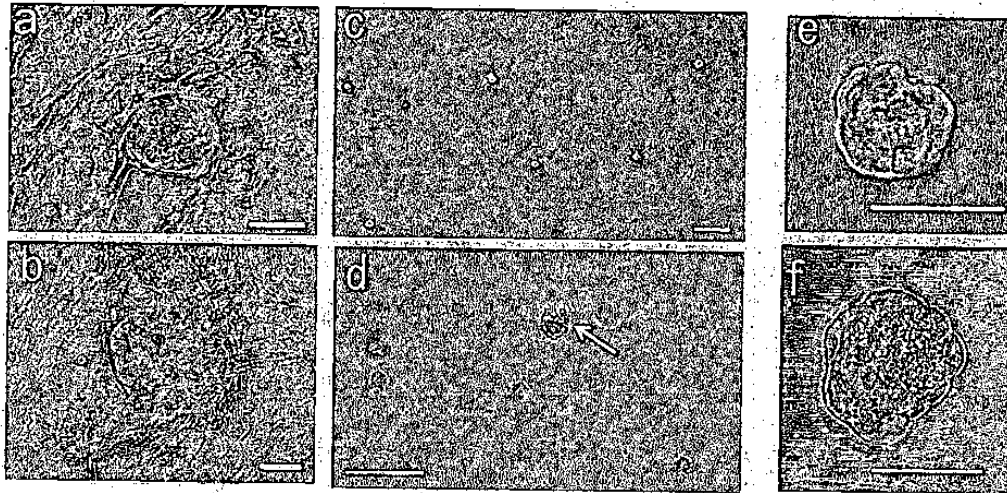


Fig. 7-2

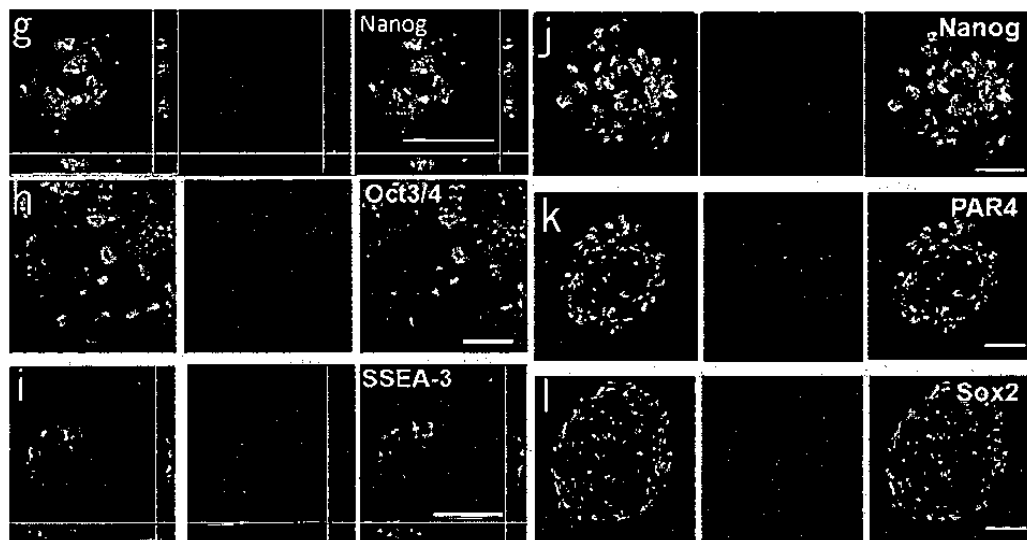


Fig. 7-3



Fig. 7-4

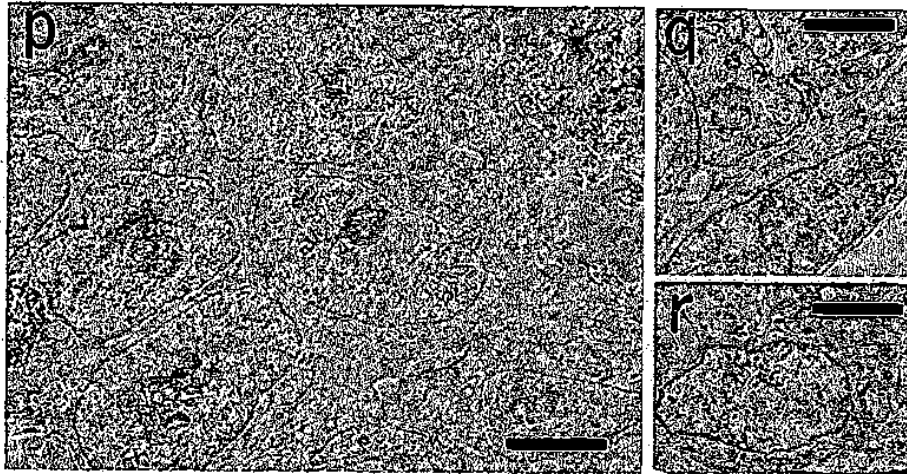


Fig. 8-1

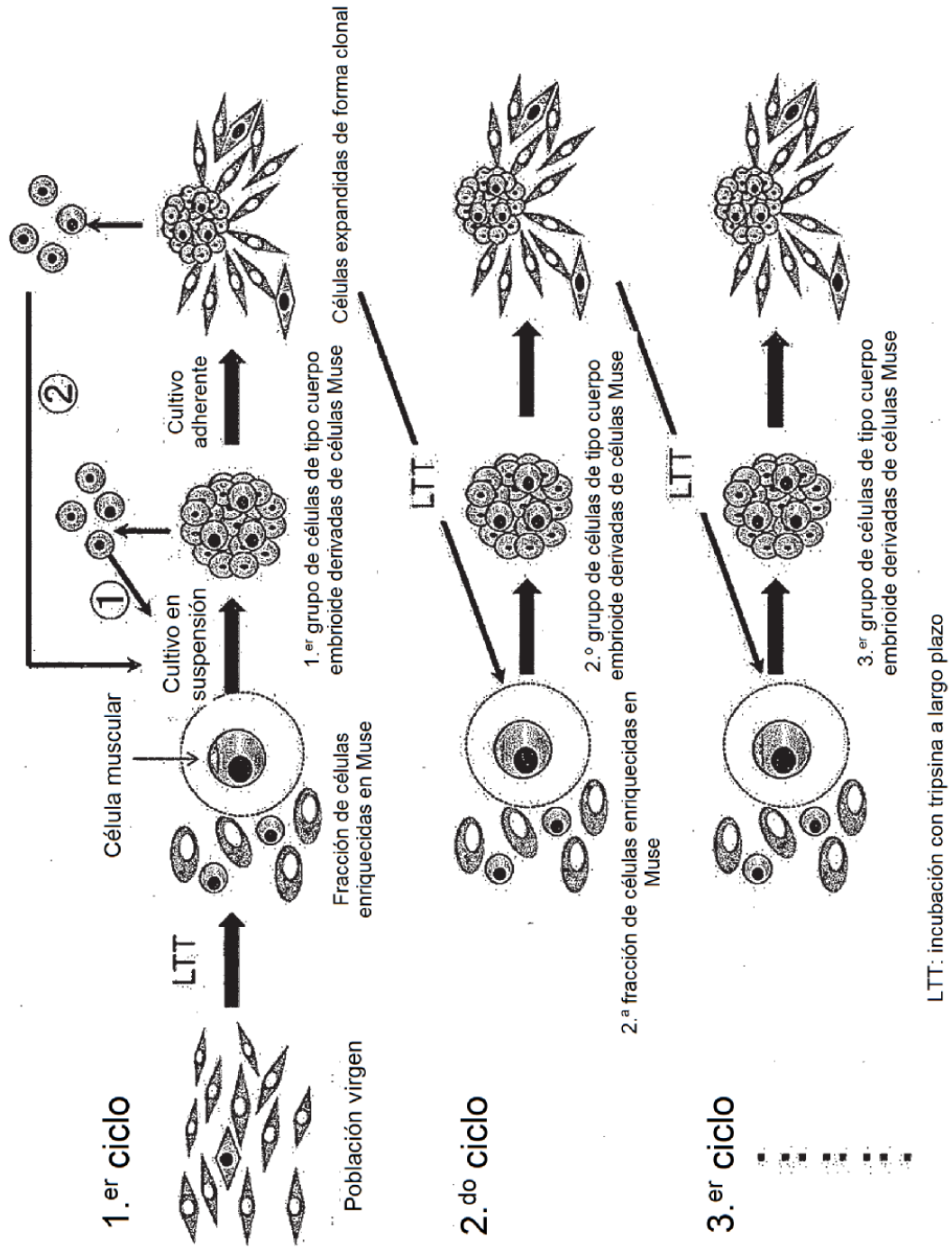


Fig. 8-2

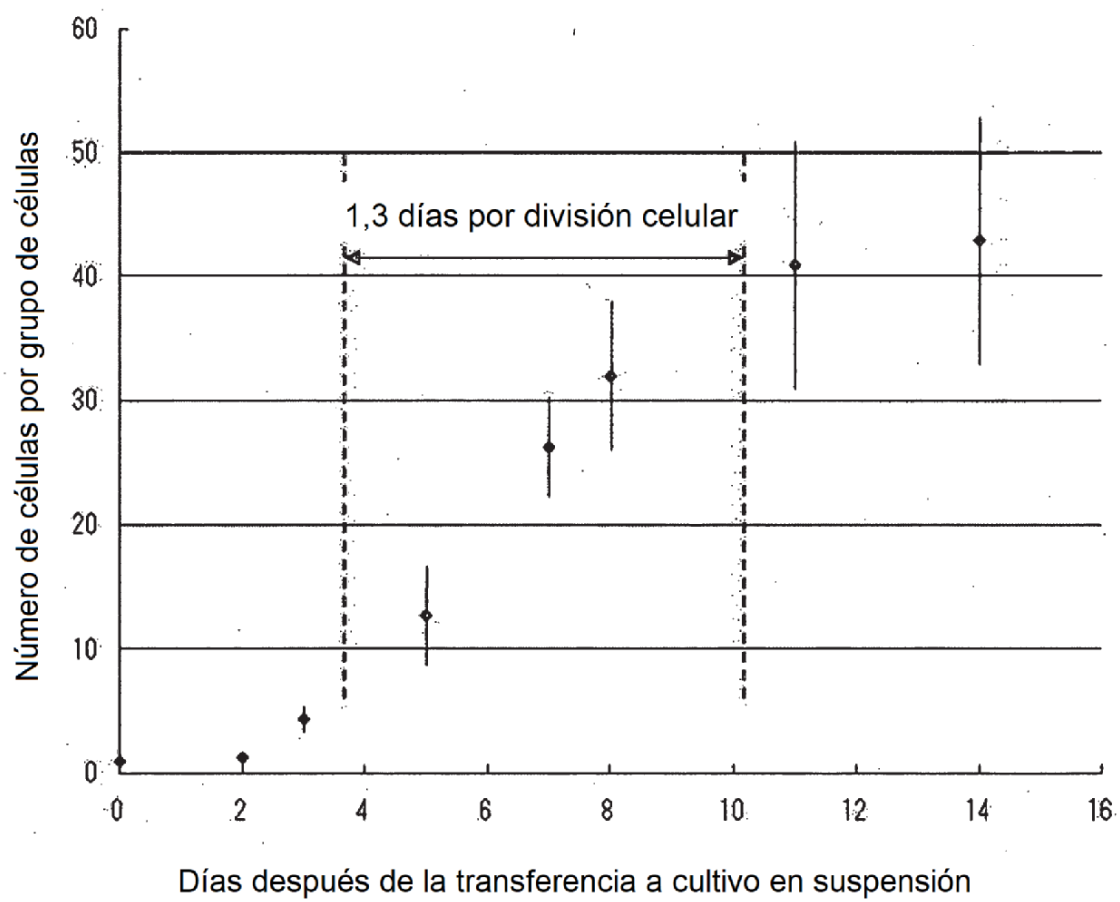


Fig. 8-3



Fig. 9-1

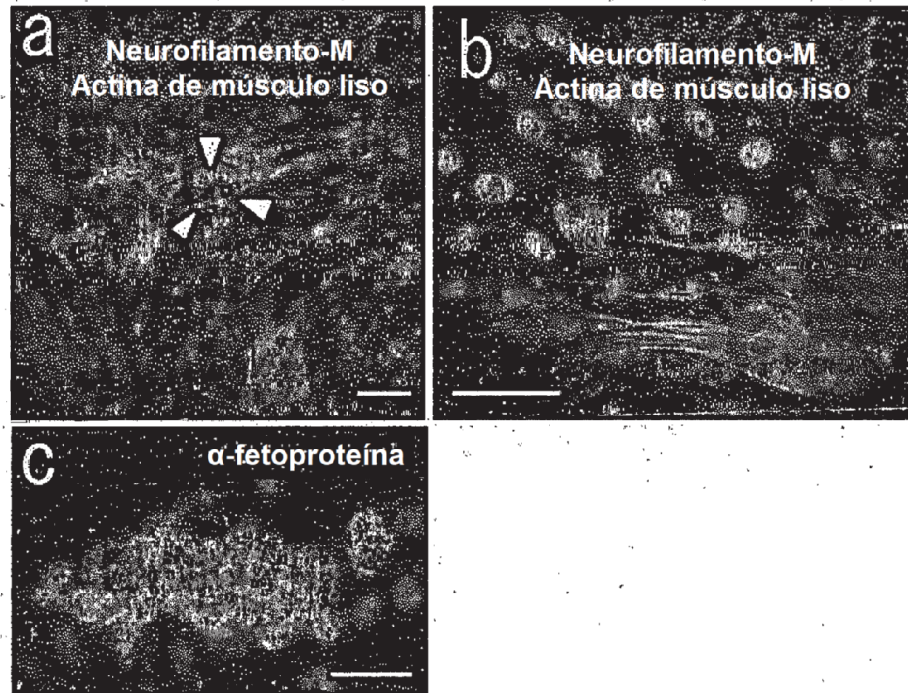


Fig. 9-2

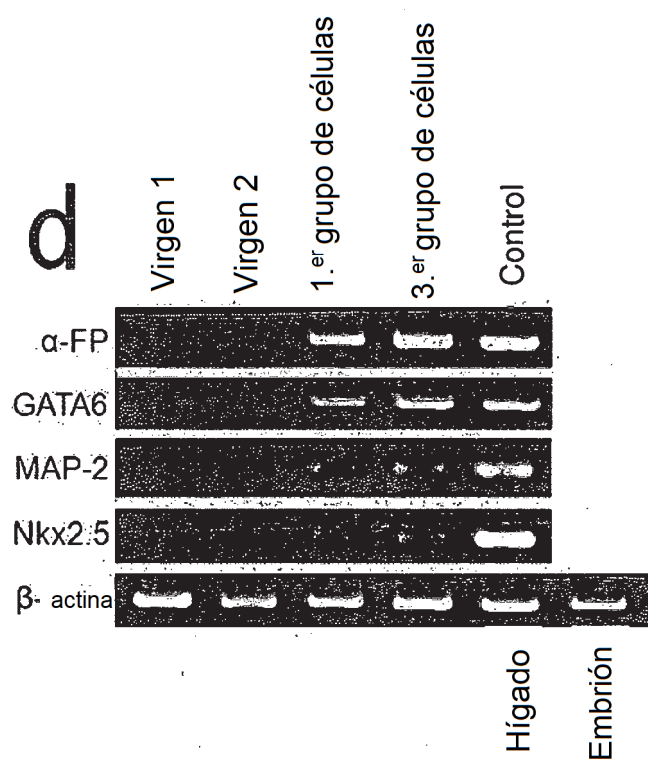


Fig. 9-3

Grupo M: grupo de células de tipo cuerpo embrioide derivadas de células Muse

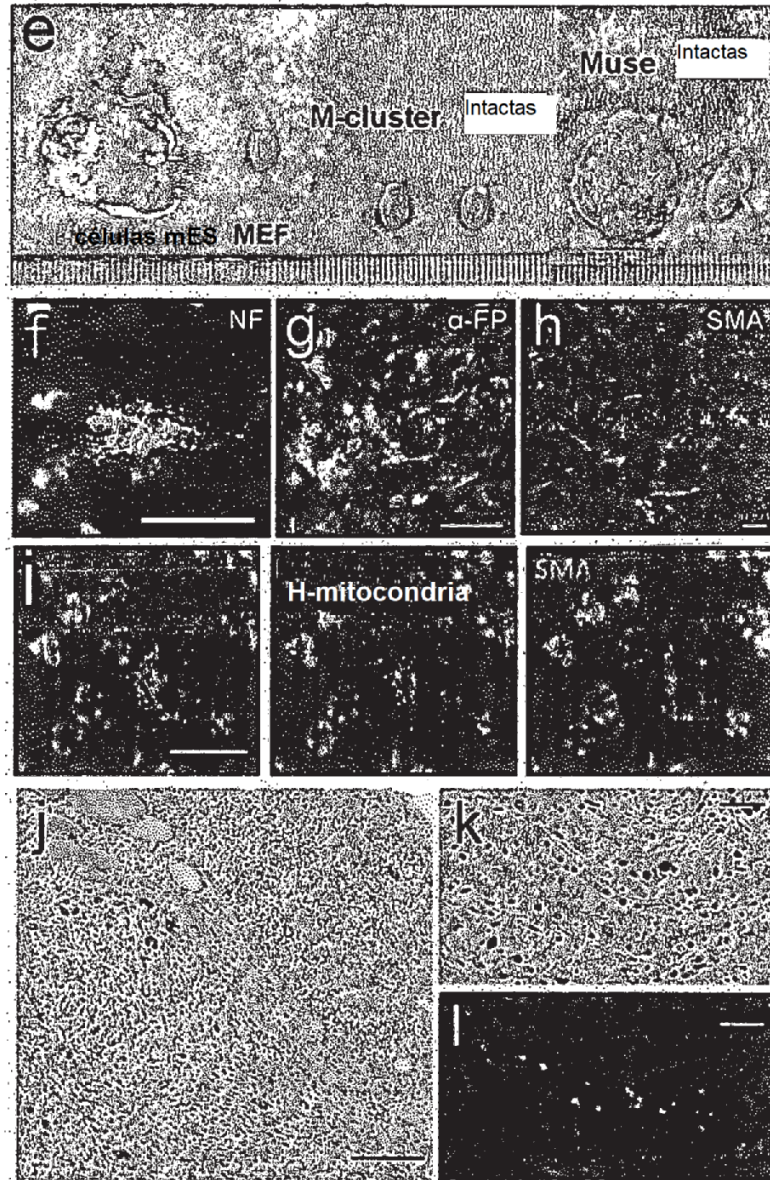


Fig. 10a

Símbolo	Nombre	MUSE / Vírgenes				Grupo de células / Vírgenes			
		Fibro1	Fibro2	MSC-1	MSC-2	Fibro1	Fibro2	MSC-1	MSC-2
DAZL	Eliminado en tipo de azoospermia								
DPPA2	Asociado a pluripotencia en el desarrollo 2 (PESCRG1)								
DPPA4	Asociado a pluripotencia en el desarrollo 4								
ERAS	Ras expresado en células ES								
GRB7	Proteína 7 unida al receptor del factor de crecimiento								
HOXB1	Homeosecuencia B1								
KLF4	Factor 4 de tipo Kruppel (intestino)								
MYC	c-Myc								
PRDM1	Dominio PR que contiene 1, con dominio ZNF								
SOX2	SRY (región Y de determinación del sexo)-secuencia 2								
SPAG9	Antígeno 9 asociado a espermia								
SPRY2	Homólogo 2 de Sprouty, antagonista de la señalización de FGF								
TDGF1	Factor 1 del crecimiento derivado de teratocarcinoma								
ZFP42	Homólogo de la proteína 42 de dedos de cinc (Rex1)								



