

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 938**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2012 PCT/IB2012/000030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12095730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2012 E 12701024 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2663638**

54 Título: **Método de cultivo para obtener y conservar una población pura o enriquecida de células madre neurales y/o de células progenitoras neurales de mamífero que son propensas a diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos in vitro**

30 Prioridad:

12.01.2011 US 201161431944 P
11.11.2011 US 201161558527 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2019

73 Titular/es:

OLIGOGEN INC. (100.0%)
Room 401, Med-Pharm Collaboration Bldg, Kyoto
University, 46-29-Yoshida-Shimo-Adachi-cho,
Sakyo-ku
Kyoto 606-8304, JP

72 Inventor/es:

KIDO, TSUNEO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 938 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

Método de cultivo para obtener y conservar una población pura o enriquecida de células madre neurales y/o de células progenitoras neurales de mamífero que son propensas a diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos *in vitro*

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general al campo de la biología celular de células madre neurales y células progenitoras neurales. Más específicamente, esta invención proporciona una población pura o enriquecida de células madre neurales y/o de células progenitoras neurales de mamífero que son propensas a diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos *in vitro*, adecuada para uso en la investigación biológica, la detección de fármacos y la terapia humana.

10 **Antecedentes de la invención**

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, las células madre neurales primitivas y multipotenciales (NSC) proliferan, dando lugar a células progenitoras que se dividen de forma transitoria que eventualmente se diferencian en los diversos tipos de células que componen el cerebro adulto. El sistema nervioso central adulto se compone principalmente de neuronas y células gliales, que incluyen astrocitos y oligodendrocitos. Las células progenitoras de las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos se originan secuencialmente a partir de células madre neurales en el cerebro en desarrollo (véase la Figura 1). Las células progenitoras neuronales se forman en primer lugar y se diferencian en muchos tipos de neuronas. Los astrocitos se desarrollan en segundo lugar y actúan como un apoyo para la supervivencia de las neuronas. Finalmente, las células progenitoras de oligodendrocitos comienzan a aparecer y migran a través del sistema nervioso central. Después se diferencian en oligodendrocitos maduros, que producen la mielina necesaria para una función neuronal adecuada.

Dado que los oligodendrocitos desempeñan un papel importante de apoyo del sistema nervioso central, una población pura o enriquecida de oligodendrocitos o de sus células predecesoras (es decir, las células pre-progenitoras de oligodendrocitos y/o las células progenitoras de oligodendrocitos) sería útil para las terapias celulares y la medicina regenerativa, tal como en el tratamiento de trastornos neurológicos que incluyen enfermedades desmielinizantes congénitas (por ejemplo, la enfermedad de Krabbe o la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher), una lesión de la médula espinal y otras afecciones que son el resultado de defectos en la vaina de mielina que aísla las células nerviosas. Estas células también se pueden usar para la investigación y para identificar nuevos fármacos para el tratamiento de muchos trastornos neurológicos, como la esclerosis múltiple y la esquizofrenia.

Los oligodendrocitos maduros no proliferan y no sobreviven bien en un cultivo, y la capacidad para obtener oligodendrocitos directamente a partir de muestras de tejidos en cantidades suficientes para un uso investigativo o en terapia humana, es extremadamente complicada. Como resultado, el uso de los oligodendrocitos para estos fines se ve obstaculizado por la falta de disponibilidad de esas células.

35 Una solución de este problema implica obtener células madre neurales y/o células progenitoras neurales a partir de un tejido, expandir las células en un cultivo para obtener una cantidad suficientemente elevada de células que posteriormente puedan diferenciarse en oligodendrocitos. La diferenciación puede tener lugar ya sea *in vitro* o *in vivo*, como en el caso de un trasplante. Esto daría lugar a una gran población de oligodendrocitos o sus progenitores o pre-progenitores para uso en la investigación y la terapia humana.

40 Sin embargo, los científicos se han esforzado en identificar condiciones de cultivo que permitan un cultivo a largo plazo y una expansión masiva de los progenitores y/o los pre-progenitores de oligodendrocitos, particularmente procedentes de seres humanos o primates no humanos, en donde la población de células expandidas resultante comprende principalmente células que conservan la capacidad de diferenciarse en oligodendrocitos.

