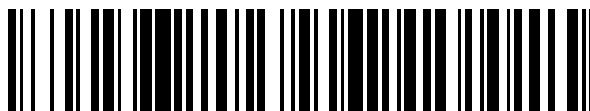


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 553**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/545 (2015.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2010 PCT/US2010/020884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10083203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2010 E 10732028 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2387609**

54 Título: **Células madre no embrionarias y usos de las mismas**

30 Prioridad:

13.01.2009 US 144206 P

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

11.07.2018

73 Titular/es:

**STEMBIOS TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2530 Corporate Place, Suite A112
Monterey Park, CA 91754 , US**

72 Inventor/es:

**WANG, JAMES y
YEN, YUN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 675 553 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre no embrionarias y usos de las mismas

Células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias (ES), pueden diferenciarse *in vivo* en todos los linajes celulares y, cuando se inducen *in vitro*, diferenciarse en la mayoría de los tipos de células. Células ES se pueden derivar de embriones de mamíferos primitivos. Debido a su potencia, se cree que albergan una gran promesa para el tratamiento de enfermedades degenerativas o hereditarias. Sin embargo, consideraciones éticas y logísticas han obstaculizado el uso de células ES humanas en la investigación y la terapia. Células madre pluripotentes de origen no embrionario (p. ej., de tejidos de animales adultos o jóvenes) soslayarían este obstáculo. Aunque algunas células madre se han obtenido de orígenes no embrionarios de este tipo, algunas de estas células tienen un potencial de desarrollo limitado. Además, logísticamente, estas células son difíciles de obtener y cantidades de las células son demasiado limitadas para cumplir con usos clínicos o de investigación significativos. Además, algunas de las células pueden convertirse en teratoma *in vivo* y, por lo tanto, no son deseables para usos *in vivo*. Existe la necesidad de células madre pluripotentes no embrionarias que sean más seguras y fáciles de obtener, y que tengan una fuente abundante.

Sumario

Esta invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de que una población de células madre, preparadas a partir de orígenes no embrionarios pluripotente, puede obtenerse con un rendimiento muy elevado y no se desarrolla en un teratoma *in vivo*.

Por consiguiente, un aspecto de esta invención presenta un método para preparar una población de células madre pluripotentes. El método incluye obtener una pluralidad de células madre de tipo blastómero (BLSCs), cultivar las BLSCs en un medio que contiene ácido retinoico (RA) o factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e identificar y enriquecer células pluripotentes entre las células cultivadas. Las células pluripotentes expresan el ARNm de GADPH o beta-actina. En otras palabras, el nivel de ARNm de GADPH o beta-actina es detectable mediante el ensayo de RT-PCR de la manera descrita en la sección de ejemplos que figura más adelante.

Las células madre pluripotentes son generalmente de 1 a 15 micrómetros de tamaño, preferiblemente de 1 a 10 micrómetros de tamaño, y más preferiblemente de 1 a 5 micrómetros de tamaño. Estos tamaños son los de las células que están en suspensión o adheridas (es decir, células suspendidas o células adheridas).

La expresión "célula madre" se refiere a una célula que es capaz de diferenciarse en un cierto número de tipos de células diferenciadas finales. Las células madre pueden ser totipotentes o pluripotentes. Las células madre totipotentes tienen típicamente la capacidad de convertirse en cualquier tipo de célula.

Células pluripotentes son típicamente células capaces de diferenciarse en varios tipos de células diferenciadas finales, diferentes. Células madre unipotentes pueden producir solo un tipo de célula, pero tienen la propiedad de auto-renovación que las distingue de las células no madre. Estas células madre pueden proceder de diversos sistemas de tejidos u órganos, que incluyen, pero no se limitan a sangre, nervio, músculo, piel, intestino, hueso, riñones, hígado, páncreas, timo y similares. De acuerdo con la presente invención, la célula madre se deriva de un tejido u órgano adulto o neonatal. BLSC, que se describirá en detalle más adelante, es una población de células madre no embrionarias en animales adultos o jóvenes. Estas células tienen una capacidad de diferenciación similar a la de las células madre embrionarias. Véase el documento WO2007/100845.

Células obtenidas al cultivar BLSCs en un medio que contiene RA se denominan SBR. En una realización, el medio contiene RA 0,1 a 20 μ M y las BLSCs se pueden cultivar durante 2 a 8 semanas. En otra realización, el medio contiene RA 1 a 15 μ M y las BLSCs se cultivan durante 2 a 8 semanas. En aún otra realización, el medio contiene RA 5 a 12 μ M y las BLSCs se cultivan durante 3 a 4 semanas. Las células SBR pluripotentes o totipotentes, así preparadas, son de 1 a 15 micrómetros (tal como de 1 a 10, de 1 a 5, de 2 a 5 o de 3 a 5 micrómetros) de tamaño y pueden formar en suspensión una estructura similar a una lámina.

Las células obtenidas cultivando BLSCs en un medio que contiene TGF- β se denominan SBT. En una realización, el medio contiene TGF- β 1 a 40 nM y las BLSCs se cultivan durante 2 a 8 semanas. En otra realización, el medio contiene TGF- β 2 a 20 nM y las BLSCs se cultivan durante 2 a 8 semanas. En aún otra realización, el medio contiene TGF- β 5 a 12 nM y las BLSCs se cultivan durante 4 a 6 semanas. Las células SBT pluripotentes o totipotentes son de 1 a 15 micrómetros (tal como 1 a 10, 1 a 5, 2 a 5 o 3 a 5 micrómetros) de tamaño, tienen forma redonda y pueden formar agregación.

Otro aspecto de esta invención presenta una composición que contiene una pluralidad de las células cultivadas mencionadas anteriormente, que (1) son pluripotentes o totipotentes, (2) tienen un tamaño de 1 - 15 micrómetros y (3) expresan el ARNm de GADPH o beta-actina. Las células se pueden preparar mediante el método descrito anteriormente. La composición puede contener, además, RA o TGF- β . En una realización, las células son CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CXCR4⁺. En otra realización, las células son tinción de azul de tripano negativas. Es decir, las

células muestran la exclusión del azul tripano. En aún otra realización, las células cultivadas contienen una primera población de las células que son CD66e⁺ y una segunda población de las células que son CD66e⁻.

Las células son sustancialmente puras. La expresión "sustancialmente puras", cuando se utiliza en referencia a células madre o células derivadas de las mismas (p. ej., células diferenciadas), significa que las células especificadas constituyen la mayoría de las células en la preparación (es decir, más del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%). Generalmente, una población de células sustancialmente purificada constituye al menos aproximadamente 70% de las células en una preparación, habitualmente aproximadamente 80% de las células en una preparación, y particularmente al menos aproximadamente 90% de las células en una preparación (p. ej., 95%, 97%, 99% o 100%). Como tal, un método de la invención proporciona la ventaja de que puede obtenerse una población sustancialmente pura de un tipo particular de células (p. ej., células SBR o SBT) sin contaminación por parte de otros tipos de células.

Las células cultivadas recién descritas pueden utilizarse para expresar polipéptidos recombinantes exógenos. Por lo tanto, dentro del alcance de esta invención están dichas células cultivadas, cada una de las cuales incluye un ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico recombinante puede codificar un polipéptido y la célula puede contener un ARNm que codifica el polipéptido.

Las células cultivadas descritas pueden manipularse genéticamente de modo que no expresen el gen beta2-microglobulina o no expresen una o más proteínas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I que desencadenan una reacción mediada por linfocitos T contra la célula. Estas células se pueden utilizar como células de donantes universales, ya que no conducen a rechazos de injertos por parte del huésped.

Se describe, además, un método para tratar una enfermedad degenerativa en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición arriba descrita, que contiene una o más de las células pluripotentes arriba descritas. Al menos una de las células incluye un ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico recombinante puede codificar un polipéptido y la célula puede contener un ARNm que codifica el polipéptido. Ejemplos de la enfermedad degenerativa incluyen diabetes, una enfermedad neurodegenerativa, artritis y cáncer. Ejemplos de la enfermedad neurodegenerativa incluyen la enfermedad de Parkinson.

En otro aspecto, se describe un método para tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición arriba descrita.

Un sujeto a tratar por uno de los trastornos arriba descritos puede identificarse mediante técnicas de diagnóstico estándares para ese trastorno particular. "Tratar" se refiere a la administración de una composición (p. ej., una composición celular) a un sujeto, que padece o está en riesgo de desarrollar ese trastorno, con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, retrasar el inicio de, prevenir o mejorar el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado de la enfermedad secundario al trastorno o la predisposición al daño/trastorno. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado. El método de tratamiento puede realizarse solo o en unión con otros medicamentos o terapias.

En aún otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un fármaco candidato para tratar una enfermedad degenerativa. El método incluye las etapas de poner en contacto un compuesto de ensayo con la composición o células arriba descritas y determinar el nivel de expresión de un polipéptido que está regulado negativamente en la enfermedad degenerativa. El nivel de expresión en presencia del compuesto de ensayo, si es más alto que el nivel en ausencia del compuesto, indica que el compuesto es un candidato para tratar la enfermedad. Ejemplos de las enfermedades degenerativas incluyen diabetes, una enfermedad neurodegenerativa, artritis, cáncer o un trastorno autoinmune. El nivel de expresión puede determinarse en el nivel de ARNm o en el nivel de proteína.

En aún otro aspecto, la invención presenta un método para introducir un ácido nucleico heterólogo en un sujeto. El método incluye las etapas de obtener la composición o las células arriba descritas, en que al menos una de las células incluye un ácido nucleico heterólogo, y administrar la célula a un sujeto que lo necesite. El ácido nucleico heterólogo puede codificar un polipéptido. Una vez administrada, la célula expresa el polipéptido en el sujeto.

El término "heterólogo" es un término relativo, que cuando se utiliza con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más sub-secuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico que se produce de forma recombinante tiene típicamente dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos sintéticamente para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, p. ej., un promotor de una fuente y una región codificadora de otra fuente. Los dos ácidos nucleicos son así heterólogos entre sí en este contexto. Cuando se añaden a una célula, los ácidos nucleicos recombinantes también serían heterólogos a los genes endógenos de la célula. Por lo tanto, en un cromosoma, un ácido nucleico heterólogo incluiría un ácido nucleico no nativo (que no se produce de forma natural) que se ha integrado en el cromosoma, o un ácido nucleico extracromosómico no nativo (que no se produce de forma natural). Por el contrario, un trozo de

5 cromosoma traslocado de forma natural no se consideraría heterólogo en el contexto de esta solicitud de patente, ya que comprende una secuencia de ácido nucleico endógena que es nativa de la célula mutada. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más sub-secuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (p. ej., una "proteína de fusión", en donde las dos sub-secuencias son codificadas por una única secuencia de ácido nucleico). Una proteína de este tipo puede generarse mediante técnicas recombinantes.

10 El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia, p. ej., a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta forma. Por lo tanto, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (que se produce de forma natural) de la célula o expresan una segunda copia de un gen nativo que de otro modo se expresa de forma normal o anormal, se sub-expresa o no se expresa en absoluto.

15 Dentro del alcance de esta invención, hay un banco o colección de células que tiene una pluralidad de composiciones arriba descritas, cada una de las cuales contiene una población de células cultivadas pluripotentes. Las células pueden ser células humanas o células no humanas. El banco puede producirse recolectando células de una pluralidad de sujetos para obtener una pluralidad de poblaciones de BLSCs, respectivamente; caracterizar las poblaciones de células para obtener al menos una característica predeterminada para cada una y catalogar cada una de las poblaciones de células de acuerdo con la al menos una característica predeterminada. Para producir el
20 banco, se puede expandir aún más las poblaciones de células. Ejemplos de la característica incluyen el nombre del sujeto, el sexo, las condiciones físicas (incluidos los trastornos genéticos y la información del MHC).

25 Un sujeto se refiere a un ser humano o un animal no humano. Ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (p. ej., ratones o ratas), cobayas, gatos, animales de granja (p. ej., caballos, vacas, ovejas o cerdos), y no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o animal adecuado como un modelo de la enfermedad.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se establecen en la descripción que figura a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones.

30 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-1C son histogramas de citometría de flujo que muestran los resultados de obtener BLSCs por hemólisis.

Las Figuras 2A-2C son histogramas de citometría de flujo que muestran los resultados de obtener BLSCs a partir de fracciones de plasma.

35 Las Figuras. 3A-3C son fotografías que muestran BLSCs cultivadas que forman una estructura de red de malla multicapa.

La Figura 4 es una fotografía que muestra BLSCs cultivadas que proceden de agregaciones.

La Figura 5 es una fotografía que muestra BLSCs cultivadas que forman agregaciones de células similares a esferas.

40 Las Figuras 6-8 son fotografías que muestran células SBR preparadas a partir de BLSCs cultivadas en presencia de ácido retinoico.

Las Figuras 9-12 son fotografías que muestran células SBT preparadas a partir de BLSCs cultivadas en presencia de TGF- β .