Fig. 10b

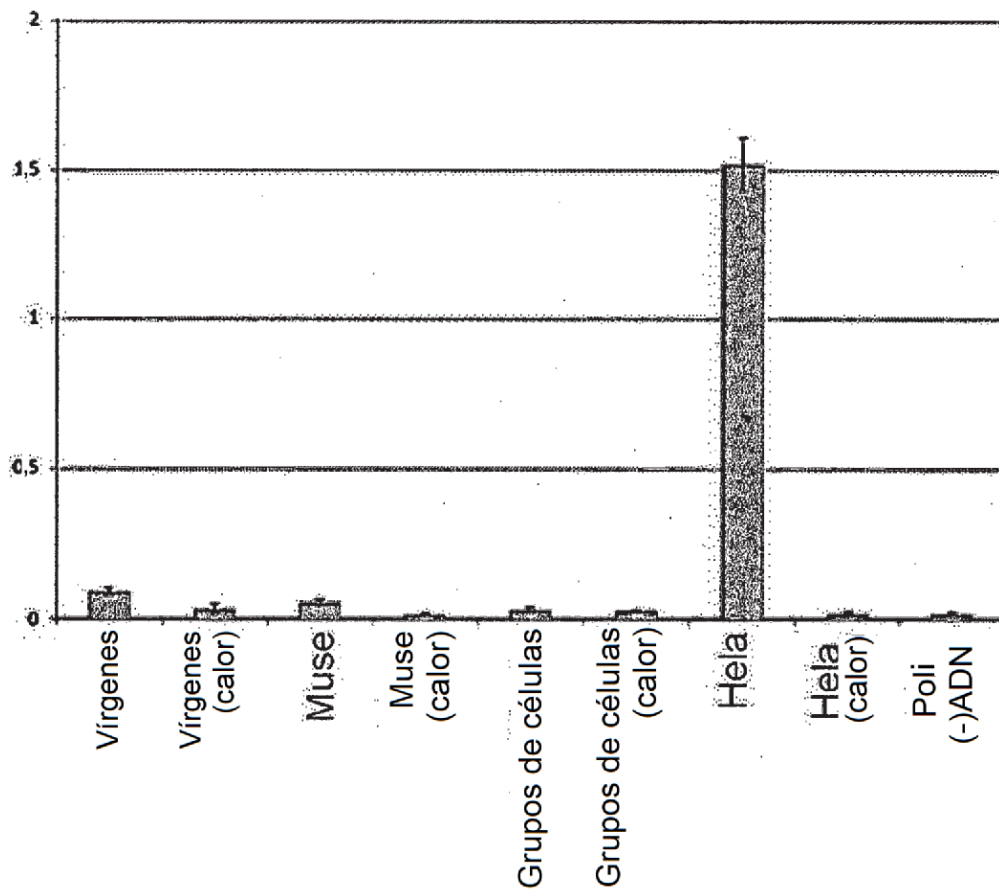


Fig. 11

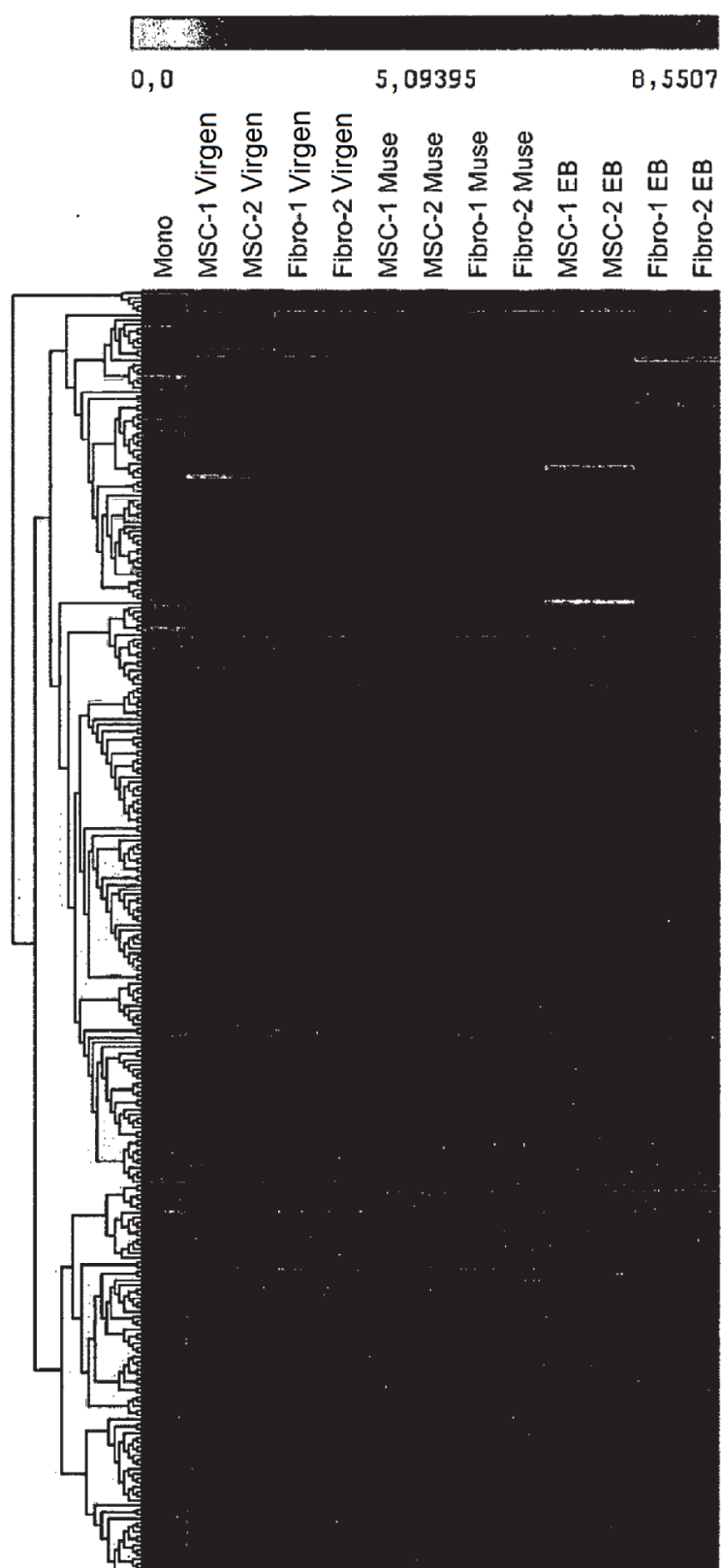


Fig. 12

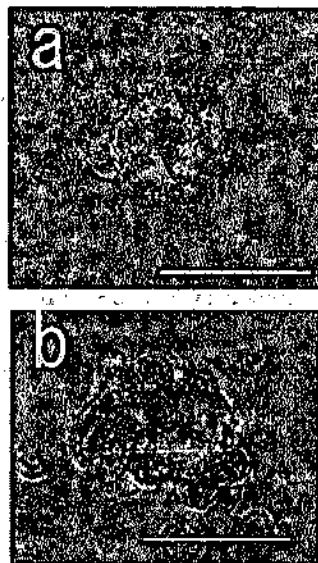


Fig. 13

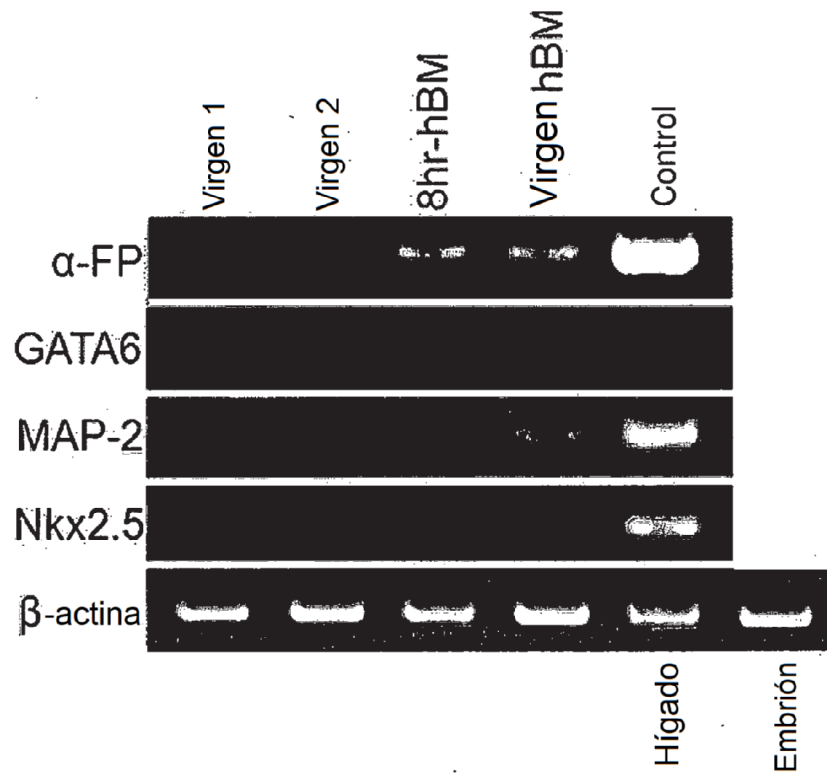
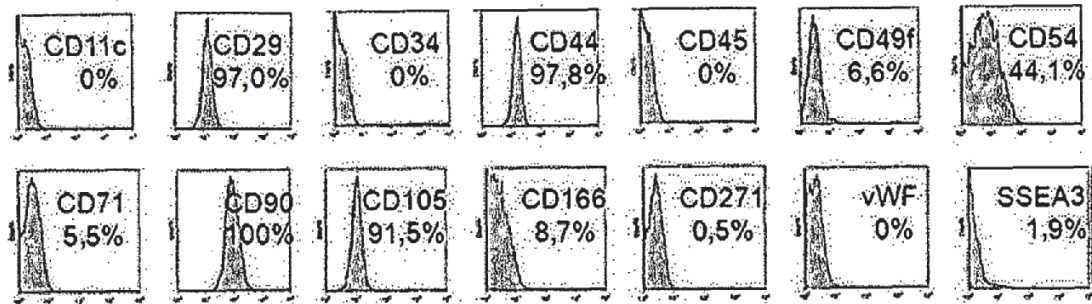