45 Diversos científicos han informado de la obtención de células progenitoras de oligodendrocitos a partir de ratas ((Raff et al., J. Neurosci., 3:1289, 1983; Raff et al., Nature, 303:390, 1983; Espinosa de los Monteros et al., Proc. Natl Acad Sci. U. S. A., 90:50, 1993). Estos progenitores de oligodendrocitos proliferativos se conocen como progenitores O-2A debido a su capacidad para diferenciarse *in vitro* tanto en oligodendrocitos como en astrocitos de tipo 2. Otros científicos han identificado pre-progenitores de oligodendrocitos de rata o ratón en cultivo primario (Gallo, Armstrong RC, J. Neurosci., 15:394, 1995; Grinspan, Franceschini B, J. Neurosci. Res., 41:540, 1995; Decker et al., Mol. Cell. Neurosci., 16:422, 2000). Se piensa que esas células son precursoras de los progenitores de oligodendrocitos y se espera que sean más beneficiosas en la terapia celular debido a su capacidad superior de migración en comparación con los progenitores de oligodendrocitos. Desafortunadamente, los científicos no han podido expandir eficazmente esas células durante largos períodos de tiempo *in vitro*. En contraste, los científicos han informado sobre el cultivo de progenitores de O2A a partir del nervio óptico de rata o la médula espinal usando un medio condicionado B104 o combinaciones de factores de crecimiento tales como (i) el factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA) con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF básico) y neurotrofina-3 (NT-3), o (ii) PDGF-AA con factor neurotrópico ciliar (CNTF) y NT-3. Sin embargo, ninguno ha tenido éxito en la expansión masiva de estos tipos de células a partir de tejido de primates utilizando estos factores de

crecimiento.

Por lo tanto, sigue siendo muy difícil obtener y expandir una población pura o enriquecida de oligodendrocitos y/o sus células predecesoras procedentes de mamíferos distintos de la rata o el ratón. Es particularmente difícil obtener y expandir esas células procedentes de seres humanos y primates no humanos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de métodos para generar poblaciones puras o enriquecidas de células madre neurales o células progenitoras de mamífero que sean propensas a diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos *in vitro*.

Breve compendio de la invención

La presente invención se refiere a una célula neural humana aislada con capacidad de expansión, en donde la célula es una célula progenitora o una célula madre, en donde la célula conserva su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, en donde la célula conserva su capacidad para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos de forma eficaz a lo largo de pases subsiguientes, y en donde la célula expresa al menos los antígenos de la superficie celular CD133 y CD140α.

La presente invención también se refiere a un método de cultivo *in vitro* de una célula neural con capacidad de expansión, en donde la célula es una célula progenitora o una célula madre aislada a partir de un sistema nervioso central de mamífero, en donde dicha célula conserva su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y su capacidad para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos de manera eficaz, en donde el método comprende aislar y disociar al menos una célula procedente de un tejido neural fetal humano; cultivar la célula a una temperatura de 37°C en una atmósfera que comprende 1-20% de O₂ y 5% de CO₂ y en un medio de cultivo exento de suero definido químicamente, en donde el medio comprende al menos 5 ng/ml de PDGF-AA, al menos 0,5 ng/ml de bFGF y al menos 1-tioglicerol 10 μM; y realizar pases con la célula para obtener la célula neural humana con capacidad de expansión.

La presente invención se refiere además a un método para tratar una afección causada por una pérdida de mielina o una pérdida de oligodendrocitos que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una célula neural humana aislada con capacidad de expansión que es capaz de conservar su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, en donde la célula conserva su capacidad para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos de manera eficaz en los pases subsiguientes, y en donde la célula expresa al menos los antígenos de la superficie celular CD133 y CD140α.

La presente invención también se refiere a un cultivo *in vitro* que comprende al menos una célula neural aislada obtenida a partir de un sistema nervioso central de mamífero, en donde la célula se sumerge en un medio de cultivo exento de suero definido químicamente que tiene al menos 5 ng/ml de PDGF-AA, al menos 5 ng/ml de bFGF y al menos 1-tioglicerol 10 μM.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica de células madre neurales que comprende una célula neural humana aislada con capacidad de expansión.

La presente invención se refiere adicionalmente al uso de una composición farmacéutica de células madre neurales en un medicamento para tratar una afección.