45 La Figura 13 es una fotografía de los resultados de RT-PCR que muestra la expresión de GADPH o beta-actina en células SBR y SBT, y la falta de la expresión en BLSC.

Descripción detallada

50 Se ha sugerido que células ES pueden utilizarse para regenerar diversos tipos de células (tales como células neuronales o gliales en el cerebro) y de ese modo tratar diversos trastornos degenerativos o daño tisular. Sin embargo, consideraciones éticas y logísticas han obstaculizado el uso de células ES. Células madre de origen no embrionario, es decir, células madre post-natales (p. ej., células madre mesenquimatosas derivadas de la médula

ósea (MSCs)) representan una alternativa prometedora. No obstante, esta alternativa no siempre es aceptable, debido a la consideración logística y una capacidad limitada de proliferación/diferenciación.

Esta invención se refiere a una población de células madre, células SBR o células SBT, preparada a partir de orígenes no embrionarios. Al igual que las células ES, estas células son pluripotentes. De manera más importante, se pueden obtener con un rendimiento muy alto y no se convierten en teratoma *in vivo*. Por lo tanto, pueden utilizarse para regenerar células funcionales diferenciadas en el tratamiento de diversos trastornos degenerativos o daño tisular. Tal como se muestra en la sección de Ejemplo que figura más adelante, las células SBR y SBT pueden fabricarse, mantenerse y expandirse fácilmente *in vitro*, e inducirse a la diferenciación utilizando enfoques técnicos rutinarios. Además, después de injertar las células en un sujeto animal (p. ej., un ratón), no existe evidencia de células mitóticamente activas, teratomas o crecimiento maligno. Debido a estas ventajas, las células representan una alternativa a otras células madre.

Estas células SBR y SBT se preparan a partir de células madre de tipo blastómero (BLSCs). Las BLSCs son una población de células madre no embrionarias en animales adultos o jóvenes. Estas células tienen una capacidad de diferenciación similar a la de las células madre embrionarias. Véase el documento WO2007/100845. Al contener un complemento cromosómico normal, las BLSCs no tienen linaje y pueden formar todas las células somáticas (no reproductivas) del cuerpo. También pueden formar espermatozoides y/u óvulos reproductores, y células y tejidos de las porciones embrionarias y fetales de la placenta. Las células responden a agentes de inducción de linaje, agentes de proliferación y agentes inhibidores de la diferenciación. Por otro lado, no responden a agentes de progresión. De manera similar a las células madre similares a epiblastos, las BLSCs no son inhibidas por contacto en la confluencia, sino que forman múltiples capas confluentes de células siempre que se mantengan con un suministro adecuado de nutrientes. Las BLSCs no expresan marcadores de expresión fenotípicos para células progenitoras o diferenciadas, células madre de linaje de la capa germinal o células madre de tipo epiblasto. En su lugar, expresan marcadores de linaje embrionario general y específico, tales como los marcadores de células madre embrionarias CD66e, HCEA, CEA y CEA-CAM-1. Las BLSCs son normalmente inactivas en tejidos adultos. Sin embargo, cuando dichos tejidos se lesionan, las BLSC se activan y se diferencian para reparar los tejidos dañados.

En comparación con otras células madre, las BLSCs pueden obtenerse a partir de un tejido post-natal con un rendimiento muy elevado. Por ejemplo, se pueden obtener a partir de sangre con un rendimiento de más de 2×10^8 /ml de sangre. Por otro lado, dado que las BLSCs son inactivas y no expresan genes, sus usos para fines de investigación y terapéuticos son limitados.

Fue inesperado que el cultivo de BLSCs con determinados productos químicos generara células madre totipotentes o pluripotentes que expresan genes endógenos y genes heterólogos. Dos de tales poblaciones de células madre pluripotentes son células SBR y células SBT. Para obtener células SBR y SBT, se pueden incubar BLSCs en presencia de RA y TGF- β , respectivamente.

Las BLSCs pueden prepararse mediante los métodos descritos en la sección de Ejemplos que figura más adelante o mediante el método descrito en el documento WO2007/100845. Generalmente, las células se pueden aislar de muchos tejidos de animales adultos o jóvenes, incluyendo sangre, médula ósea y músculo esquelético. Para confirmar que las células aisladas son de hecho BLSCs, se puede examinar un cierto número de características, que incluyen (1) tamaños de células en suspensión que tienen menos de 1 μ m (2) marcadores de la superficie celular, p. ej., CD66e⁺ y (3) tinción con azul tripano positivo. Se pueden utilizar anticuerpos contra marcadores de la superficie celular tales como CD66e. Estos se pueden conjugar con marcadores adecuados tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o puntos cuánticos. Las BLSCs, que son CD66e⁺, se pueden enriquecer adicionalmente utilizando citometría de flujo (Figuras. 1-2).

Las células enriquecidas se someten luego a ensayo mediante técnicas estándares. Para confirmar el potencial de diferenciación de las células, éstas pueden ser inducidas a formar, por ejemplo, células neurogliales, osteocitos y adipocitos por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden hacerse pasar y cultivarse hasta la confluencia, desplazarse a un medio osteogénico o un medio adipogénico, y se pueden incubar durante un tiempo adecuado (p. ej., 3 semanas). El potencial de diferenciación para la osteogénesis se evalúa mediante la mineralización de la acumulación de calcio, que puede visualizarse mediante tinción de von Kossa. Para examinar la diferenciación adipogénica, gotitas de lípidos intracelulares pueden teñirse con Oil Red O y observarse bajo un microscopio. Para la diferenciación neuronal, las células pueden incubarse en un medio neurogénico durante un tiempo adecuado (p. ej., 7 días), y luego someterse a depleción sérica e incubación de β -mercaptoetanol. Después de la diferenciación, las células exhiben la morfología del cuerpo celular refráctil con estructuras similares a neuritas extendidas, dispuestas en una red. La tinción inmunocitoquímica de los marcadores específicos para el linaje se puede llevar a cabo para confirmar la diferenciación neural. Ejemplos de los marcadores incluyen neurona β -tubulina de clase III específica (Tuj-1), neurofilamento y GFAP.

Alternativamente, para confirmar la identidad de las células aisladas, se puede aprovechar la ausencia de inhibición por contacto de BLSC. Con ese fin, se pueden cultivar las células aisladas hasta la confluencia. Bajo esa condición, las BLSCs pueden formar una agregación de células similar a una esfera, múltiples capas confluentes o estructuras

de redes de malla. Por el contrario, las células CD42⁺ no pueden formar la estructura recién mencionada, tal como la agregación celular.

Las BLSCs, así confirmadas, pueden propagarse adicionalmente en un cultivo de medio no diferenciador para más de 10, 20, 50 o 100 duplicaciones de población sin indicaciones de diferenciación espontánea, senescencia, cambios morfológicos, aumento de la tasa de crecimiento o cambios en la capacidad de diferenciarse en neuronas. Las células pueden almacenarse por métodos estándares antes de su uso.

Para preparar células SBR, las BLSCs se pueden cultivar en presencia de RA 0,1 a 20 μ M durante 2 a 8 semanas. En una realización preferida, las BLSCs se cultivan en presencia de RA 1 a 15 μ M durante 2 a 8 semanas, o más preferiblemente, en presencia de RA 5 a 12 μ M durante 3 a 4 semanas. Las células pluripotentes, así preparadas, son de 1 a 15 micrómetros de tamaño y pueden formar en suspensión una estructura similar a una lámina. Se puede utilizar cualquier RA disponible comercialmente que sea adecuado para el cultivo celular.

Para preparar células SBT, las BLSCs se pueden cultivar en presencia de TGF- β 1 a 40 nM durante 2 a 8 semanas. En una realización preferida, las BLSCs se cultivan en presencia de TGF- β 2 a 20 nM durante 2 a 8 semanas, o más preferiblemente, en presencia de TGF- β 5 a 12 nM durante 4 a 6 semanas. Las células pluripotentes son de 1 a 15 micrómetros de tamaño, tienen una forma redonda y pueden formar agregación. Si bien se puede utilizar cualquier tipo de TGF- β , se prefiere TGF- β altamente purificado. Ejemplos de TGF- β incluyen TGF- β de mamífero (p. ej., TGF- β humano) o TGF- β que tiene sustancialmente la misma actividad biológica que TGF- β de mamífero. Se pueden utilizar tanto TGF- β que se produce de forma natural como TGF- β modificado por ingeniería genética. El TGF- β obtenido mediante tecnología de ADN recombinante puede ser el que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el TGF- β que se produce de forma natural o uno funcionalmente equivalente del mismo. Un "equivalente funcional" se refiere a un derivado polipeptídico de un TGF- β que se produce de forma natural, p. ej., una proteína que tiene una o más mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, truncamientos, una proteína de fusión o una combinación de las mismas. El término "TGF- β " también cubre TGF- β modificado químicamente. Ejemplos de TGF- β modificado químicamente incluyen TGF- β sometido a cambio conformacional, adición o deleción de la cadena de azúcar, y TGF- β al que se ha unido un compuesto tal como polietilenglicol.

Las células SBR y las células SBT pueden confirmarse y distinguirse de BLSCs de acuerdo con sus tamaños, inhibición de contacto y exclusión con azul de tripano (es decir, tinción con azul tripano negativo). Las BLSCs son más pequeñas (menos de 1 micrómetro) que las células SBR y las células SBT, y carecen de inhibición por contacto o exclusión con azul tripano. Las células SBR y las células SBT también pueden confirmarse de acuerdo con marcadores celulares relacionados tales como CD10⁺, CD90⁺ y CXCR4⁺ mediante análisis de citometría de flujo u otro análisis estándares, tales como RT-PCR.

Las células SBR y las células SBT, así preparadas, se pueden someter adicionalmente a ensayo para determinar su pluripotencia de la misma manera que para las BLSCs arriba descritas u otras técnicas estándares conocidas en la técnica. Bajo condiciones de inducción apropiadas, estas células pueden diferenciarse en, p. ej., adipocitos, condrocitos y células en los linajes osteogénicos *in vitro*. Además, estas células son capaces de diferenciarse en células neurogliales bajo las condiciones de inducción arriba descritas.

La pluripotencia se puede ensayar *in vitro*. Por ejemplo, ratas cerebralmente isquémicas que reciben el trasplante intracerebral de células SBR o de células SBT exhiben una función neurológica significativamente mejorada que la rata de control tratada con vehículo. Los resultados indican que células SBR o células SBT administradas por vía intracerebral pueden penetrar en el cerebro, sobrevivir, migrar y mejorar la recuperación funcional de la apoplejía. De hecho, las células trasplantadas pueden diferenciarse en células gliales (GFAP⁺), neuronas (Nestina⁺, MAP-2⁺ y Neu-N⁺) y células endoteliales vasculares (vWF⁺) para potenciar el efecto neuroplástico en el cerebro isquémico. La actividad neuronal cortical evaluada por espectroscopia de protones MR (¹H-MRS) también está muy incrementada en el grupo de trasplante en comparación con el control. Además, la modulación significativamente incrementada de la expresión del factor neurotrófico en el hemisferio isquémico también se encuentra en el grupo de trasplante.

Las células SBR y las células SBT, así confirmadas, pueden propagarse en un cultivo de medio no diferenciador para más de 10, 20, 50 o 100 duplicaciones de poblaciones sin indicaciones de diferenciación espontánea, senescencia, cambios morfológicos, aumento de la tasa de crecimiento o cambios en la capacidad de diferenciarse en neuronas. Las células pueden almacenarse por métodos estándares antes de su uso.

Los términos "proliferación" y "expansión", tal como se utilizan de forma indistinta en esta memoria con referencia a células, se refieren a un aumento en el número de células del mismo tipo por división. El término "diferenciación" se refiere a un proceso de desarrollo mediante el cual las células se especializan para una función particular, por ejemplo, en el caso de que las células adquieran una o más características y/o funciones morfológicas diferentes de las del tipo de célula inicial. El término "diferenciación" incluye tanto el compromiso del linaje como los procesos de diferenciación terminal. La diferenciación se puede evaluar, por ejemplo, controlando la presencia o ausencia de marcadores de linaje, utilizando inmunohistoquímica u otros procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Células de la progenie diferenciadas derivadas de células progenitoras pueden estar, pero no necesariamente, relacionadas con la misma capa germinal o tejido que el tejido fuente de las células madre. Por ejemplo, células

progenitoras neuronales y células progenitoras musculares pueden diferenciarse en linajes celulares hematopoyéticos.

5 La expresión "compromiso de linaje" y el término "especificación", como se usan indistintamente en esta memoria, se refieren al proceso que experimenta una célula madre en el cual la célula madre da lugar a una célula progenitora comprometida para formar un intervalo limitado particular de tipos de células diferenciadas. Las células progenitoras comprometidas a menudo son capaces de auto-renovación o división celular.