Fig. 14

Virgen 1H-fibroblastos (Célula virgen)



H-MSCs (Célula virgen)

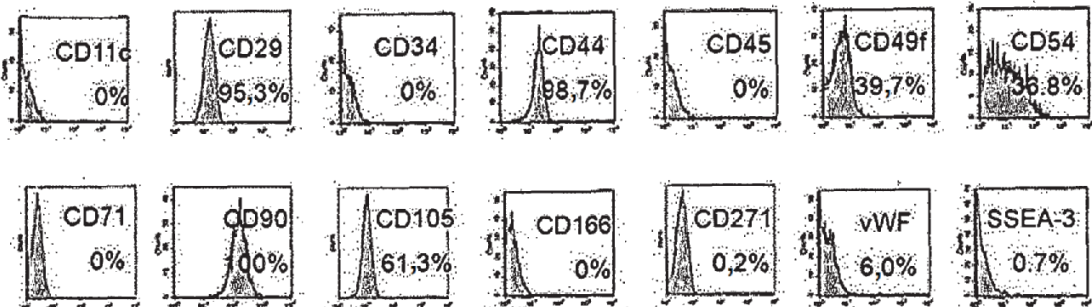


Fig. 15-1

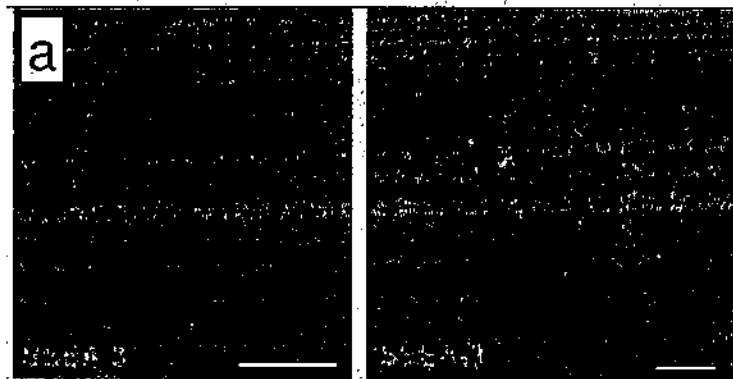


Fig. 15-2

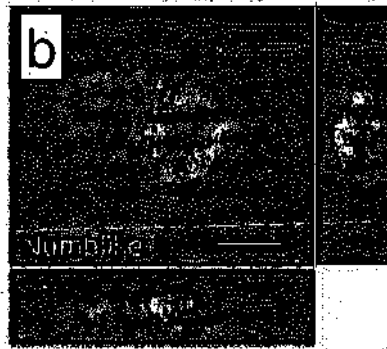


Fig. 15-3

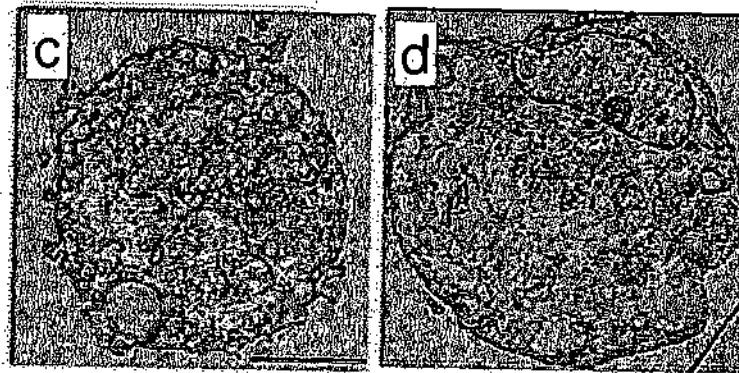


Fig. 15-4

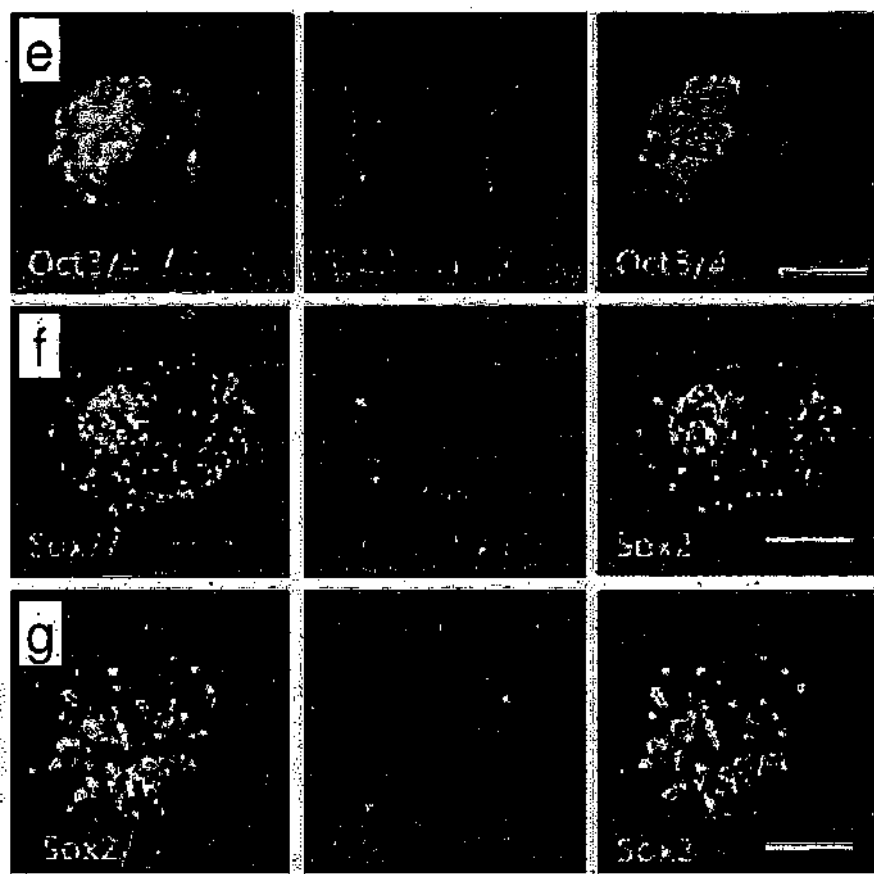


Fig. 16-1

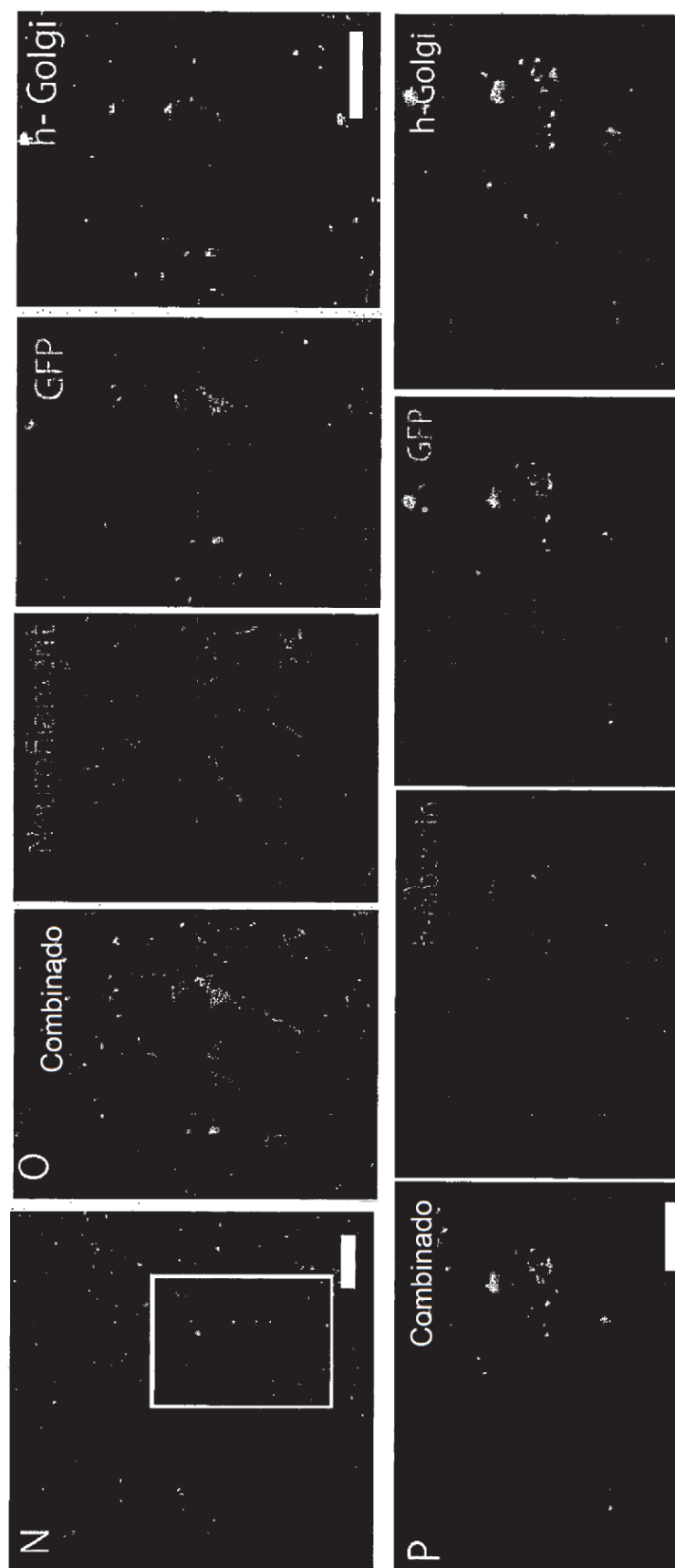


Fig. 16-2

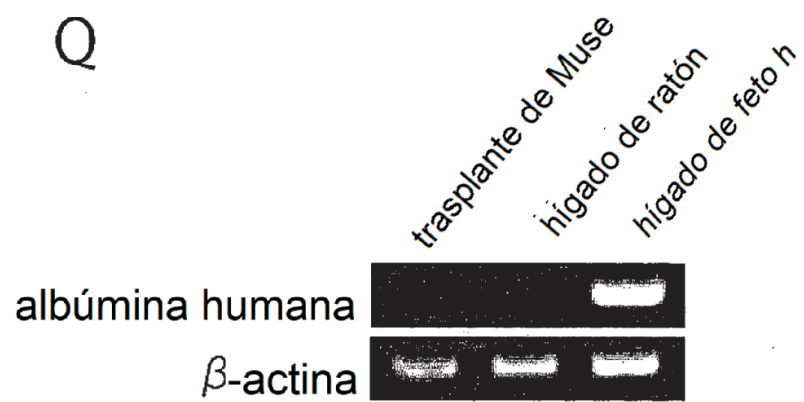


Fig. 16-3

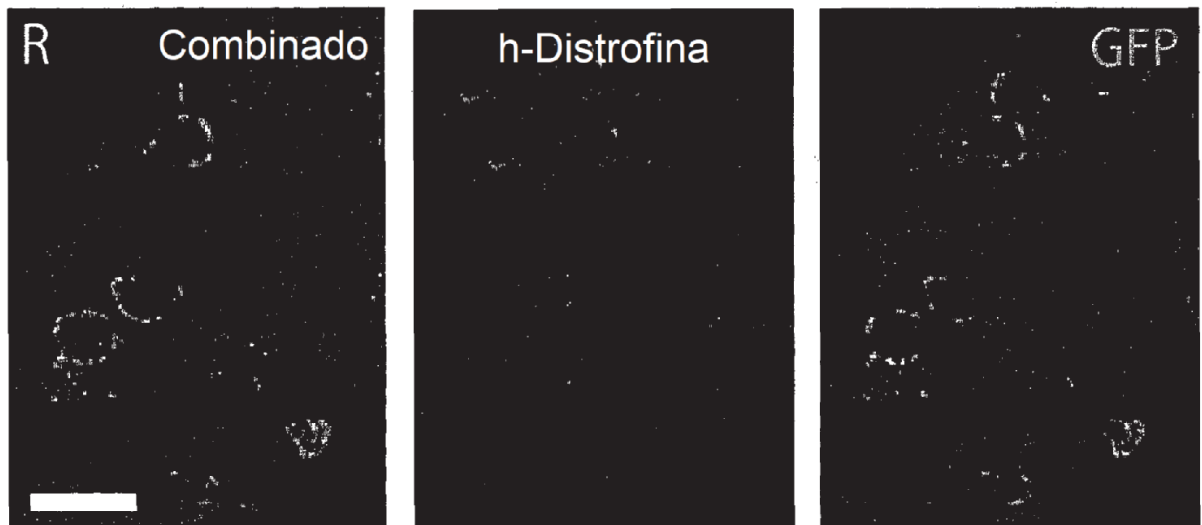


Fig. 17-1

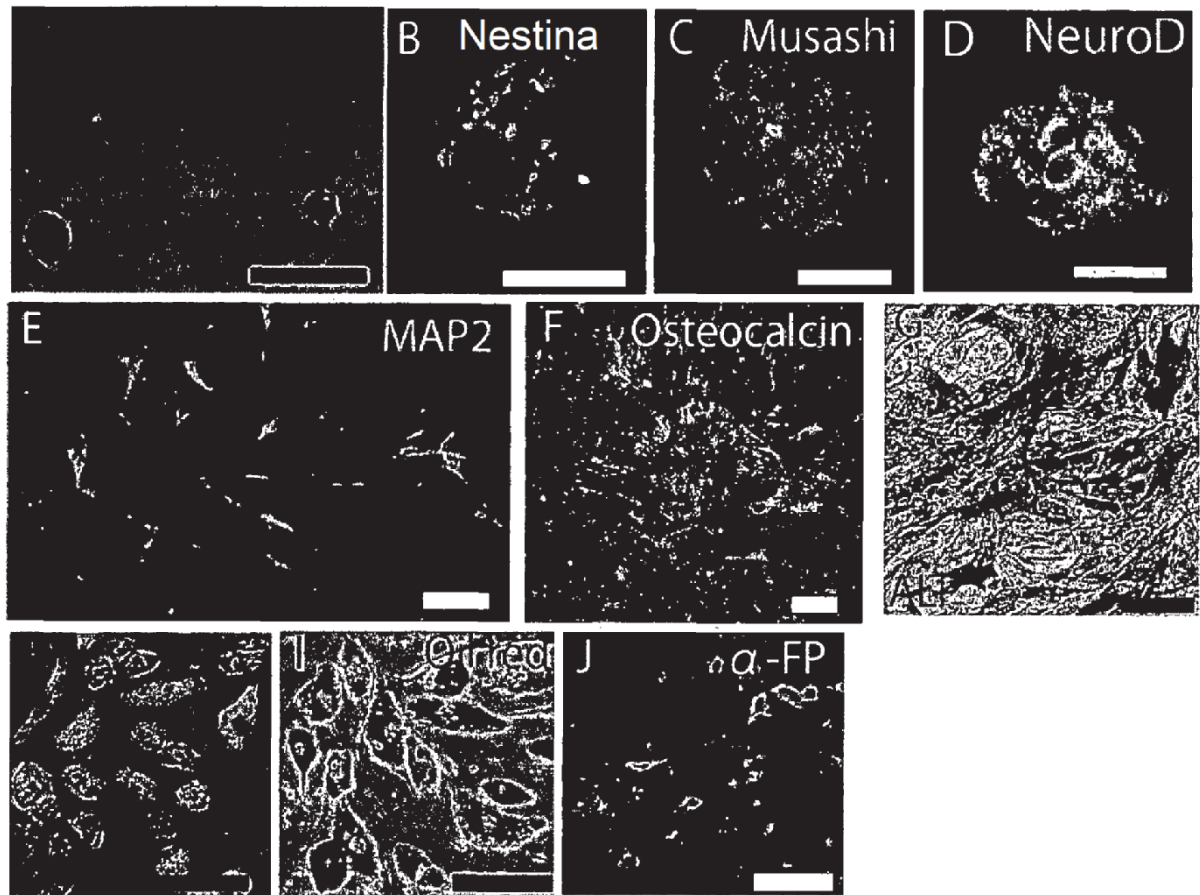


Fig. 17-2

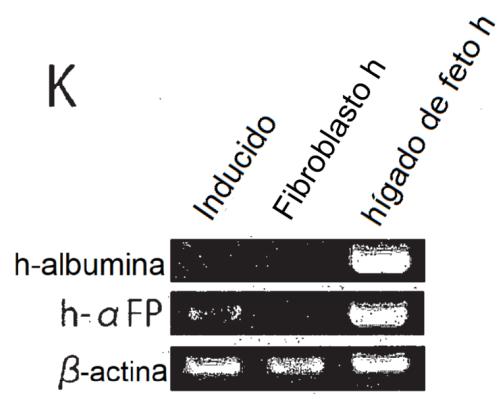


Fig. 18-1

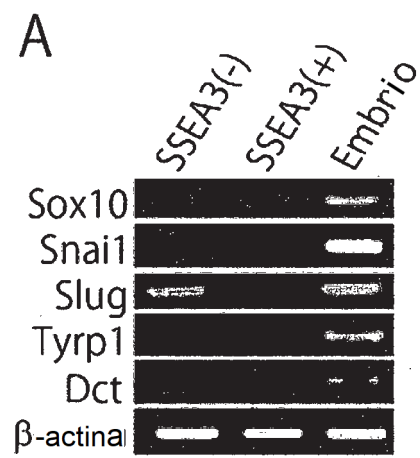


Fig. 18-2

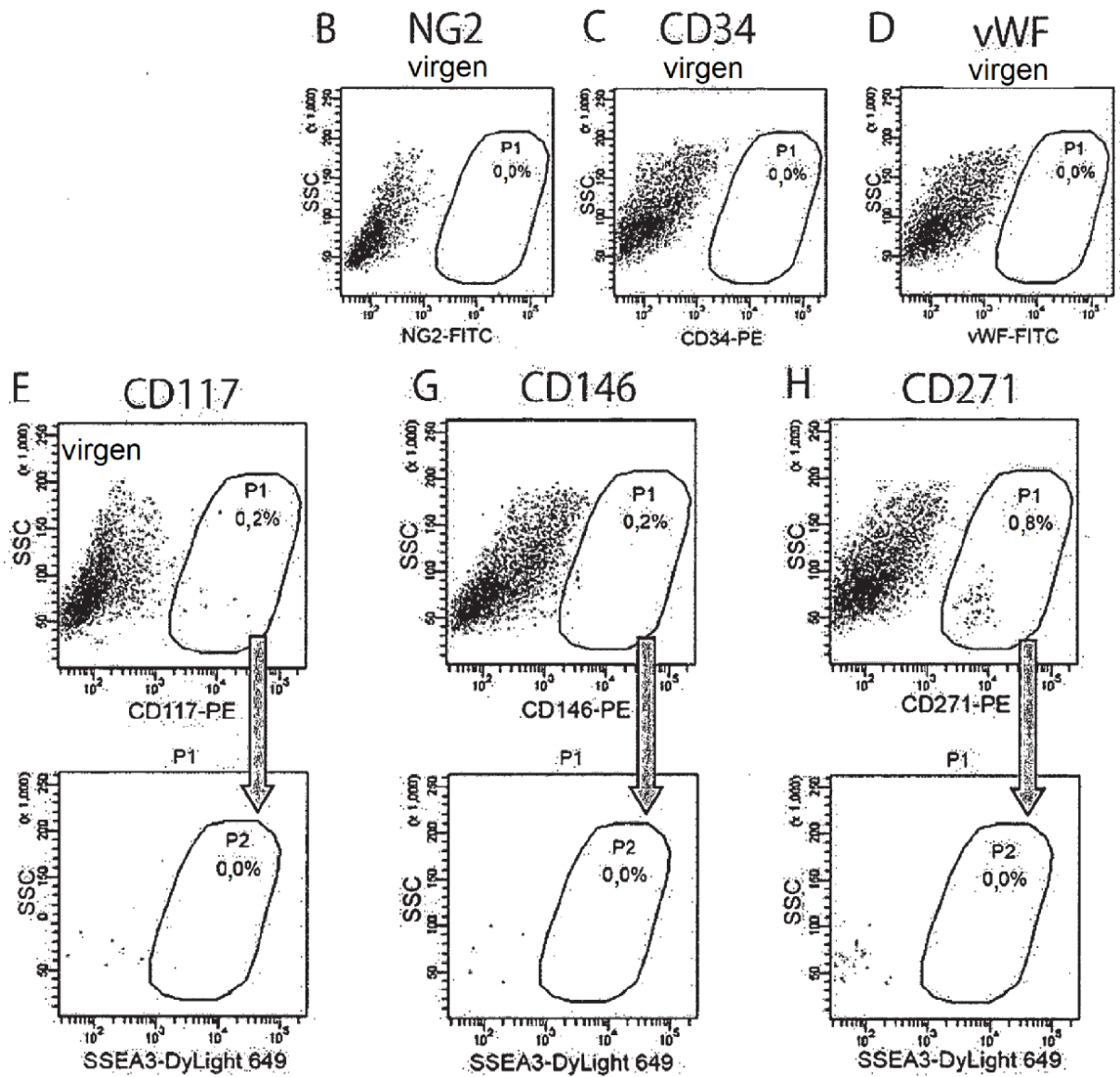


Fig. 18-3

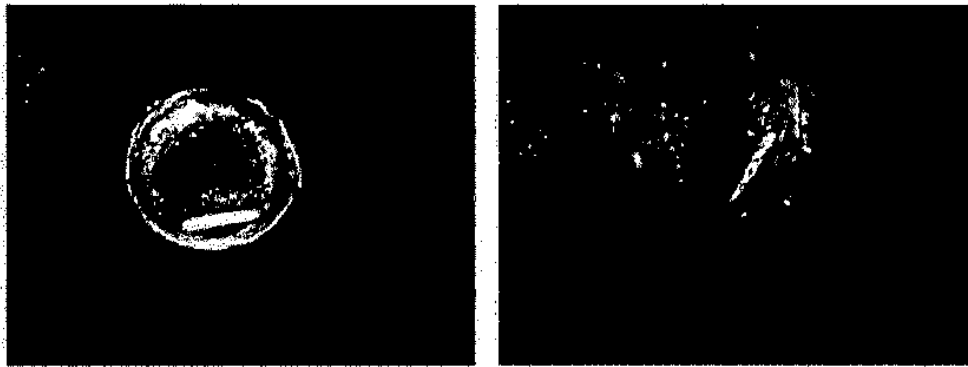


Fig. 19

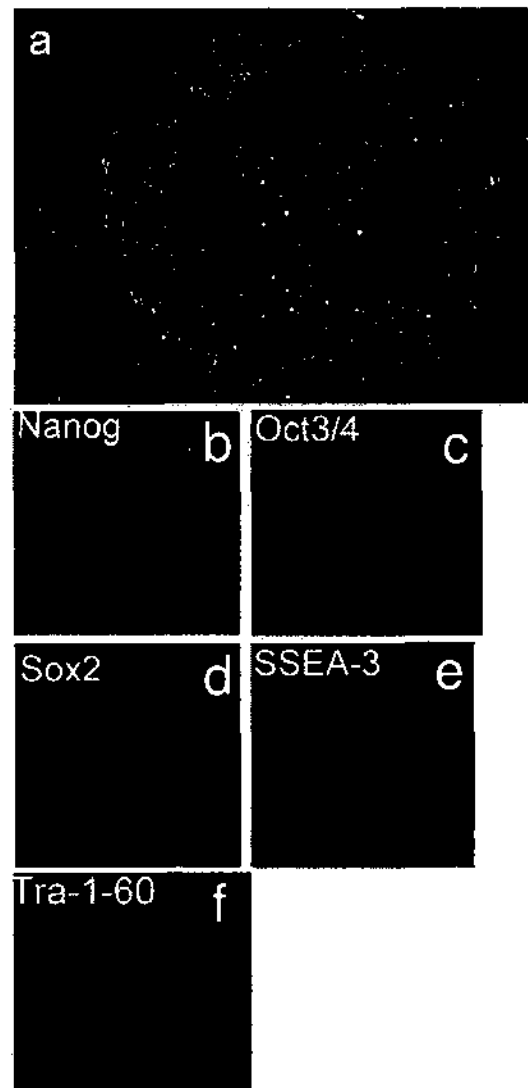


Fig. 20



Fig. 21

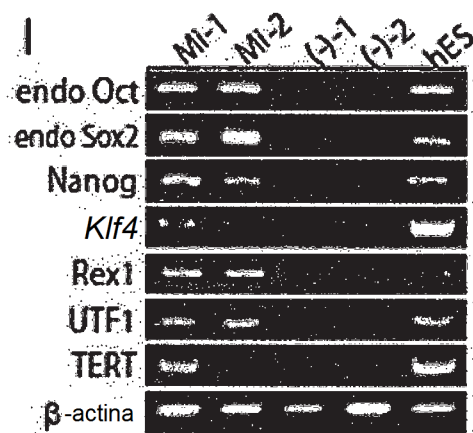


Fig. 22-1

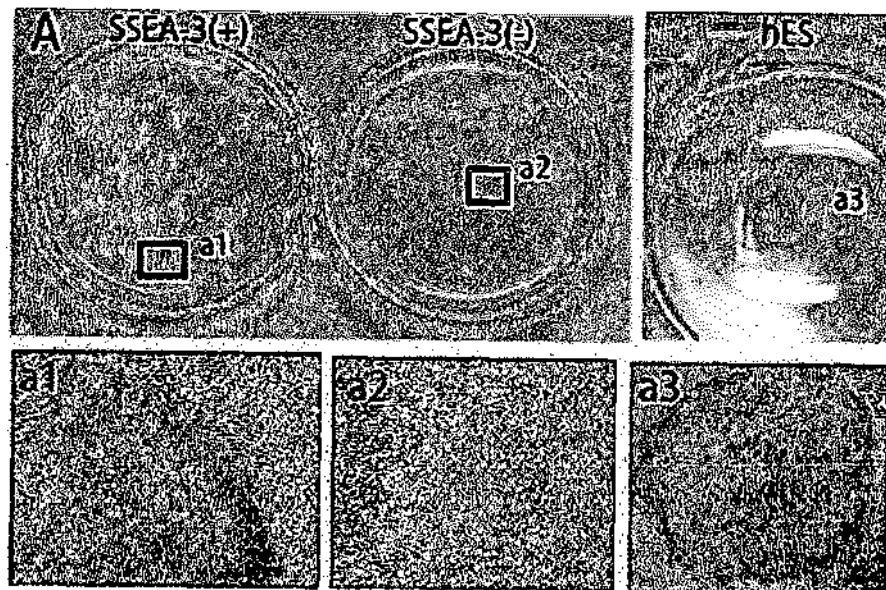


Fig. 22-2

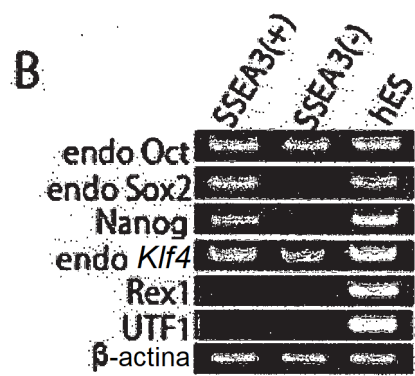


Fig. 22-3

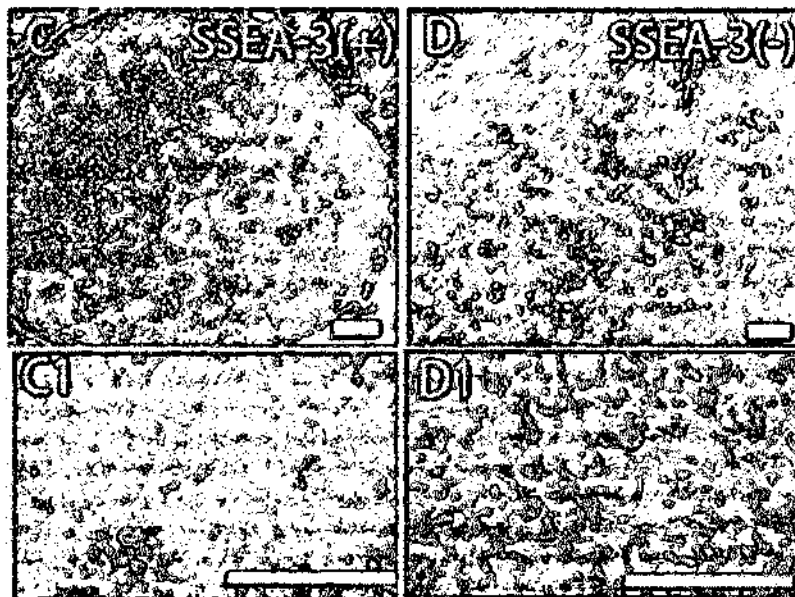


Fig. 23-1

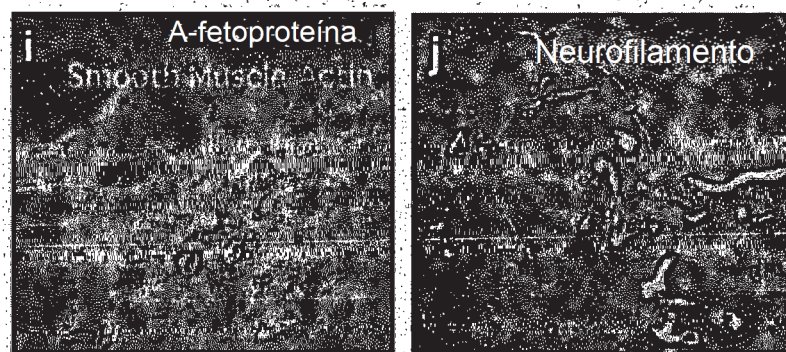


Fig. 23-2

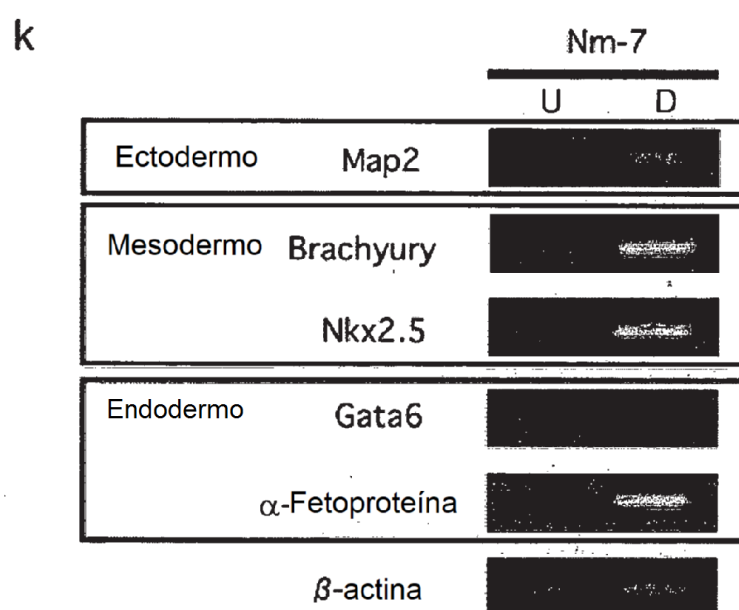


Fig. 23-3

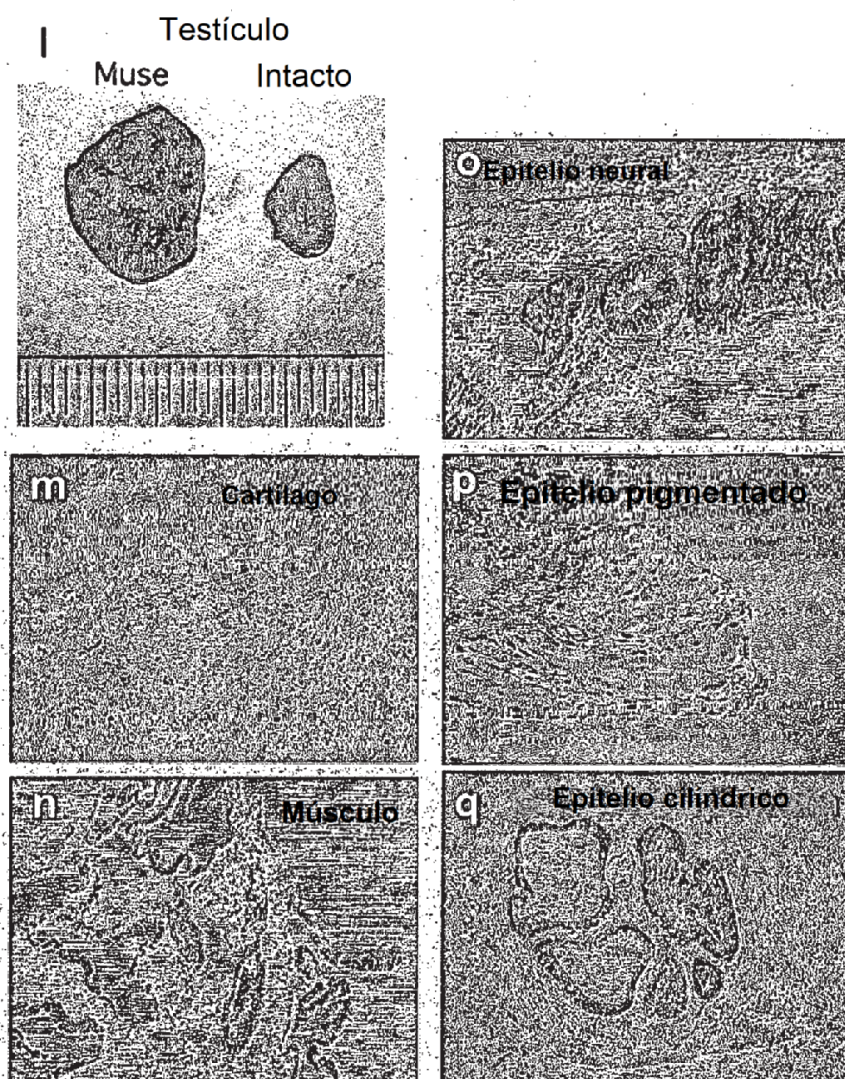


Fig. 24