La presente invención también se refiere a un método de cultivo *in vitro* y para la expansión de células madre neurales y/o células progenitoras neurales aisladas a partir de un sistema nervioso central de mamífero, en donde dichas células cultivadas y en expansión conservan su capacidad para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos. El cultivo de células en la presente invención es un cultivo por adhesión.

La presente invención se refiere además a una población aislada, pura o enriquecida de células madre neurales y/o células progenitoras neurales de mamífero, expandidas que son propensas a diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos (es decir, células positivas para 04 con morfología de tela de araña como se muestra en la Figura 7 y la Figura 15) *in vitro*.

La presente invención se refiere además a células del linaje de oligodendrocitos de mamífero a través de una expansión y diferenciación *in vitro* a partir de células madre neurales y/o células progenitoras neurales aisladas procedentes del sistema nervioso central de mamífero.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 describe el desarrollo de células madre neurales y células progenitoras neurales en los tres tipos principales de células en el cerebro: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos;

La Figura 2 muestra la comparación de la expresión de marcadores de varias células del SNC;

La Figura 3 muestra imágenes de contraste de células madre fetales humanas (HFSC, del inglés "Human Fetal Stem Cells") (clon nº 2b) en las láminas A-F;

La Figura 4 ilustra la tasa de expansión de las células HFSC (clon nº 2b) en presencia de diferentes combinaciones

de factores de crecimiento;

La Figura 5 ilustra los efectos de una dosis elevada de PDGF-AA (100 ng/ml) y 1-tioglicerol sobre la proliferación de las células HFSC (clon nº 2b);

La Figura 6 ilustra una curva de crecimiento de las células HFSC (clon nº 2b);

5 La Figura 7 describe una diferenciación espontánea de las células HFSC en medio exento de suero en las láminas A-F;

La Figura 8 es una imagen de contraste de fase tomada con un microscopio invertido que muestra la morfología de las células HFSC (clon nº 3) en varios pases;

La Figura 9 ilustra una curva de crecimiento de las células HFSC (clon nº 3);

10 La Figura 10 es una imagen de contraste de fase tomada con un microscopio invertido que muestra la morfología de las células HFSC (clon 4A y 4B) en varios pases en las láminas A-F;

La Figura 11 ilustra una curva de crecimiento de las células HFSC (clon nº 4A y nº 4B);

La Figura 12 ilustra el inmunofenotipo de células HFSC indiferenciadas en las láminas A-S;

La Figura 13, en las láminas A-H, muestra datos de una citometría de flujo que ilustran la proporción de células HFSC indiferenciadas (clon nº 2b, pase 13);

15 La Figura 14 ilustra el inmunofenotipo de células HFSC diferenciadas (clon nº 3, pase 15); y

La Figura 15 ilustra el potencial de diferenciación de las células HFSC (clon nº 2b, pase 15) en las láminas A-E.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 muestra el desarrollo de células madre neurales y células progenitoras neurales en los tres tipos principales de células en el cerebro: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Las líneas con forma de flechas negras indican la progresión de un tipo de célula a otro. La línea discontinua desde la célula HFSC a los precursores restringidos neuronales (NRP) indica que la célula HFSC tiene una menor tendencia a convertirse en un destino neuronal. La línea gruesa en negrita desde la célula HFSC a las células O2A indica que la célula HFSC tiene una mayor tendencia a producir células del linaje de oligodendrocitos. El potencial múltiple de la célula HFSC para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos se mostró en el Ejemplo 7 (véase la Figura 14). La tendencia de una célula HFSC a diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos se mostró en el Ejemplo 2 (véase la Figura 7) y en el Ejemplo 8 (véase la Figura 15).

La Figura 2 muestra una comparación de la expresión de marcadores de varias células del SNC. Esta invención describe el fenotipo de una célula HFSC en el Ejemplo 7 (véanse la Figura 12 y la Figura 13) y resume lo mismo en esta figura. Como se verá más adelante, una célula HFSC no es igual a ningún otro tipo de célula y tiene características tanto de la célula madre neural como del progenitor de oligodendrocito y astrocito de tipo 2 (O2A).