10 La expresión "diferenciación terminal" se refiere a la diferenciación final de una célula en una célula madura, completamente diferenciada. Por ejemplo, células progenitoras neurales y células progenitoras musculares pueden diferenciarse en linajes celulares hematopoyéticos, cuya diferenciación terminal conduce a células de la sangre maduras de un tipo de célula específico. Habitualmente, la diferenciación terminal está asociada con la retirada del ciclo celular y el cese de la proliferación. La expresión "célula progenitora", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula que está comprometida con un linaje celular particular y que da lugar a células de este linaje mediante una serie de divisiones celulares. Un ejemplo de una célula progenitora sería un mioblasto, que es capaz de diferenciarse a un solo tipo de célula, pero que no está por sí mismo completamente maduro o completamente diferenciado.

1. Uso General

Las células SBR y las células SBT de la invención se pueden utilizar en una diversidad de formas. Se puede utilizar las células para tratar enfermedades degenerativas o hereditarias, evitando consideraciones éticas de la manipulación del embrión humano.

20 Para hacerlo, se pueden aislar BLSCs de un paciente, p. ej., que carece de un gen funcional esencial para el desarrollo adecuado de un tejido u órgano. Después de producir células SBR y células SBT a partir de la BLSC, se puede introducir en las células un vector de expresión de ácido nucleico que codifica una versión funcional del gen. El vector se puede introducir en las células mediante una diversidad de técnicas, que incluyen co-precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección o técnicas mediadas por virus. Se prefieren los métodos que no afectan a la pluripotencia de las células. La descripción de técnicas de este tipo puede encontrarse en, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s 7.422.736 y 5.591.625 y la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020127715. Después de suministrar el gen funcional a las células, se pueden trasplantar las células de nuevo al paciente utilizando el método conocido en la técnica. Dado que las células se producen a partir del paciente, el tratamiento no causa rechazo inmunitario.

30 Alternativamente, se puede hacer que células donantes universales utilicen células SBR y células SBT preparadas a partir de un sujeto sano. El método para hacer células donantes universales se conoce en la técnica y para hacer células SBR y células SBT universales se describirá más adelante.

35 Bajo condiciones adecuadas, las células SBR y las células SBT trasplantadas pueden convertirse en un tejido u órgano funcional. Para facilitar este desarrollo, al paciente se pueden administrar factores para inducir el desarrollo de las células. Dichos factores pueden ser compuestos de moléculas pequeñas, péptidos y ácidos nucleicos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a factor de crecimiento transformante β , proteínas morfogénicas óseas y factor de crecimiento nervioso.

40 Las células SBR y las células SBT también son útiles para estudiar el desarrollo o los mecanismos de diferenciación del desarrollo y la diferenciación del linaje. Se pueden identificar las condiciones para inducir el desarrollo de células madre pluripotentes en un tejido u órgano específico utilizando dichas células como un sistema modelo. Además, se pueden aislar genes que desempeñan papeles durante el desarrollo utilizando el cribado diferencial de ADNc conocido en la técnica. Véase, p. ej., Shen M. et al., Development, 124:429-42, 1997. Se puede preparar una colección de ADNc a partir de las células que han sido inducidas para desarrollarse en un determinado linaje, p. ej., el linaje neuro-glial arriba descrito. La colección puede luego utilizarse para aislar y estudiar genes expresados diferencialmente. Estos genes aislados pueden estudiarse más a fondo para definir sus papeles en los procesos respectivos. Las técnicas relacionadas son conocidas en la técnica. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 7.422.736 y la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20060035373. Las células SBR y las células SBT también se pueden utilizar para desarrollarse en órganos o clones de los animales utilizando los métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Campbell K. et al., Nature, 380: 64-66, 1996. Por consiguiente, estas células son valiosas para las industrias de mascotas y ganado, y se pueden utilizar para preservar animales en peligro de extinción.

2. Métodos de rastreo

Las células madre arriba descritas pueden utilizarse en ensayos de rastreo para identificar fármacos que pueden afectar a un tipo de célula particular de una manera que indique que el fármaco puede ser útil para tratar un trastorno asociado con el tipo de célula.

De este modo, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar un agente que altera una función de células SBR y células SBT no diferenciadas, poniendo en contacto las células con un agente de prueba. Un cambio en una función o expresión génica de las células en presencia del agente de prueba en comparación con la función en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba es un agente que altera la función o la expresión del gen en las células. La expresión "agente de prueba" se refiere a cualquier molécula que se está examinando para determinar la capacidad de alterar una función o expresión génica en las células. Aunque el método generalmente se utiliza como un ensayo de rastreo para identificar moléculas previamente desconocidas que tienen una actividad deseada, los métodos de rastreo de la invención también se pueden utilizar para confirmar un agente que se sabe que tiene una actividad particular.

La función puede ser la expresión de un gen que típicamente se expresa (o no se expresa) en las células, y el agente puede alterar la función aumentando o disminuyendo el nivel de expresión de un gen expresado (p. ej., disminución de la expresión de CD66e), o activar la expresión de un gen no expresado (p. ej., induciendo la expresión del antígeno específico para el linaje) en las células.

En una realización, el agente que afecta a una función de las células es uno que induce la diferenciación de las células, produciendo de ese modo células diferenciadas. Dichas células diferenciadas pueden ser células madre humanas multipotenciales (p. ej., células madre hematopoyéticas) o pueden ser células diferenciadas terminalmente (p. ej., células musculares, células neuronales, células de la sangre, tejido conjuntivo o células epiteliales). Como tal, el método puede utilizarse para identificar un agente que induce la diferenciación de células SBR y células SBT a células diferenciadas terminalmente que incluyen células beta pancreáticas, hepatocitos, cardiomiocitos, células de músculo esquelético o cualquier otro tipo de célula. Agentes o compuestos así identificados se pueden utilizar para tratar trastornos degenerativos, cáncer o trastornos inmunológicos.

El nivel de expresión puede determinarse en el nivel de ARNm o en el nivel de proteína. Métodos para medir los niveles de ARNm en una muestra son bien conocidos en la técnica. Para medir los niveles de ARNm, las células pueden lisarse y los niveles de ARNm en los lisados, purificados o no, pueden determinarse mediante, p. ej., ensayos de hibridación (utilizando sondas de ADN o ARN específicas de genes marcados de forma detectable) y RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa. RT-PCR (utilizando cebadores específicos de genes apropiados). Alternativamente, se pueden llevar a cabo ensayos de hibridación in situ cuantitativos o semi-cuantitativos en secciones de tejido o suspensiones celulares no lisadas utilizando sondas de ADN o ARN marcadas de forma detectable (p. ej., fluorescentes o enzimáticas). Métodos adicionales de cuantificación de ARNm incluyen el método de ensayo de protección de ARN (RPA) y el método de análisis de expresión génica en serie (SAGE), así como las tecnologías basadas en matrices.

Métodos para medir los niveles de proteína en una muestra también son bien conocidos en la técnica. Algunos de ellos emplean anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales o policlonales) que se unen específicamente a una proteína diana. En ensayos de este tipo, el propio anticuerpo o un anticuerpo secundario que se une a él pueden marcarse de forma detectable. Alternativamente, el anticuerpo puede conjugarse con biotina. Su presencia puede determinarse mediante avidina marcada de forma detectable (un polipéptido que se une a biotina). Combinaciones de estos enfoques (que incluyen ensayos de "sándwich multicapa") pueden utilizarse para potenciar la sensibilidad de las metodologías. Algunos ensayos de medición de proteínas (p. ej., ELISA o transferencia Western) se pueden aplicar a fluidos corporales o a lisados de células, y otros (p. ej., métodos inmunohistológicos o citometría de flujo de fluorescencia) se pueden aplicar a secciones histológicas o suspensiones celulares no lisadas. Marcadores apropiados incluyen radionucleidos (p. ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H o ^{32}P), enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa o β -galactosidasa), agentes fluorescentes/luminiscentes (p. ej., fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP, BFP y nanopartículas de Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, California). Otros métodos aplicables incluyen inmunoprecipitación cuantitativa o ensayos de fijación del complemento.

Un agente de prueba puede ser cualquier tipo de molécula, por ejemplo, un polinucleótido, un péptido, un peptidomimético, peptoides tales como peptoides vinílogos, una molécula orgánica pequeña, o similares, y puede actuar de diversas maneras para alterar una función de células SBR y células SBT. Por ejemplo, el agente de prueba puede actuar de forma extracelular uniéndose a un receptor de la superficie celular expresado por las células, alterando así una función mediada por la unión de un ligando que generalmente se une y actúa a través del receptor. Alternativamente, el agente de prueba puede ser uno que atraviesa la membrana celular, ya sea pasivamente o mediante un mecanismo de transporte activo, y actúa dentro de las células para alterar una función.

Un agente de prueba peptídico puede ser cualquier polímero de aminoácidos o análogos de aminoácidos, y puede variar de aproximadamente tres a cuatro residuos a cientos o miles. Agentes de prueba peptídicos se pueden preparar mediante síntesis química, o utilizando métodos de purificación de proteínas, seguido de proteólisis y, si se desea, purificación adicional mediante métodos cromatográficos o electroforéticos, o se pueden expresar a partir de un polinucleótido codificador. Un agente de prueba peptídico puede basarse en un péptido conocido, por ejemplo, un péptido que se produce de forma natural, pero puede variar de la secuencia que se produce de forma natural, por ejemplo, al contener uno o más análogos de aminoácidos.

Un agente polinucleotídico puede ser una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están unidos por un enlace fosfodiéster. Puede ser ARN o ADN, que puede ser un gen o una porción del mismo, un ADNc, un agente ARNi, una secuencia de ácido polidesoxi-ribonucleico sintético, o similares, y puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, así como un ADN/ARN híbrido. Puede ser una molécula de ácido nucleico que se produce de forma natural, que puede aislarse de una célula, así como una molécula sintética, que puede prepararse, por ejemplo, mediante métodos de síntesis química o mediante métodos enzimáticos tales como mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En diversas realizaciones, un polinucleótido de la invención puede contener análogos de nucleósidos o nucleótidos, o un enlace de la cadena principal distinto de un enlace fosfodiéster. Análogos de nucleótidos de este tipo son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el comercio, como lo son polinucleótidos que contienen análogos de nucleótidos de este tipo (Lin et al., Nucl. Acids Res. 22:5220-5234, 1994; Jellinek et al., Biochemistry 34:11363-11372, 1995; Pagratis et al., Nature Biotechnol. 15:68-73, 1997).

Un agente de ensayo polinucleotídico puede ponerse en contacto o introducirse en células SBR y células SBT utilizando métodos tal como se describen en esta memoria o conocidos de otro modo en la técnica. Generalmente, pero no necesariamente, el polinucleótido se introduce en la célula en donde efectúa su función directamente, o después de la transcripción o traducción, o ambas. Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar un agente de prueba peptídico, que se expresa en las células y altera una función de las células. Un agente de prueba polinucleotídico también puede ser o puede codificar una molécula antisentido, una ribozima o un agente de triplexación, que se puede diseñar para fijar como objetivo una o más moléculas de ácido nucleico diana específicas.

Agentes o compuestos candidatos a rastrear (p. ej., proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, anticuerpos, moléculas pequeñas u otros fármacos) pueden obtenerse utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de colecciones combinatorias conocidos en la técnica. Dichas colecciones incluyen: colecciones de péptidos, colecciones de peptoides (colecciones de moléculas que tienen las funcionalidades de los péptidos, pero con una nueva cadena principal no peptídica que es resistente a la degradación enzimática); colecciones de fases sólidas o de fases en solución paralelas direccionables en el espacio; colecciones sintéticas obtenidas por desconvolución o selección por cromatografía de afinidad; y las colecciones "one-bead one-compound". Véase, p. ej., Zuckermann et al. 1994, J. Med. Chem. 37:2678-2685; y Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12:145. Ejemplos de métodos para la síntesis de colecciones moleculares se pueden encontrar en, p. ej., DeWitt et al., 1993, PNAS USA 90:6909; Erb et al., 1994, PNAS USA 91:11422; Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al., 1993, Science 261:1303; Carrell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop et al., 1994 J. Med. Chem. 37:1233. Las colecciones de compuestos se pueden presentar en solución (p. ej., Houghten, 1992, Biotechniques 13:412-421), o en perlas (Lam, 1991, Nature 354:82-84), chips (Fodor, 1993, Nature 364:555-556), bacterias (Patente de EE.UU. N° 5.223.409), esporas (Patente de EE.UU. N° 5.223.409), plásmidos (Cull et al., 1992, PNAS USA 89:1865-1869), o fagos (Scott y Smith 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirla et al., 1990, PNAS USA 87:6378-6382; Felici 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310; y patente de EE.UU. N° 5.223.409).

3. Tratamiento de trastornos degenerativos

Se describe un método para tratar una enfermedad degenerativa, aliviar el síntoma del trastorno o retrasar la aparición del trastorno en un sujeto. Un sujeto a tratar puede identificarse mediante técnicas estándares para diagnosticar las afecciones o trastornos de interés. El método de tratamiento implica administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de las células SBR o SBT arriba descritas.