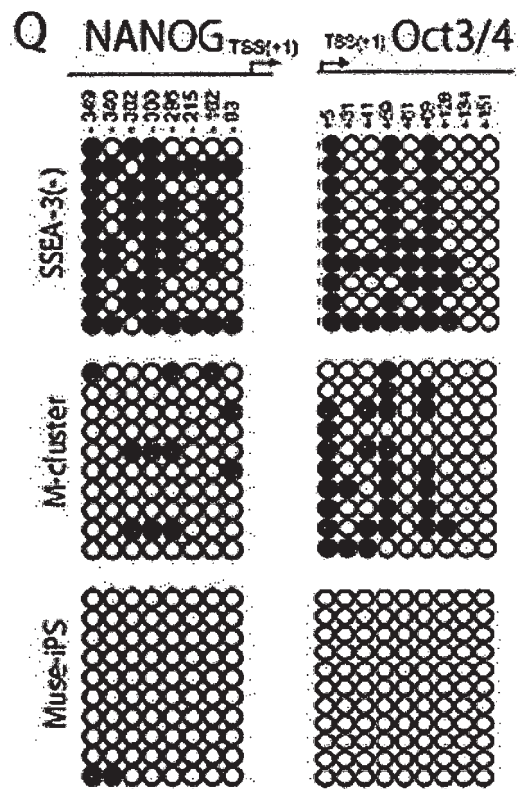


Fig. 25

Símbolo	Descripción	/Virgen		/iPS	
		Grupo	iPS	Grupo	
ABU	Oncogén C-abl 1, receptor tirosina cinasa				1,2E+00
ANAPC2	Subunidad 2 del complejo promotor de anafase				8,5E-01
ANAPC4	Subunidad 4 del complejo promotor de anafase				5,0E-01
ATM	Mutado en ataxia telangiectasia				1,7E+00
ATR	Relacionado con ataxia telangiectasia y Rad3				9,5E-01
BRCA1	Cáncer de mama 1, aparición prematura				1,03E-01*
CCNB1	Ciclina B1				5,9E-02*
CCNB2	Ciclina B2				6,6E-02*
CCNC	Ciclina C				2,2E-01*
CCND1	Ciclina D1				3,7E+00**
CCND2	Ciclina D2				1,0E-01*
CCNE1	Ciclina E1				1,0E-01*
CCNF	Ciclina F				1,1E-01*
CCNG1	Ciclina G1				4,1E-01
CCNG2	Ciclina G2				1,1E+01**
CCNH	Ciclina H				6,6E-01
CCNT1	Ciclina T1				5,8E-01
CCNT2	Ciclina T2				4,0E-01
CDC16	Homólogo 16 del ciclo de división celular (<i>S. cerevisiae</i>)				3,3E-01*
CDC2	Ciclo de división celular 2, G1 a S y G2 a M				6,4E-02*
CDC20	Homólogo 20 del ciclo de división celular (<i>S. cerevisiae</i>)				3,3E-02*
CDC34	Homólogo 34 del ciclo de división celular (<i>S. cerevisiae</i>)				4,7E-01
CDK2	Cinasa 2 dependiente de ciclina				3,0E-01*
CDK4	Cinasa 4 dependiente de ciclina				6,4E-01*