La Figura 3 describe imágenes de contraste de células madre fetales humanas (clon nº 2b) en las láminas A-F. La Figura 3, lámina A es una imagen de contraste de fase tomada con un microscopio invertido que muestra células HFSC (clon nº 2b) cultivadas en DMEM/F12 que contiene glutamina y HEPES y complementadas con complemento B27 (Invitrogen®), aminoácidos no esenciales (NEAA) (Invitrogen®), piruvato 1,5 mM (Invitrogen®), β-mercaptoetanol 55 μM (Invitrogen®) y N-acetil-L-cisteína 1 mM (Sigma), (en conjunto denominado "medio HFSCM1" de aquí en adelante) con 20 ng/ml de PDGF-AA y 10 ng/ml de bFGF en una incubadora mantenida a 37°C, 5% de O₂ y 5% de CO₂. Las células mostradas son del pase 0, día 7. Las células formaron esferas y esas esferas se extendieron en una placa de cultivo recubierta con poli-ornitina directamente sin disociar las esferas en el pase 1.

La Figura 3, lámina B y lámina C, son imágenes de contraste de fase tomadas con un microscopio invertido que muestra células HFSC (clon nº 2b) cultivadas como se describe en la descripción de la Figura 3, lámina A más arriba. Las células mostradas son del pase 1, día 1 y pase 2, día 14, respectivamente. Las células se extendieron en placas directamente sobre una placa de cultivo recubierta con poli-ornitina, se fijaron y se extendieron desde las esferas (Figura 3, lámina B). Las células de los pases se podían expandir exitosamente con esa condición de cultivo en el pase subsiguiente (Figura 3, lámina C).

Figura 3, las láminas D-F son imágenes de contraste de fase tomadas con un microscopio invertido que muestran células HFSC (clon nº 2b) después de múltiples pases y cultivadas en medio HFSCM1 con 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μM en una incubadora mantenida a 37°C, 5% de O₂ y 5% de CO₂. La mayoría de las células HFSC eran células en fase oscura agrupadas con células circundantes. Las células dispersas que se separaban de los grupos tendían a diferenciarse espontáneamente en células multipolares portadoras de pies (la morfología denominada "similar a una tela de araña") que es característica de los pro-oligodendroblastos u oligodendrocitos inmaduros (indicados por puntas de flecha blancas en la Figura 3, láminas D y E) pero su frecuencia de aparición era generalmente inferior al 1%. Las células que se muestran en la Figura 3,

láminas D, E y F son del pase 8, día 8, pase 11, día 11 y pase 19, día 11, respectivamente.

La Figura 4 ilustra la tasa de expansión de las células HFSC (clon nº 2b) en presencia de diferentes combinaciones de factores de crecimiento: (1): 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF; (2): 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 5 ng/ml de NT-3; (3): 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1; (4): 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 5 ng/ml de NT-3 + 10 ng/ml de IGF-1. Las células se recogieron el día 11 del pase 3 (P3D11) y se contó el número de células vivas con cada combinación. Luego, se realizaron los pases en las mismas condiciones que se usaron en el pase 3 con la misma densidad celular. Las células se recogieron el día 8 del pase 4 (P4D8) y se contó el número de células vivas en cada condición (esas células se recogieron antes de que se volvieran subconfluentes porque comenzaron a formar esferas). La combinación (4) era la más eficaz en el pase 3 pero no en el pase 4. La combinación (3) era eficaz en ambos pases.

La Figura 5 ilustra los efectos de una dosis elevada de PDGF-AA (100 ng/ml) y 1-tioglicerol sobre la proliferación de células HFSC (clon nº 2b); cultivadas en medio HFSCM1 en presencia de las siguientes combinaciones de factores de crecimiento: (1): 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1; (2): 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1 + 1-tioglicerol 50 µM; (3): 100 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1; (4): 100 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1 + 1-tioglicerol 50 µM; (5): 100 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 1-tioglicerol 50 µM. Las células se recogieron el día 7 del pase 5 (esas células se recogieron antes de que se volvieran subconfluentes porque comenzaron a formar esferas como lo hicieron en el pase 4) y se contó el número de células vivas con cada combinación. La combinación de 20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF también se analizó, pero el número de células recuperadas era demasiado bajo para evaluarlas (menos de 1×10^4 células que estaba por debajo del intervalo contable) y sus datos se eliminaron de ese cálculo. La combinación (1) podía expandir las células en el pase 3 pero no podía expandir las células en el pase 5. La adición de 1-tioglicerol 50 µM [combinación (2)] o el aumento de la concentración de PDGF-AA a 100 ng/ml [combinación (3)] tenía un efecto positivo muy bajo sobre la tasa de expansión. Cuando se combinaron la adición de 1-tioglicerol 50 µM y el aumento de la concentración de PDGF-AA a 100 ng/ml [combinación (4)], la tasa de expansión celular mejoraba enormemente y las células se podían expandir satisfactoriamente. Cuando se eliminó el IGF-1 de esa combinación [combinación (5)], la tasa de expansión disminuyó a <1 , lo que indicaba que el IGF-1 también favorecía la proliferación y/o la supervivencia de las células HFSC.