Una enfermedad degenerativa se refiere a un trastorno en el que la función o estructura de un tejido u órgano afectado se deteriora progresivamente con el tiempo, ya sea debido a defectos genéticos, lesiones, falta de diferenciación celular adecuada (p. ej., en trastornos proliferativos celulares), desgaste corporal normal o elecciones de estilo de vida. Ejemplos de enfermedades degenerativas incluyen enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (ALS)), otros trastornos del sistema nervioso (incluyendo mielitis transversa, desmielinización que se produce después de un trauma en el cerebro o la médula espinal, lesión cerebral aguda, traumatismo craneoencefálico, lesión de la médula espinal, lesión del nervio periférico, lesión cerebral isquémica, trastorno hereditario de la mielina del SNC, epilepsia, asfixia perinatal, asfixia, anoxia, estado epiléptico, síndrome de Shy-Drager, autismo y apoplejía), cáncer o una afección resultante de la terapia relacionada con el cáncer (p. ej., quimioterapia); trastornos metabólicos (p. ej., diabetes / diabetes mellitus, enfermedad de Niemann Pick); trastornos autoinmunes o relacionados con la inflamación (p. ej., eritematosis, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), postartritis, osteoartritis, osteoporosis, artritis reumatoide, lupus, diabetes y asma), trastornos oculares (tales como glaucoma, retinitis pigmentosa, enfermedad de Norrie y degeneración macular); trastornos cardíacos y circulatorios (p. ej., aterosclerosis, infarto de miocardio con insuficiencia cardíaca y enfermedad cardiovascular); trastornos sanguíneos tales como el síndrome de Wiscott Aldrich; distrofia muscular; enfermedad gastrointestinal; enfermedad del riñón; enfermedad del hígado; enfermedad pulmonar, trastornos adrenales (tales como la enfermedad de Addison), una afección resultante de una lesión tal como una quemadura o una apoplejía, incluyendo tejido dañado (tal como heridas en la piel, células dañadas por la edad y tejido dañado por la edad), una afección asociada con el

envejecimiento (p. ej., pérdida de cabello, incluida calvicie de patrón masculino y alopecia areata), afecciones virales (tales como la infección por hepatitis C y el trastorno de inmunodeficiencia adquirida) y cualquier otro trastorno que un trasplante de órgano o células madre pueda utilizarse para restaurar, regenerar o mejorar los signos y/o síntomas asociados con el trastorno. El método de esta divulgación se puede utilizar en el tratamiento de la disfunción eréctil y en la cirugía plástica o la implantación de mamas para mujeres.

4. Tratamiento de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas

Se describe en esta memoria un método para tratar el daño al tejido cerebral o del SNC o aliviar el síntoma del trastorno en un sujeto. El método incluye identificar un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar daño al tejido cerebral. El sujeto puede ser un mamífero humano o no humano, tal como un gato, un perro o un caballo. Ejemplos del daño al tejido cerebral incluyen los provocados por una isquemia cerebral (p. ej., apoplejía crónica) o una enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad espinocerebelosa o enfermedad de Huntington). Un sujeto a tratar puede identificarse mediante técnicas estándares para diagnosticar las afecciones o los trastornos de interés. El método de tratamiento implica administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de las células SBR o células SBT arriba descritas o agentes/compuestos activos.

Se puede acceder a los efectos terapéuticos de las células de acuerdo con métodos estándares. Por ejemplo, para confirmar la eficacia en la promoción de la angiogénesis cerebrovascular se puede examinar al sujeto antes y después del tratamiento mediante técnicas estándares de formación de imágenes cerebrales, tales como tomografía computarizada (TC), ecografía Doppler (DUI), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) y espectroscopía de resonancia magnética de protones ($^1\text{H-MRS}$). Por ejemplo, $^1\text{H-MRS}$ representa un medio no invasivo para obtener información bioquímica correlacionada con la actividad metabólica del cerebro (Lu et al., 1997, Magn. Reson. Med. 37, 18-23). Esta técnica se puede aplicar para evaluar los cambios metabólicos implicados en la isquemia cerebral con o sin trasplante de células madre. Por ejemplo, se puede utilizar para estudiar la concentración de N-acetil aspartato (NAA) en el cerebro, un marcador de integridad neuronal. Aunque la redistribución y captura de NAA en restos neuronales limita su uso como marcador neuronal cuantitativo, las disminuciones en la concentración de NAA en el cerebro en la isquemia cerebral pueden considerarse como un índice de pérdida o disfunción neuronal (Demougeot et al., 2004, J. Neurochem. 90, 776-83). Por lo tanto, un nivel de NAA, medido por $^1\text{H-MRS}$, es un indicador útil para seguir el efecto del trasplante de células madre después de la isquemia cerebral.

5. Cáncer

Las células SBR o células SBT arriba descritas también pueden utilizarse para tratar el cáncer y otros trastornos proliferativos celulares. Un trastorno proliferativo celular se refiere a un trastorno caracterizado por un crecimiento celular autónomo e incontrolado (que incluye crecimiento maligno y no maligno). El término "cáncer" se refiere a la clase de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular descontrolado, invasión y, a veces, metástasis. Las células cancerosas tienen la capacidad de un crecimiento autónomo, es decir, un estado o afección anormal caracterizado por un crecimiento celular que prolifera rápidamente. El término está destinado a incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos malignos transformados, independientemente de su tipo histopatológico o fase de invasividad. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma y sarcoma, tal como leucemia, sarcoma, osteosarcoma, linfomas, melanoma, glioma, feocromocitoma, hepatoma, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer adrenocortical, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer endometrial, cáncer nasofaríngeo, cáncer cervical o de hígado y cáncer de sitio primario desconocido.

6. Terapia génica

Las células y los métodos arriba descritos se pueden utilizar en diversos métodos de terapia génica conocidos en la técnica. La terapia génica incluye tanto técnicas *ex vivo* como *in vivo*. Específicamente, las células madre arriba descritas pueden modificarse genéticamente *ex vivo* con un modulador de oligonucleótidos o una molécula de ácido nucleico que codifica el modulador, proporcionándose entonces las células modificadas por ingeniería genética a un paciente a tratar. Los cultivos celulares pueden formularse para administración a un paciente, por ejemplo, disociando las células (p. ej., mediante disociación mecánica) y mezclando íntimamente la célula con un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina tamponada con fosfato). Alternativamente, las células pueden cultivarse en un soporte biocompatible adecuado y trasplantarse en un paciente. Las células modificadas por ingeniería genética son típicamente autólogas para evitar el rechazo xenogénico o alotípico. Métodos *ex vivo* de este tipo son bien conocidos en la técnica.

Las células pueden modificarse por ingeniería genética mediante la administración del oligonucleótido o molécula de ácido nucleico utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico pueden administrarse mediante inyección directa de una molécula de ácido nucleico "desnuda" (Felgner y Rhodes, (1991) Nature 349:351-352, patente de EE.UU. N° 5.679.647) o una molécula de ácido nucleico

formulada en una composición con uno o más agentes diferentes que facilitan la absorción de la molécula de ácido nucleico por parte de la célula, tales como saponinas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.739.118) o poliaminas catiónicas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5,837,533); mediante bombardeo de micropartículas (por ejemplo, mediante el uso de una "pistola de genes"; Biolistic, Dupont); mediante revestimiento de la molécula de ácido nucleico con lípidos, receptores de la superficie celular o agentes transfectantes; mediante la encapsulación de la molécula de ácido nucleico en liposomas, micropartículas o microcápsulas; mediante la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un péptido que se sabe que penetra en el núcleo; o mediante la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor, que puede utilizarse para fijar como objetivo tipos celulares que expresan específicamente los receptores.

- 10 Puede formarse un complejo de ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica; o la molécula de ácido nucleico puede fijar como objetivo la captación y expresión específica de células in vivo fijando como objetivo un receptor específico. Además, un método eficiente para la introducción, expresión y acumulación de oligonucleótidos antisentido en el núcleo de la célula se describe en la patente de EE.UU. N° 6.265.167, que permite al
- 15 oligonucleótido antisentido hibridarse con el ARNm sentido en el núcleo, y de ese modo evita que el oligonucleótido antisentido sea procesado o transportado al citoplasma. La presente divulgación contempla también la introducción intracelular de la molécula de ácido nucleico y la subsiguiente incorporación dentro del ADN de la célula huésped para la expresión por recombinación homóloga conocida en la técnica.

- 20 El polinucleótido también se puede incorporar en un vector de expresión adecuado. Se conoce en la técnica un cierto número de vectores adecuados para aplicaciones de terapia génica (véase, por ejemplo, Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy, Eaton Publishing Co. (2000)).

- El vector de expresión puede ser un vector plasmídico. Métodos para generar y purificar ADN plasmídico son rápidos y directos. Además, el ADN plasmídico típicamente no se integra en el genoma de la célula huésped, sino que se mantiene en una ubicación episomal como una entidad discreta que elimina los problemas de genotoxicidad que puede aumentar la integración cromosómica. Una diversidad de plásmidos están ahora fácilmente disponibles en el comercio e incluyen los derivados de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, y muchos están diseñados particularmente para su uso en sistemas de mamíferos. Ejemplos de plásmidos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a los vectores de expresión eucarióticos pRc/CMV (Invitrogen), pCR2.1 (Invitrogen), pAd/CMV y pAd/TR5/GFPq (Massie et al., (1998) Cytotechnology 28:53-64). En una realización a modo de ejemplo, el plásmido es pRc/CMV, pRc/CMV2 (Invitrogen), pAdCMV5 (IRB-NRC), pcDNA3 (Invitrogen), pAdMLP5 (IRB-NRC) o PVAX (Invitrogen).
- 25
- 30

- El vector de expresión puede ser un vector basado en virus. Ejemplos de vectores basados en virus incluyen, pero no se limitan a los derivados de retrovirus deficientes en replicación, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociado. Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adeno-asociados son actualmente el sistema de suministro de genes recombinantes de elección para la transferencia de oligonucleótidos o genes exógenos in vivo, particularmente en seres humanos. Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del huésped. Un requisito previo importante para el uso de retrovirus es garantizar la seguridad de su uso, particularmente con respecto a la posibilidad de propagación de virus de tipo salvaje en la población de células. Los retrovirus, de los que se pueden derivar vectores retrovirales incluyen, pero no se limitan a virus de la leucemia murina Moloney, virus de la necrosis del bazo, retrovirus tales como el virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia del gibón, virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus de sarcoma mieloproliferativo y virus de tumores mamarios. Retrovirus específicos incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 35
- 40

45 7. Banco de células

- La invención presenta un banco o colección de células madre para un acceso sistemático conveniente a diferentes líneas de células madre. Las células madre en el banco o la colección se derivan de las células BLSC, SBR o SBT arriba descritas, que son de sujetos sanos o sujetos que tienen estados de enfermedad o síntomas de enfermedad conocidos serían inestimables para los usuarios, p. ej., los investigadores. También se describe un banco o una colección de células que tiene células diferenciadas de las células madre arriba descritas. Ejemplos de células diferenciadas de las células madre incluyen células del cerebro, neuronas, astrocitos, células gliales, células T, células B, células de cartílago, células óseas, células de islotes pancreáticos, células grasas, células cardíacas, células hepáticas, células renales, células pulmonares, células musculares y células oculares. Los sujetos pueden ser vertebrados humanos o no humanos. Las células madre se pueden derivar de cualquier organismo mamífero, tal como ser humano, ratón, conejos, vacas, cerdos y similares.
- 50
- 55

Las células en el banco o la colección se catalogan de acuerdo con características predeterminadas, incluyendo información fenotípica, características morfológicas, perfil de diferenciación, tipo de sangre, complejo de histocompatibilidad principal, estado de la enfermedad del donante o información genotípica (p. ej., polimorfismos de

un solo nucleótido (SNPs) de una secuencia de ácido nucleico asociada con un gen, o ADN genómico o mitocondrial). Las células se almacenan en condiciones apropiadas (típicamente mediante congelación) para mantener las células madre vivas y en funcionamiento. La catalogación puede constituir la creación de un registro centralizado de las características obtenidas para cada una de las poblaciones de células, tales como, pero no limitado a un registro escrito ensamblado o una base de datos informática con la información ingresada en la misma. Esencialmente, pertenece a la producción de un banco de células madre. El banco de células madre facilita la selección a partir de una pluralidad de muestras de una muestra específica de células madre, adecuada para las necesidades de un usuario. Por lo tanto, se describe un banco de células madre que comprende una pluralidad de muestras de células madre obtenidas de fuentes separadas y que se caracterizan y catalogan de acuerdo con al menos una característica predeterminada. Una divulgación adicional pertenece a un método para establecer un banco de células madre que comprende recoger muestras madres de múltiples fuentes; catalogar las muestras de acuerdo con al menos una característica predeterminada y almacenar las células en condiciones que mantengan las células viables.