CDK5R1	Cinasa 5 dependiente de ciclina, subunidad reguladora 1 (p35)				2,2E-01*
CDK5RAP1	Proteína 1 asociada a la subunidad reguladora de CDK5				3,2E-01*
CDK6	Cinasa 6 dependiente de ciclina				5,7E-01
CDK7	Cinasa 7 dependiente de ciclina				3,5E-01
CDK8	Cinasa 8 dependiente de ciclina				4,7E-01
CDKN1A	Inhibidor 1A de cinasa dependiente de ciclina (p21, Cip1)				8,3E+01**
CDKN1B	Inhibidor 1B de cinasa dependiente de ciclina (p27, Kip1)				8,2E-01
CDKN2A	Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina (melanoma, p16, inhibe CDK4)				3,7E+02**
CDKN2B	Inhibidor 2B de cinasa dependiente de ciclina (p15, inhibe CDK4)				7,8E+01**
CDKN3	Inhibidor 3 de cinasa dependiente de ciclina (fosfatasa de especificidad doble asociada a CDK2)				1,3E-01*
CHEK1	Homólogo del punto de comprobación CHK1 (<i>S. pombe</i>)				1,7E-01*
CHEK2	Homólogo del punto de comprobación CHK2 (<i>S. pombe</i>)				4,2E-01
CUL1	Cullina 1				4,2E-01
E2F4	Factor 4 de transcripción de E2F, de unión a p107/p130				4,8E-01
GADD45A	Detención del crecimiento e inducible por daño en el ADN, alfa				5,1E+00**
MAD2L1	Deficiente en detención mitótica MAD2 de tipo 1 (levadura)				4,4E-02*
MAD2L2	Deficiente en detención mitótica MAD2 de tipo 2 (levadura)				8,2E-02*