Se describe, además, un sistema de banco de células madre que contiene una pluralidad de poblaciones de células madre dispuestas en recipientes individuales en condiciones para mantener viables las poblaciones de células madre; un ordenador de base de datos que comprende al menos un módulo de procesamiento, una pantalla y un medio de almacenamiento que comprende información de al menos una característica para cada una de las poblaciones de células madre; y al menos un módulo de código de programa para hacer que la información sea visible en dicha pantalla cuando el usuario la ordena. La divulgación presenta un sistema de banco de células madre en el que las poblaciones de células madre tienen células madre obtenidas de sujetos que tienen una enfermedad. La enfermedad puede incluir las enfermedades degenerativas arriba descritas. Células madre se recogen de diferentes sujetos que tienen una enfermedad diferente, y las células madre se caracterizan. La o las características se introducen en el ordenador de la base de datos. Además, o alternativamente, las células se caracterizan en base a un fenotipo específico, no necesariamente asociado con una enfermedad. Por ejemplo, las células hepáticas se pueden caracterizar en función de su capacidad para metabolizar determinados compuestos, tales como la cafeína, el alcohol, los fármacos, etc., para estudiar las bases genéticas de tales capacidades metabólicas diferentes o la fisiología subyacente asociada a ellas. Se pueden caracterizar otros tipos de células en función de fenotipos funcionales y/o morfológicos.

Células diferenciadas de las células SBR o SBT pueden someterse a condiciones para influir en la diferenciación o desdiferenciación mediante la introducción de vectores modificados por ingeniería genética u otro material genético. La desdiferenciación comprende la manipulación de una célula de manera que asuma las propiedades de una célula menos diferenciada.

Las colecciones de células madre de la invención se pueden utilizar para rastrear agentes o compuestos que pueden utilizarse para tratar trastornos degenerativos, cáncer o trastornos inmunitarios de la manera arriba descrita. Las colecciones son adecuadas para el rastreo de alto rendimiento y son útiles para identificar agentes que son específicamente eficaces para un sujeto particular. Para un rastreo de alto rendimiento, las células madre pueden introducirse en los pocillos de una placa de múltiples pocillos o de un portaobjetos de vidrio o microchip, y pueden ponerse en contacto con el agente de prueba. Generalmente, las células están organizadas en una matriz, particularmente una matriz direccionable, de manera que la robótica puede utilizarse convenientemente para manipular las células y soluciones y para monitorizar las células, particularmente con respecto a la función que se está examinando. Una ventaja de utilizar un formato de alto rendimiento es que se puede examinar un cierto número de agentes de prueba en paralelo y, si se desea, también se pueden ejecutar reacciones de control en condiciones idénticas a las condiciones de prueba. Como tal, los métodos de rastreo de la invención proporcionan un medio para rastrear uno, unos pocos o un gran número de agentes de prueba con el fin de identificar un agente que pueda alterar una función de las células madre, por ejemplo, un agente que induce a las células a diferenciarse en un tipo de célula deseado, o que evita la diferenciación espontánea, por ejemplo, manteniendo un alto nivel de expresión de moléculas reguladoras.

8. Células de donantes universales

Las células madre arriba descritas pueden modificarse por ingeniería genética para generar células o tejidos donantes histocompatibles para trasplante. El objetivo del trasplante y la terapia celular es reemplazar con éxito los tejidos u órganos defectuosos por tejidos u órganos funcionales del donante. Sin embargo, para que el trasplante tenga éxito, se deben superar dos barreras principales: la disponibilidad de tejidos u órganos de donantes adecuados y el rechazo inmunitario. La sustitución de tejidos u órganos defectuosos y el tratamiento del rechazo están restringidos por el número limitado de donantes aceptables y la necesidad de co-administración de fármacos inmunosupresores tóxicos junto con protocolos inmunosupresores a largo plazo. Protocolos de trasplante actuales y experimentales se basan principalmente en donantes hermanos, otros grupos pequeños de donantes alogénicos y donantes xenogénicos. Las células madre modificadas por ingeniería genética arriba descritas se pueden utilizar para superar estas limitaciones.

Más específicamente, las células madre descritas en esta memoria pueden modificarse por ingeniería genética para que no se expresen en su superficie moléculas MHC de clase II. Más preferiblemente, las células se modifican por ingeniería genética para que no expresen sustancialmente todas las moléculas MHC de clase I y de la clase II de la superficie celular. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "no expresa" significa que se expresa una cantidad insuficiente en la superficie de la célula para provocar una respuesta o que la proteína que se expresa es deficiente y, por lo tanto, no provoca una respuesta.

Las moléculas MHC se refieren a moléculas HLA, específicamente de las clases HLA A, B y C, y HLA DP, DQ y DR de clase II y sus subclases. Esta terminología se interpreta generalmente como específica para el MHC humano, pero se pretende incluir en esta memoria los genes MHC equivalentes de las especies de células donantes, por ejemplo, si las células son de origen porcino, el término HLA se referiría a las moléculas de MHC porcinas equivalentes, ya sea MHC I o II. Cuando se eliminan las moléculas MHC de clase II, las células T CD4+ no reconocen las células endoteliales modificadas por ingeniería genética; cuando se eliminan las moléculas del MHC tanto de clase I como de clase II, ni las células CD4+ ni las células CD8+ reconocen las células modificadas.

La modificación genética preferida realizada en las células madre incluye 1) alterar el gen de la cadena invariante endógena que funciona en el ensamblaje y transporte de moléculas MHC de clase II a la superficie celular y carga de péptido antigénico, y 2) alterar el gen β_2 -microglobulina endógeno (gen β_2M) que codifica una proteína requerida para la expresión en la superficie celular de todas las moléculas del MHC de clase I. Alternativamente, solo el gen de la cadena invariante se altera. Se cree que la cadena invariante es necesaria para la inserción de fragmentos de péptidos antigénicos en la molécula MHC de clase II. Juntos, el péptido antigénico y el MHC son reconocidos por las células T. En ausencia de péptido antigénico, normalmente no se obtiene el reconocimiento de las células T ni la molécula del MHC de clase II se pliega adecuadamente. Por lo tanto, en células que carecen de cadena invariante, la presentación del péptido se anulará e incluso si se obtienen cantidades minúsculas del MHC de la superficie celular, pueden estar desprovistos de péptido y, por lo tanto, no son inmunogénicas.

La interrupción de estos genes puede lograrse por medio de técnicas de fijación como objetivo de genes de recombinación homóloga. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica. Véanse las patentes de EE.UU. N°s 6,916,654 y 6,986,887, Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435438; y Koller et al., 1990 Science 248:1227-1230.

9. Composiciones

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que contienen las células o agentes/compuestos activos arriba descritos. Composiciones farmacéuticas pueden prepararse mezclando una cantidad terapéuticamente eficaz de las células o agentes/compuestos activos y, opcionalmente, otra sustancia activa, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede tener diferentes formas, dependiendo de la ruta de administración. Ejemplos de otra sustancia activa incluyen compuestos activos conocidos o identificados por el método de rastreo arriba descrito.

Las composiciones farmacéuticas arriba descritas pueden prepararse utilizando excipientes farmacéuticos convencionales y métodos de preparación. Todos los excipientes se pueden mezclar con agentes disgregantes, disolventes, agentes de granulación, humectantes y aglutinantes. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad que da como resultado una mejora mensurable de al menos un síntoma o parámetro de un trastorno específico. Una cantidad terapéuticamente efectiva de las células arriba descritas puede determinarse por métodos conocidos en la técnica. Una cantidad efectiva para tratar un trastorno se puede determinar fácilmente mediante métodos empíricos conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. La cantidad exacta a administrar a un paciente variará dependiendo del estado y la gravedad del trastorno y la condición física del paciente. Una mejora apreciable de cualquier síntoma o parámetro puede ser determinada por una persona experta en la técnica o informada por el paciente al médico. Se entenderá que cualquier atenuación o mejora clínica o estadísticamente significativa de cualquier síntoma o parámetro de los trastornos arriba descritos está dentro del alcance de la invención. Una atenuación o mejoría clínicamente significativa significa perceptible para el paciente y/o para el médico.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de tales composiciones que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen reacciones no deseadas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una Agencia reguladora del Gobierno Federal o Estatal o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en mamíferos, y más particularmente en seres humanos. Sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables se refiere a aquellas sales (p. ej., sales carboxilato, sales por adición de aminoácidos), ésteres, amidas y profármacos que, dentro del alcance de un juicio médico sólido, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes sin una toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, proporcional a una relación riesgo/beneficio razonable, y efectiva para su uso pretendido.

Un vehículo aplicado a las composiciones farmacéuticas arriba descritas se refiere a un diluyente, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto. Vehículos farmacéuticos de este tipo pueden ser líquidos estériles,

tales como agua y aceites. El agua o solución acuosa, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferiblemente como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, 18ª Edición.

- 5 Las células arriba descritas se pueden administrar a individuos mediante infusión o inyección (por ejemplo, intravenosa, intratecal, intramuscular, intraluminal, intratraqueal, intraperitoneal o subcutánea), por vía oral, transdérmica u otros métodos conocidos en la técnica. La administración puede ser una vez cada dos semanas, una vez a la semana o más a menudo, pero la frecuencia puede disminuir durante una fase de mantenimiento de la enfermedad o trastorno.
- 10 Se pueden utilizar tanto células heterólogas como autólogas. En el primer caso, el emparejamiento HLA debe llevarse a cabo para evitar o minimizar las reacciones del huésped. En este último caso, las células autólogas se enriquecen y purifican de un sujeto y se almacenan para un uso posterior. Las células pueden cultivarse en presencia de células T huésped o de injerto ex vivo y reintroducirse en el huésped. Esto puede tener la ventaja de que el huésped reconoce las células como propias y proporciona una mejor reducción en la actividad de las células T.
- 15 La dosis y la frecuencia de administración dependerán de los signos clínicos que confirmen el mantenimiento de la fase de remisión, con la reducción o ausencia de al menos uno o más preferiblemente más de un signo clínico de la fase aguda conocido por el experto en la técnica. Más generalmente, la dosis y la frecuencia dependerán, en parte, de la recesión de los signos patológicos y los síntomas clínicos y subclínicos de una afección o trastorno contemplado para el tratamiento con la composición arriba descrita. Las dosificaciones y el régimen de administración pueden ajustarse dependiendo de la edad, el sexo, el estado físico de la administración, así como del beneficio del conjugado y los efectos secundarios en el sujeto paciente o mamífero a ser tratado y el juicio del médico, como es apreciado por aquellos expertos en la técnica. En todos los métodos arriba descritos, las células se pueden administrar a un sujeto a razón de 1×10^4 a 1×10^{10} / tiempo.
- 20 Los ejemplos específicos que figuran a continuación se deben interpretar como meramente ilustrativos, y no limitativos del resto de la divulgación de ninguna manera.
- 25

Preparación de células SBR y SBT

- El método para la activación, purificación y expansión de BLSCs se ha descrito en el documento WO/2007/100845. En este ejemplo, las BLSCs se purificaron a partir de sangre de un sujeto humano utilizando dos métodos. Las células aisladas se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1C y las
- 30 Figuras 2A-2C. Se encontró que los dos métodos proporcionaban 200×10^6 y 230×10^6 BLSC/ml de sangre, respectivamente.

- Las BLSCs purificadas se cultivaron en StemBios-001. Para producir células SBR y SBT, BLSCs se cultivaron en un medio StemBios-002 durante 2 semanas. Luego, las BLSCs se cultivaron en un medio StemBios-003 que contenía 0,1 a 20 μ M de RA o 1 a 40 nM de TGF- β durante más de 2~6 semanas. Se encontró que las células cultivadas cambiaban gradualmente su morfología y tamaños (Figuras 6-12). Estas células se denominaron células SBR y SBT, respectivamente.
- 35

- Las células SBR y SBT se sometieron a ensayo para determinar su potencial de diferenciación de desarrollo utilizando métodos estándares. Se encontró que pueden diferenciarse en células derivadas de las tres capas germinales embrionarias, es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo. También se encontró que la totalidad o una parte sustancial de las células eran CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CXCR4⁺.
- 40

Resultados por RT-PCR de SBR, SBT y BLSCs

- Se examinaron las expresiones génicas de las células SBR, células SBT y BLSCs. El ARN total se aisló de células SBR o células SBT cultivadas (más de 6 millones para cada una) utilizando un kit de extracción de ARN Qiagen (Qiagen, CA), kit de París (Ambion) o kit de ARNzol (InvitroGen). El ADNc se preparó a partir de 2,0 μ g de ARN, utilizando 0,25 ng de oligo-(dT)12-18 y transcriptasa inversa (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen). Sin embargo, no se puede obtener ARN detectable de más de 100 millones de BLSCs.
- 45

- La RT-PCR se realizó utilizando la condición de 94°C (15 segundos), 55°C (15 segundos), 72°C (20 segundos) durante 30 ciclos. Los cebadores para beta-actina fueron: Directo 5'-ACAAAACCTAACTTGCGCAG-3' Inverso 5'-TCCTGTAACAACGCATCTCA-3'. Los cebadores para GADPH fueron: Directo 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3' Inverso 5'-GTA CT CAGCGGCCAGCATCG-3'. Los resultados se muestran en la Figura 13. Se encontró que la beta-actina y el GADPH se expresan en células SBR y células SBT, pero no en BLSCs.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparar una población de células madre pluripotentes, que comprende cultivar una pluralidad de células madre de tipo blastómero (BLSCs) no embrionarias en un medio que contiene ácido retinoico (RA) o factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e identificar y enriquecer células pluripotentes entre las células cultivadas, en el que las células pluripotentes expresan el ARNm de GADPH o beta-actina.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células pluripotentes son de 1 a 15 micrómetros de tamaño.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que A) el medio contiene RA 0,1 a 20 μ M y las BLSCs se cultivan durante 2 a 8 semanas, o B) el medio contiene TGF- β 1 a 40 nM y las BLSCs se cultivan durante 2 a 8 semanas.
4. El método de la reivindicación 3, en el que A) el medio contiene RA 5 a 12 μ M y las BLSCs se cultivan durante 3 a 4 semanas y las células pluripotentes son de 1 a 15 micrómetros de tamaño y forman en suspensión una estructura similar a una lámina; o B) el medio contiene TGF- β 5 a 12 nM y las BLSCs se cultivan durante 4 a 6 semanas y las células pluripotentes son de 1 a 15 micrómetros de tamaño, tienen una forma redonda y forman agregación.
5. Una composición que comprende una pluralidad de células cultivadas que (1) son pluripotentes (2), son de 1-15 micrómetros de tamaño y (3) expresan el ARNm de GADPH o beta-actina, y se pueden obtener por el método de la reivindicación 1.
6. La composición de la reivindicación 5, en donde la composición comprende, además, ácido retinoico (RA) o factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).
7. La composición de la reivindicación 5, en donde una primera población de las células son CD66e⁺.
8. La composición de la reivindicación 5, en donde las células incluyen un ácido nucleico recombinante.
9. La composición de la reivindicación 5, en donde las células no expresan el gen beta2-microglobulina o no expresen una o más proteínas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I que desencadenan una reacción mediada por linfocitos T contra la célula.
10. La composición de la reivindicación 5, en donde las células son CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺ y CXCR4⁺ o son tinción de azul de tripano negativas.
11. La composición de la reivindicación 5, para uso en tratar una enfermedad degenerativa, enfermedad de Parkinson, diabetes, una enfermedad neurodegenerativa, artritis, cáncer o una enfermedad autoinmune.
12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde cada una de las células en la composición incluye un ácido nucleico recombinante, en donde el ácido nucleico recombinante codifica un polipéptido y la célula contiene un ARNm que codifica el polipéptido.
13. Un método para identificar un fármaco candidato para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad degenerativa, enfermedad de Parkinson, diabetes, una enfermedad neurodegenerativa, artritis, cáncer o una enfermedad autoinmune, comprendiendo el método:
poner en contacto un compuesto de ensayo con una composición de la reivindicación 5 y
determinar el nivel de expresión de un polipéptido que está regulado negativamente en la enfermedad degenerativa, en donde el nivel de expresión en presencia del compuesto de ensayo, si es más alto que el nivel en ausencia del compuesto, indica que el compuesto es un candidato para tratar la enfermedad.
14. La composición de la reivindicación 5, para uso en un método para la terapia génica en un sujeto, administrando al sujeto la composición, en donde una célula en la composición incluye un ácido nucleico heterólogo.
15. Un banco de células que comprende una pluralidad de composiciones de la reivindicación 5.
16. Un método de producir un banco de células de la reivindicación 14, que comprende:
caracterizar una pluralidad de composiciones de la reivindicación 5 recogidas de una pluralidad de sujetos, respectivamente, para obtener al menos una característica predeterminada para cada una, y
catalogar cada una de las poblaciones de células de acuerdo con al menos una característica predeterminada.

Purificación de BLSC de la hemolisis - (recuentos de BLCS 200×10^6 células/ml)

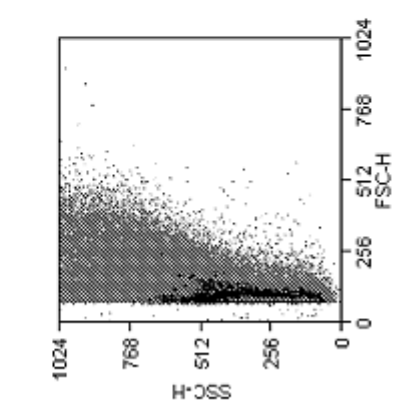


Fig. 1A

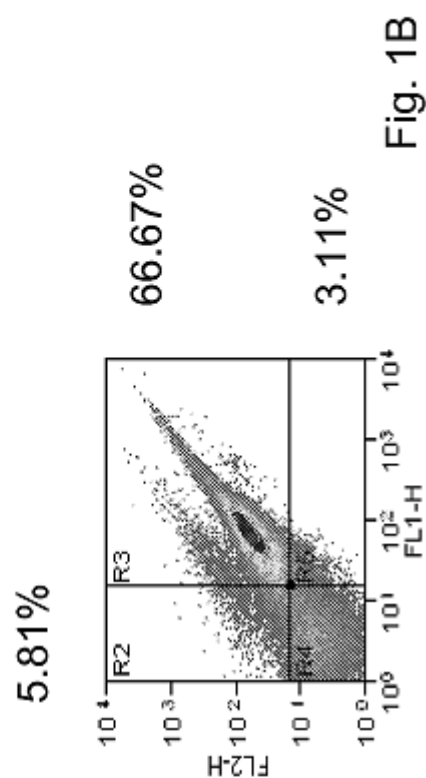


Fig. 1B

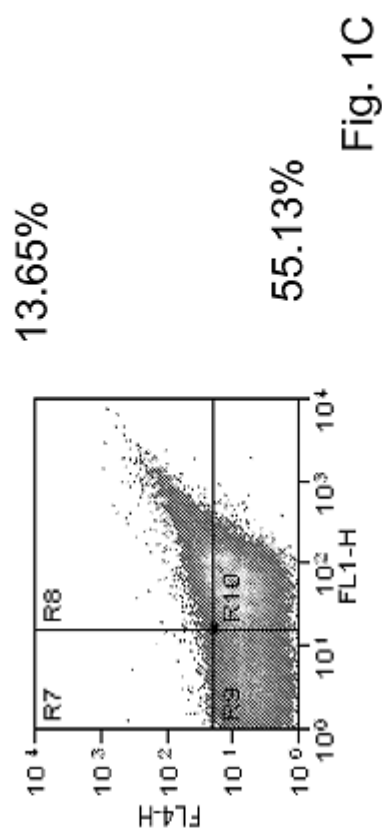


Fig. 1C

FI1: CD10-FITC
FI2: CD66e-PE
FI4: CD90-APC

Purificación de BLSC de la fracción de plasma - (recuentos de BLSC 239×10^6 células/ml)

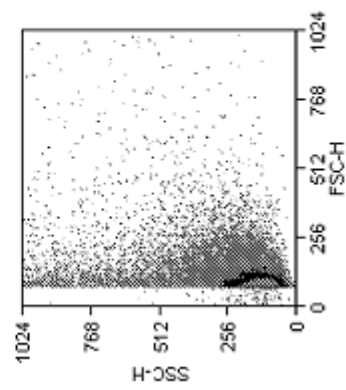


Fig. 2A

FI1: CD10-FITC
FI2: CD66e-PE
FI4: CD90-APC

9.14% 2.99%

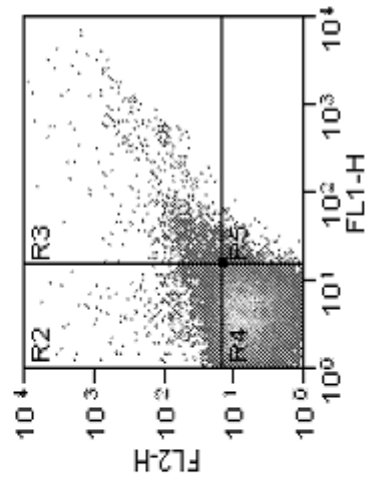


Fig. 2B

9.8% 2.2%

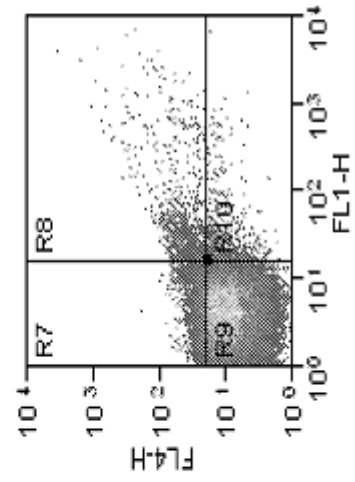


Fig. 2C

BLCs cultivadas - formación de multi-capas, estructura de malla-red (200x)