MCM2	Componente 2 del complejo de mantenimiento de minicromosomas				5,6E-02*
MCM3	Componente 3 del complejo de mantenimiento de minicromosomas				5,7E-02*
MCM4	Componente 4 del complejo de mantenimiento de minicromosomas				2,2E-01*
MCM5	Componente 5 del complejo de mantenimiento de minicromosomas				3,3E-02*
MNAT1	Homólogo 1 de <i>Menage a trois</i> , factor de ensamblaje a ciclina H (<i>Xenopus laevis</i>)				6,8E-01
MRE11A	Homólogo A de recombinación meiótica 11 MRE11 (<i>S. cerevisiae</i>)				3,7E-01
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación				2,0E-01*
RAD51	Homólogo de RAD51 (homólogo de RecA, <i>E. coli</i>) (<i>S. cerevisiae</i>)				7,0E-02*
RB1	Retinoblastoma 1 (incluyendo osteosarcoma)				4,0E+00**
RBBP8	Proteína 8 de unión a retinoblastoma				1,8E-01*
RBL1	Retinoblastoma de tipo 1 (p107)				2,3E-01*
RBL2	Retinoblastoma de tipo 2 (p130)				5,5E+00**
RPA3	Proteína A3 de replicación, 14 kDa				1,3E-01*
SKP2	Proteína 2 asociada a cinasa de fase S (p45)				1,2E-01*
TERT	Transcriptasa inversa telomerasa				0,0E+00*
TFDP1	Factor de transcripción Dp-1				8,4E-01
TFDP2	Factor de transcripción Dp-2 (compañero 2 de dimerización de E2F)				6,6E-01
TP53	Proteína tumoral p53				3,3E-01*

Fig. 26

Símbolo	Descripción	/Virgen Grupo	iPS	/iPS Grupo
ABCA13	casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 13			4,1E-01
ALPL	Fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón			2,9E-03*
ATRX	Alfa talasemia/síndrome de retraso mental ligado al X (homólogo de RAD54, <i>S. cerevisiae</i>)			9,9E-01
BMP4	Proteína morfogenética ósea 4			1,4E-01*
BMPR1A	Receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo IA			6,6E-01
CBX7	Homólogo 7 de cromosecuencia			5,5E+00**
CTR9	CTR9, componente del complejo PafI/ARN polimerasa II, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)			6,2E+01
DAZL	Eliminado en tipo de azoospermia			5,8E-02*
DDX4	Polipéptido 4 de secuencia (Asp-Glu-Ala-Asp) DEAD			5,0E-01
DNMT1	ADN (citosina-5-)-metiltransferasa 1			2,1E-01*
DNMT3B	ADN (citosina-5-)-metiltransferasa 3 beta			6,2E-04*
DPPA2	Asociado a pluripotencia en el desarrollo 2			1,6E-03*
DPPA3	Asociado a pluripotencia en el desarrollo 3			1,1E-02*
DPPA4	Asociado a pluripotencia en el desarrollo 4			1,1E-04*
EPC1	Homólogo 1 del potenciador de polycomb (<i>Drosophila</i>)			8,2E-01
ERAS	Ras expresado en células ES			1,1E-01*
F11R	Receptor de F11			2,0E-03*
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (tirosina cinasa 2 relacionada con fms, síndrome de Pfeiffer)			5,8E-01
FOXD3	Secuencia D3 de Forkhead			4,2E-04*
GDF3	Factor 3 de diferenciación del crecimiento			0,0E+00*
GRB7	Proteína 7 unida al receptor del factor de crecimiento			1,8E-03*
HAND1	Derivados de corazón y cresta neural expresados 1			1,9E-02*
HES1	Hirsuto y potenciador de división 1, (<i>Drosophila</i>)			1,4E+00
HEXIM1	Inducible por bisacetamida de hexametileno 1			2,8E+00
HOXB1	Homeosecuencia B1			4,7E-02*
ID1	Inhibidor 1 de unión a ADN, proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante			3,3E+00**
ID3	Inhibidor 3 de unión a ADN, proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante			3,0E+00**
IFITM1	Proteína 1 de membrana inducida por interferón (9-27)			1,7E-01*
KCNK3	Canal de potasio, subfamilia K, miembro 3			3,4E+00**
KITLG	Ligando de KIT			1,2E+01**
KLF4	Factor 4 de tipo Kruppel (intestino)			1,0E+00
LIN28	Homólogo de Lin-28 (<i>C. elegans</i>)			3,5E-04*
MSX2	Homeosecuencia 2 Msh			3,8E-01
MYC	Homólogo de oncogén vírico de la mielocitomatosis V-myc (aviar)			7,6E-01
NANOG	Homeosecuencia Nanog			4,0E-04*
NAT1	N-acetiltransferasa 1 (arilamina N-acetiltransferasa)			9,4E-01
NKX1-2	Homeosecuencia 2 NK1			2,3E-03*
NR0B1	subfamilia del receptor nuclear 0, grupo B, miembro 1			2,4E+01**
OCT3/4	Homeosecuencia 1 POU de clase 5			1,8E-02*
OTX2	Homeosecuencia 2 ortodéntico			0,0E+00**
PAN3	Homólogo de la subunidad ribonucleasa específica de poliA de PAN3 (<i>S. cerevisiae</i>)			4,5E-01
PODXL	Tipo podocalixina			3,8E-02*
PRDM1	Dominio PR que contiene 1, con dominio ZNF			1,0E+01**
RAG1AP1	Proteína 1 activadora del gen 1 activador de recombinación			8,6E-01
SALL4	Sal de tipo 4 (<i>Drosophila</i>)			6,4E-04*
SIX4	Homeosecuencia 4 SIX			9,9E-01
SOX2	SRY (región Y de determinación del sexo)-secuencia 2			7,4E-04*
SPAG9	Antígeno 9 asociado a esperma			1,3E+00
SPRY1	Homólogo 1 de Sprouty, antagonista de la señalización de FGF (<i>Drosophila</i>)			5,1E-01
SPRY2	Homólogo 2 de Sprouty (<i>Drosophila</i>)			1,9E+00
SSBP2	Proteína 2 de unión a ADN monocatenario			1,7E+00
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (factor de respuesta a fase aguda)			1,6E+00
TDGF1	Factor 1 del crecimiento derivado de teratocarcinoma			3,8E-05*
TFE3	Factor de transcripción de unión al potenciador 3 de IGHM			1,1E+00
TRDMT1	Ácido aspártico metiltransferasa 1 TRNA			7,3E-01
UTF1	Factor 1 de transcripción de células embrionarias indiferenciadas			0,0E+00*
VIM	Vimentina			1,4E+02**

Fig. 27

Animal	Factor de reprogramación ^b		Tipo de célula	Tiempo (semanas)	Eficacia
Ratón	Vectores de integración vírica O, K, S, M		MEF	2-3	0,01-0,50 %
	O, K, S, M		Hepatocito	2-3	1-3 %
	O, K, S, M		Células epiteliales gástricas	2-3	1-3 %
	O, K, S, M		linfocito B	2-3	0,01-0,10 %
	O, K, S, M		célula β	3-4	0,1-0,2 %
	O, K, S, M		Célula madre neural	1-2	3-5 %
	O, K, S		MEF	3-4	0,001-0,010 %
	O, K, S		Hepatocito	2-3	0,5-1,0 %
	O, K, M		Célula madre neural	1-2	0,1-1,0 %
	O, K, S		Célula madre neural	2-3	0,1-1,0 %
	O, M, S		Célula madre neural	3-4	0,1-1,0 %
	O, K		Célula madre neural	2-3	0,1-0,2 %
	O, M		Célula madre neural	3-4	0,1-0,2 %
	Vectores víricos no integradores ^c O, K, S, M		Hepatocito	4-5	0,0001 a 0,0010 %
Ser humano	Vectores basados en plásmido ^e O, K, S, M		MEF	3-4	0,0001 a 0,0010 %
	Vectores de integración vírica O, K, S, M		Fibroblasto dérmico	4-5	0,001-0,002 %
	O, K, L, N		Fibroblasto dérmico	2-3	N.D.
	O, K, S, M		Célula estromática de médula ósea	2-3	N.D.
	O, K, N		Fibroblasto dérmico	2-3	N.D.
	O, K, L		Fibroblasto dérmico	2-3	N.D.
	O, S, K ^d		Fibroblasto dérmico	4	0,1-1,0 %
	O, S ^d		Fibroblasto dérmico	4	0,001-0,010 %
	O, S, L, N ^e		Fibroblasto dérmico		0,002 % 0,0417 % N.D.
	O, K, S, M, T, LT O, K, S, M, p, U		Fibroblasto dérmico		
	MEF, Fibroblasto embrionario de ratón;		N.D. no determinado.		

^b O, Oct4; S, Sox2; M, c-Myc; K, Klf4; N, Nanog; L, Lin28; T, hTERT; LT, Antígeno T grande; p, p53RNAi; U, Utrf

^c Clones libres de integración.

^d Ácido valprónico (VPA) usado en asociación

^e CHIR99021, PD0325901, A-83-01