Fig. 3A

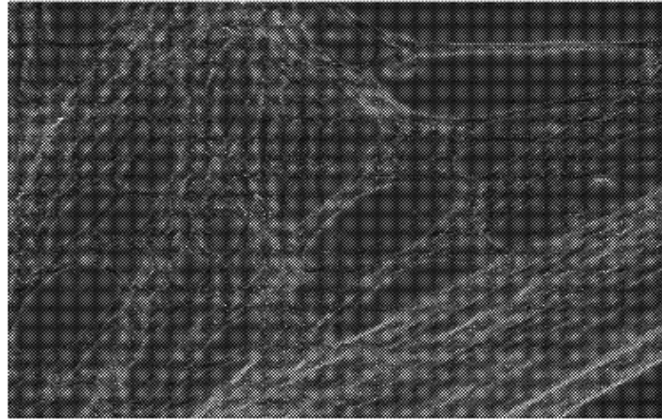


Fig. 3B

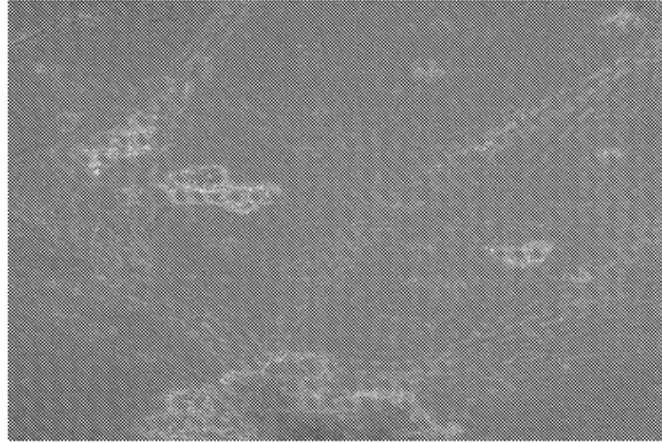


Fig. 3C

BLSC cultivada: Agregación

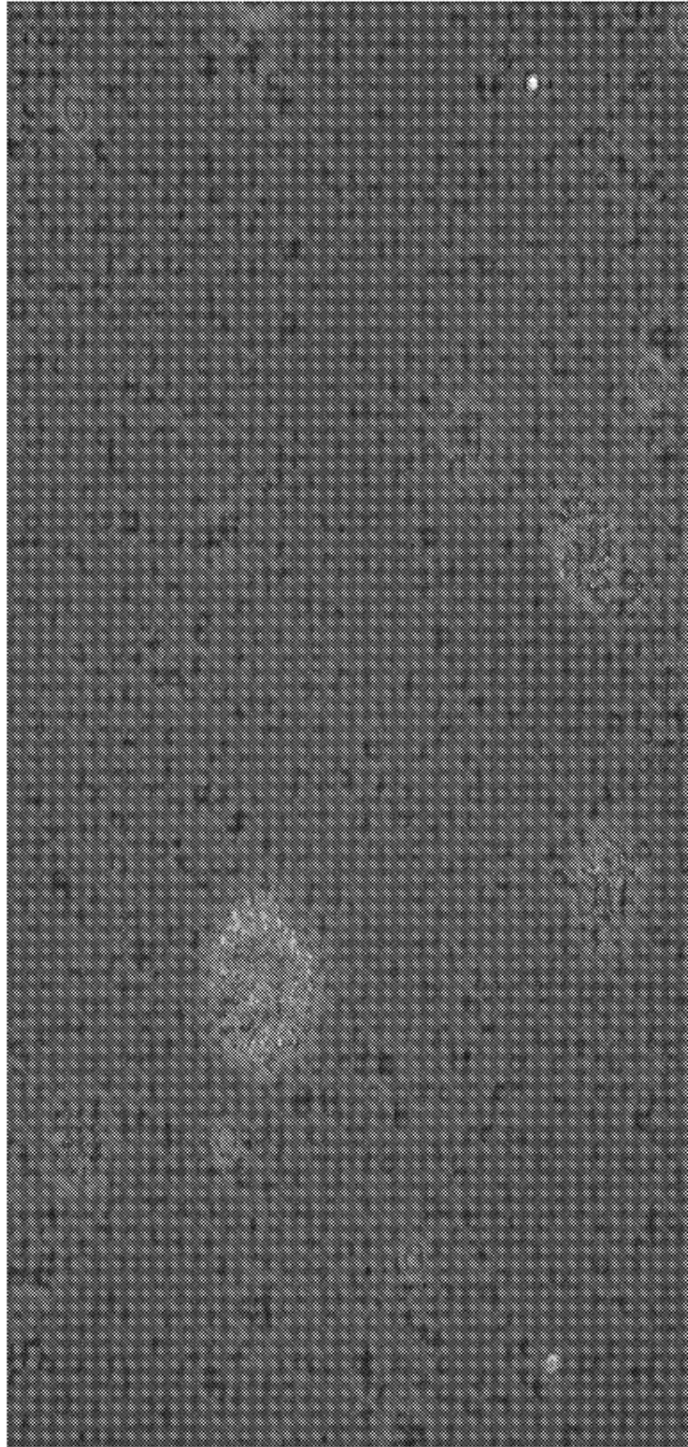


Fig. 4

200x

Agregación de BLSCs - Células tipo esfera

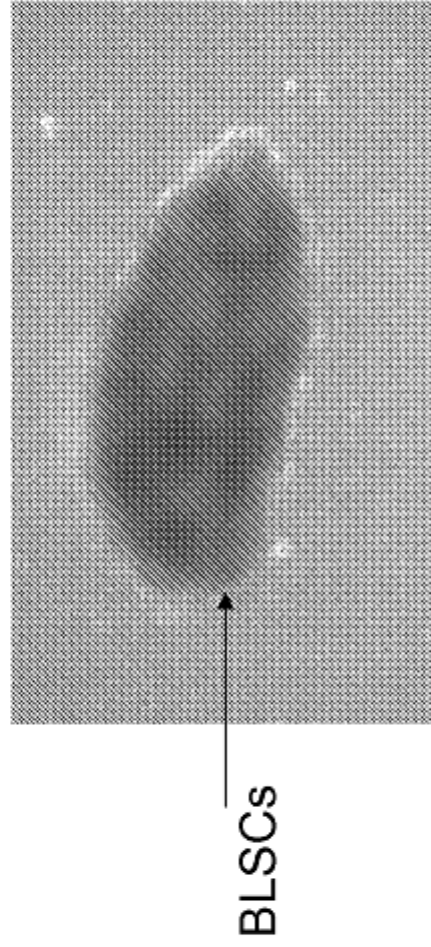


Fig. 5

BLSCs + Ácido Retinoico

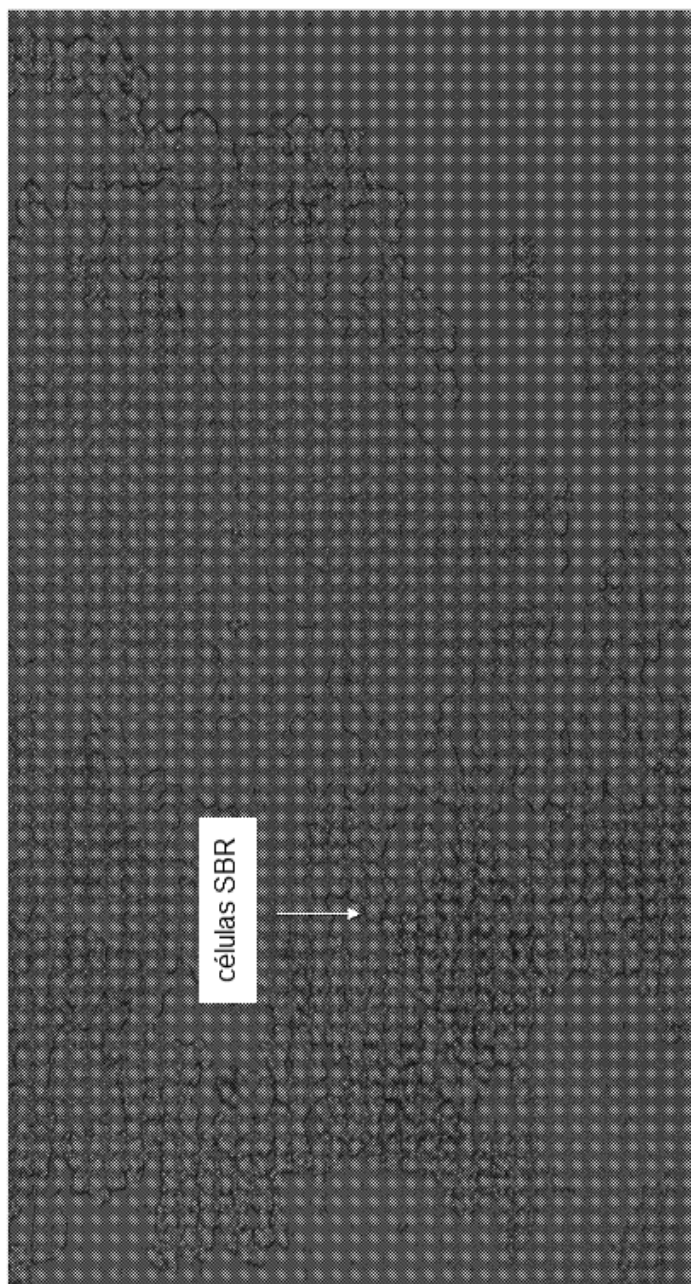


Fig. 6

100x

BLSCs + Ácido Retinoico

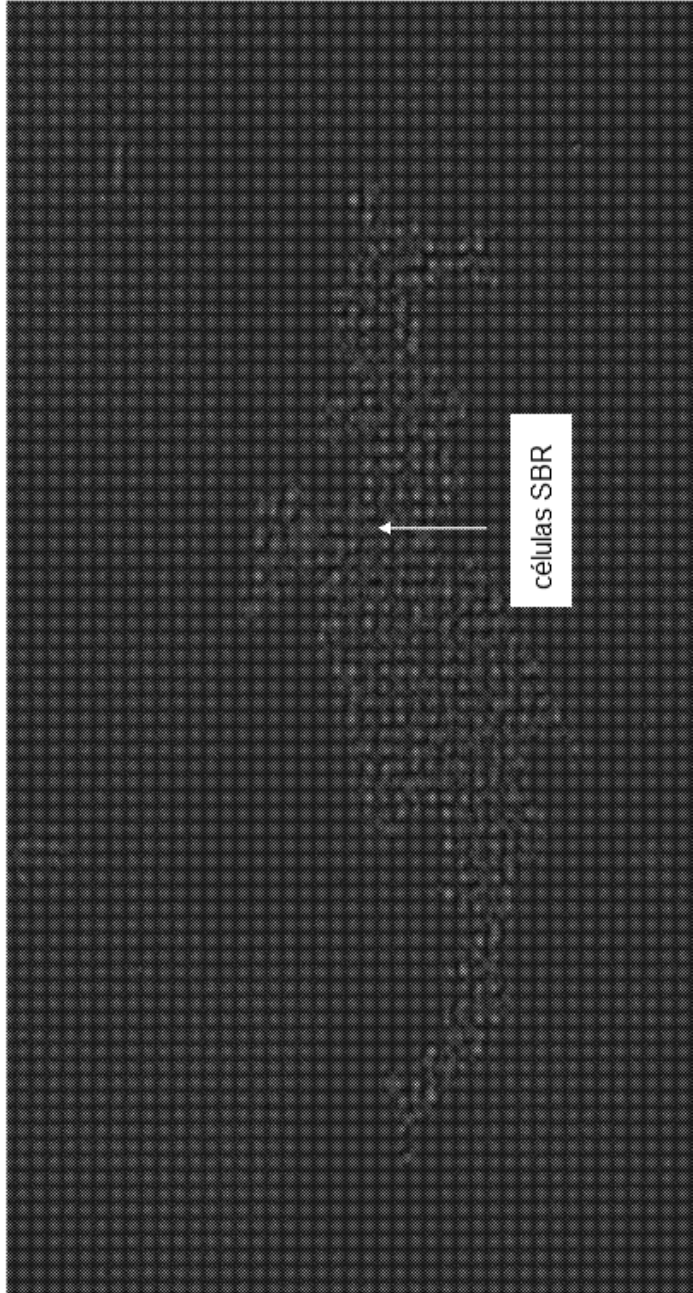


Fig. 7

200x

BLSCs + Ácido Retinoico

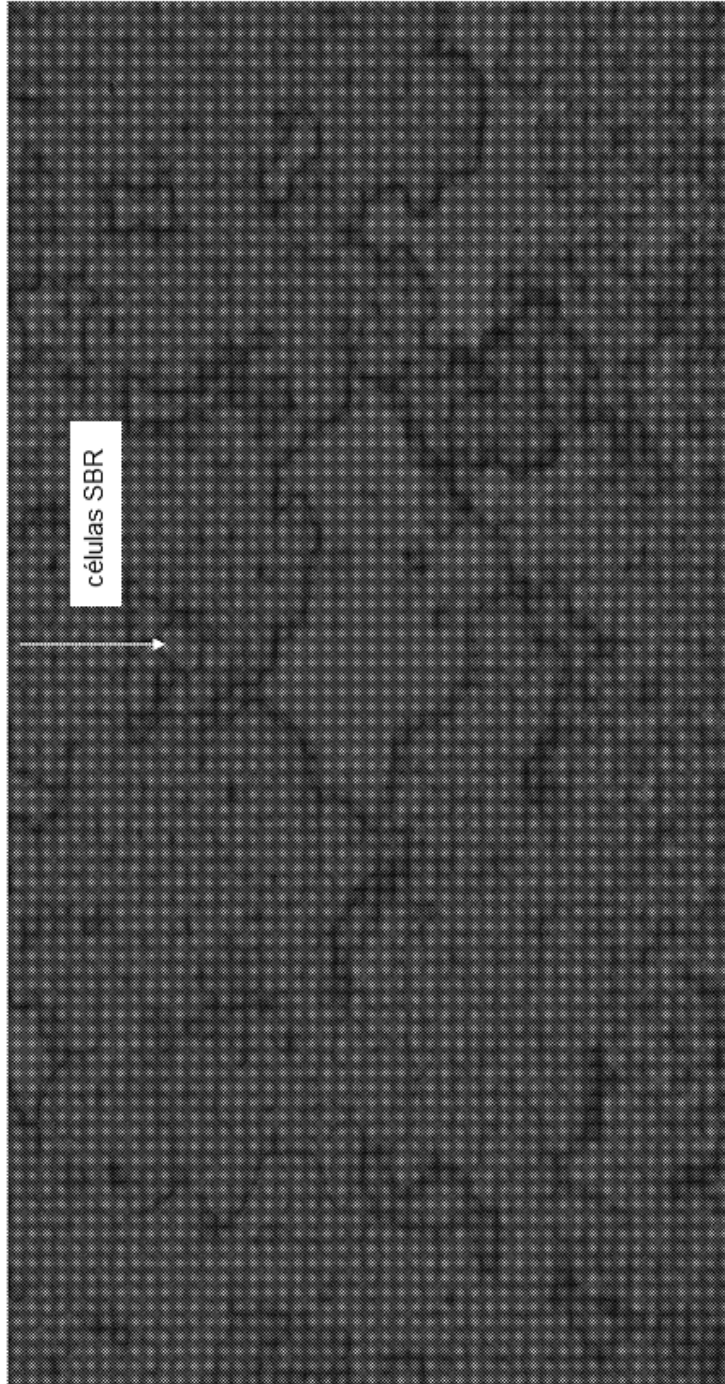


Fig. 8

400x

BLSCs + TGFbeta

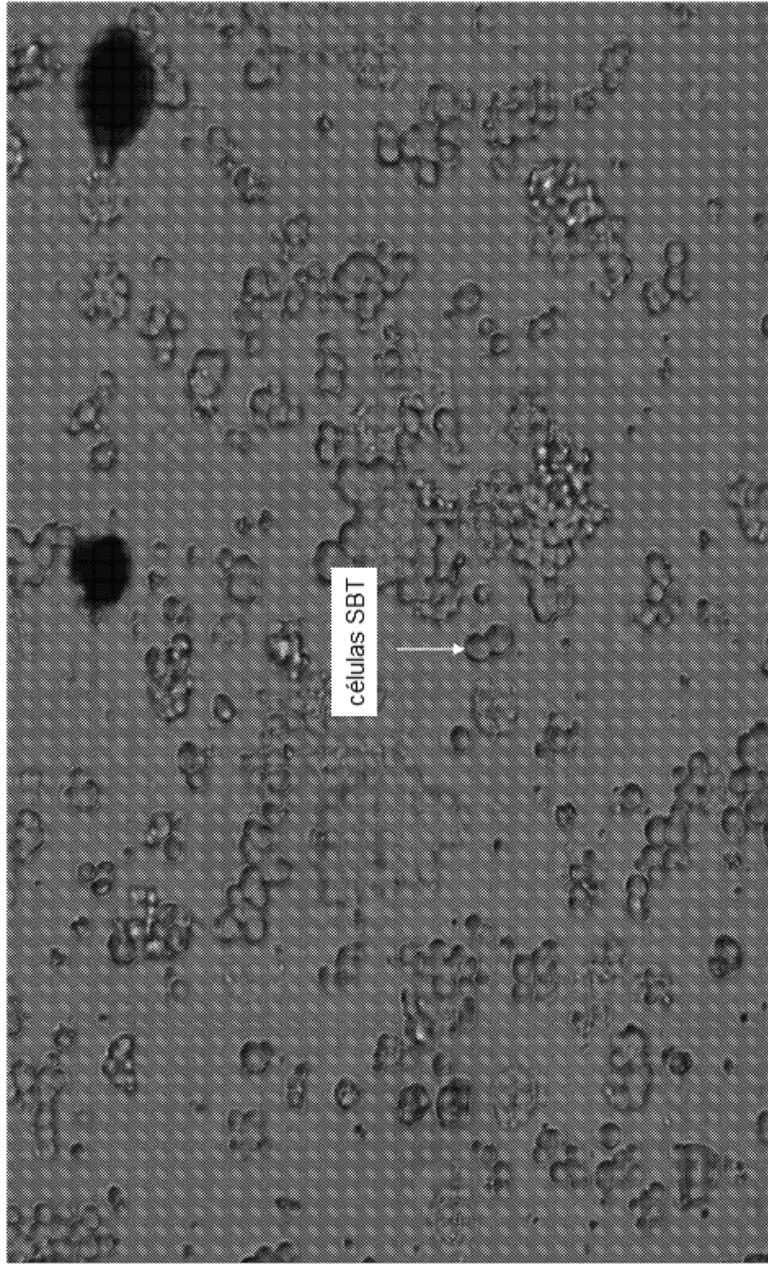


Fig. 9

400x

BLSCs + TGFbeta

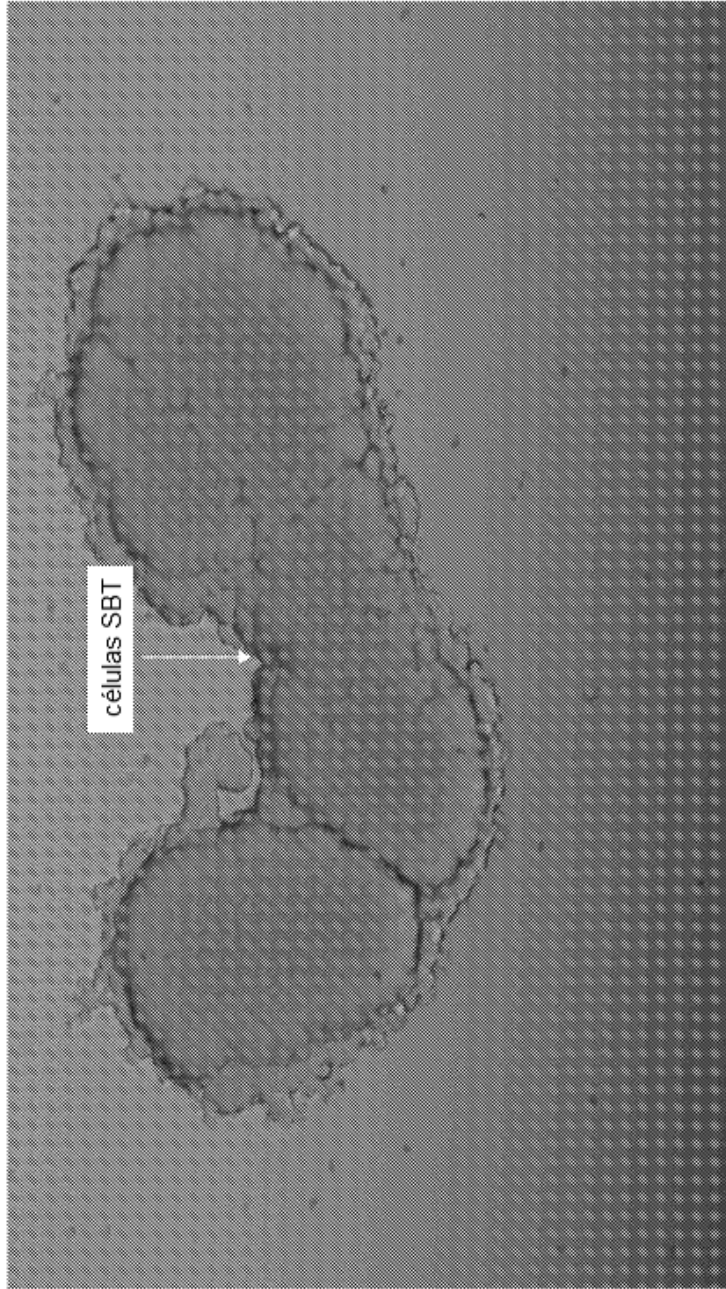


Fig. 10

100x

BLSCs + TGFbeta

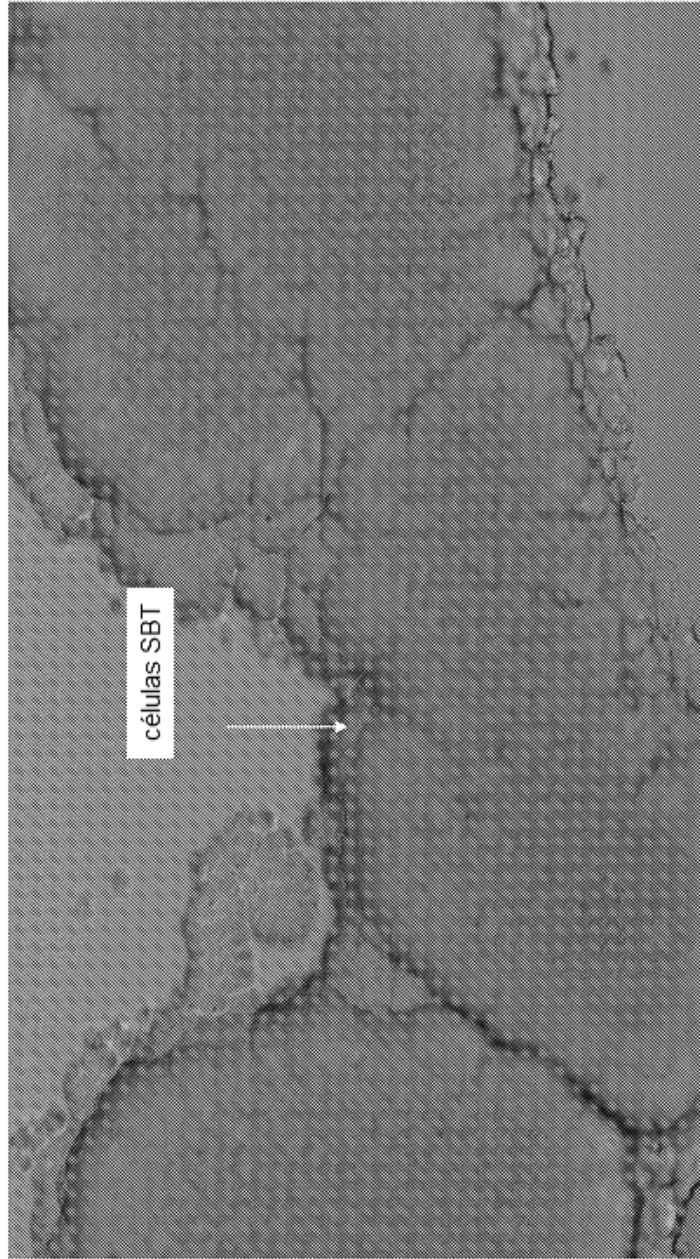


Fig. 11

200x

BLSCs + TGFbeta

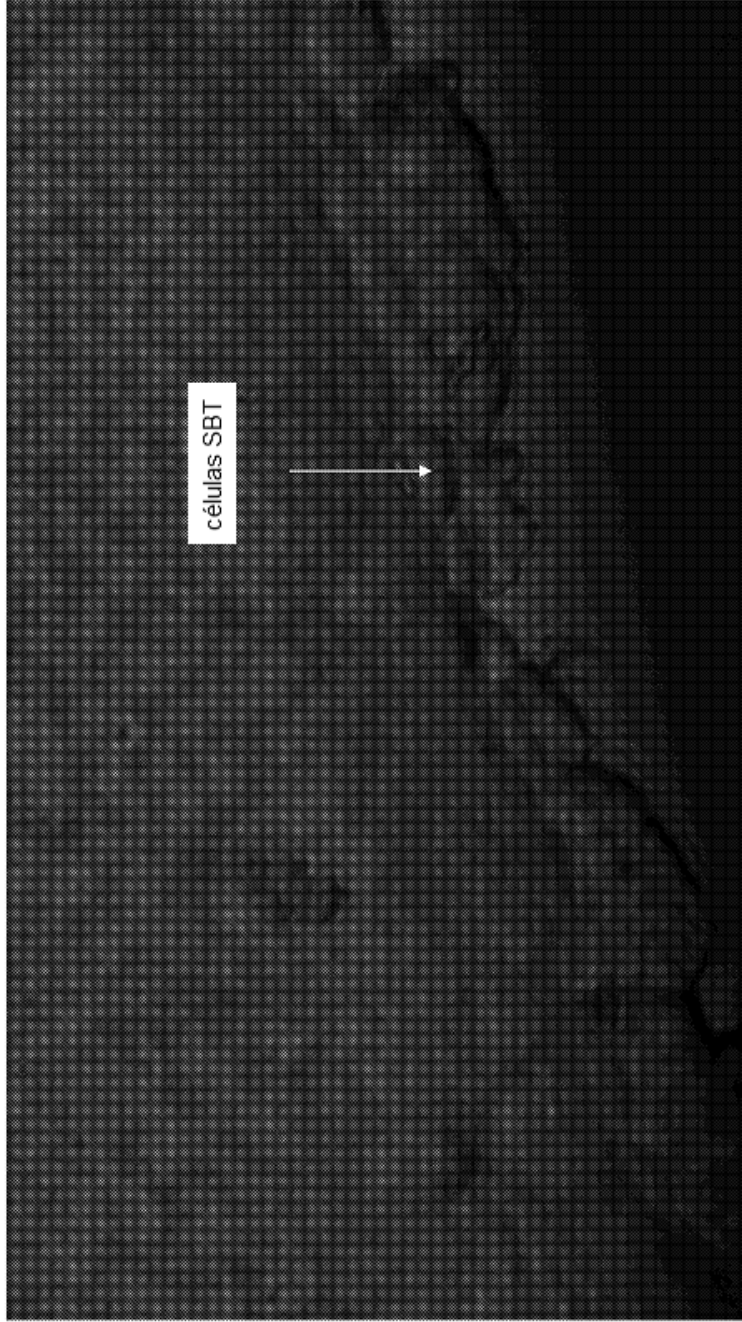
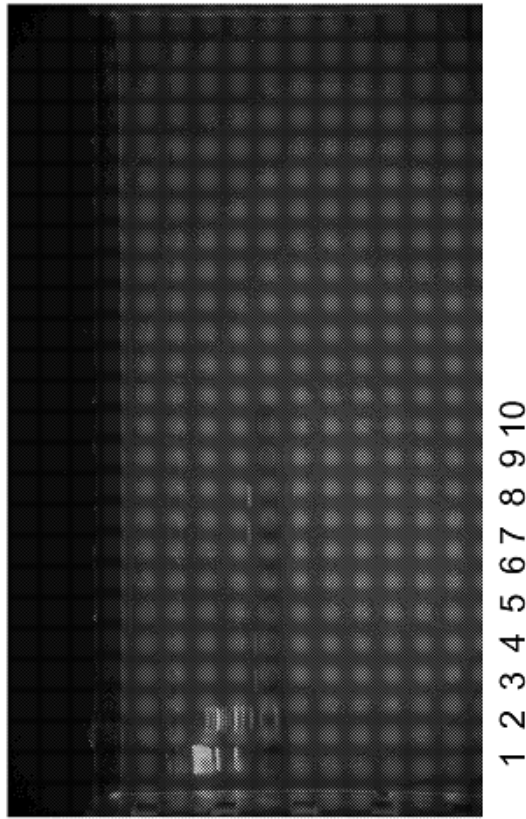


Fig. 12

400x

Resultado por RT-PCR de SBR, SBT y BLSC;
 Tiene expresión de ARN en SBR y SBT para beta-actina y GADPH;
 Ninguna expresión de ARN en BLSC para beta-actina y GADPH



Pista 1: marcador de 1 Kb. Pista 2: marcador de 100 pb. Pista 3: ARN de SBR para cebador de beta-actina
 Pista 4: ARN de SBT para cebador de beta-actina. Pista 5: ARN de SBR para cebador de beta-actina
 Pista 6: Ningún ARN, solo cebador de beta-actina. Pista 7: ARN de SBR para cebador de GADPH
 Pista 8: ARN de SBT para cebador de GADPH. Pista 9: ARN de BLSC para cebador de GADPH
 Pista 10: Ningún ARN, solo cebador de GADPH

Fig. 13