La Figura 6 muestra una curva de crecimiento para células HFSC humanas (clon nº 2b) (círculo blanco con una línea negra). Las células HFSC (clon nº 2b) se cultivaron inicialmente en presencia de 10 ng/ml de PDGF-AA y 10 ng/ml de bFGF. Se añadieron 10 ng/ml de IGF-1 desde el pase 3. La concentración de PDGF-AA se incrementó de 20 ng/ml a 100 ng/ml desde el pase 6. Sin embargo, esto tenía muy poco o ningún efecto sobre la tasa de expansión de las células. Se añadió 1-tioglicerol 50 µM desde el pase 7. Las células HFSC (clon nº 2b) comenzaron a crecer rápidamente en presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 µM. Se añadieron 10 ng/ml de NT-3 en el pase 17. NT-3 mejoraba un poco el crecimiento celular pero sus efectos desaparecieron después de un pase. Este panel también incluye curvas de crecimiento para células HFSC humanas (clon nº 2b) congeladas el día 6 del pase 10 (P10 Día 6: círculo blanco con línea discontinua) y el día 11 del pase 11 (P11 Día 11: círculo blanco con línea de puntos). Las células congeladas se podían expandir con una velocidad similar después de la descongelación.

La Figura 7 describe la diferenciación espontánea de las células HFSC en medio exento de suero en las láminas A-F. Las láminas A y B son imágenes de contraste de fase tomadas con un microscopio invertido que muestran el cambio morfológico de las células HFSC (clon nº 2b) en el pase 12, día 9 (Figura 7, láminas A y B) después de ser cultivadas en medio HFSCM1 complementado con 20 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 µM (Figura 7, lámina A) o sin 1-tioglicerol (Figura 7, lámina B). Las células HFSC se diferenciaban espontáneamente sin reponer el bFGF entre el cambio de medio. Incluso con las mismas condiciones, las células HFSC no se diferenciaban si el bFGF se reponía todos los días y parecía que crecían lentamente. Además, en las células HFSC se bloqueaba la diferenciación y se formaron agrupaciones cuando se empleaban 40 ng/ml de PDGF-AA o más. Al disminuir la concentración de PDGF-AA de 100 ng/ml a 20 ng/ml y sin reponer el bFGF, las células se podían diferenciar espontáneamente en células multipolares portadoras de pies con morfología similar a una telaraña, que expresaban el antígeno O4 (Figura 7, láminas C y D) y/o el antígeno GalC (Figura 7, láminas E y F), una característica que define las células del linaje de oligodendrocitos [es decir, pro-oligodendroblasto (positivo para O4 y negativo para GalC), oligodendrocito inmaduro (positivo para O4 y positivo para GalC)].

La Figura 8 son imágenes de contraste de fase tomadas con un microscopio invertido que muestran la morfología de las células HFSC (clon nº 3) en varios pases. Las células madre neurales convencionales se expandían inicialmente en presencia de bFGF y EGF durante 15 días (véase la Figura 8, lámina A el día 15 del pase 0). Después de eso, las células se cultivaron en medio HFSCM1 con 20 ng/ml de PDGF-AA y 10 ng/ml de bFGF en una incubadora mantenida a 37°C, 5% de O₂ y 5% de CO₂. La concentración de PDGF-AA se incrementó a 100 ng/ml y se añadieron 10 ng/ml de IGF-1 desde el pase 4 (véase la Figura 9). Se añadió 1-tioglicerol 50 µM desde el pase 8 (véase la Figura 9). Su morfología se volvió casi idéntica a la del clon nº 2b después de varios pases.

La Figura 9 muestra una curva de crecimiento para células HFSC humanas (clon nº 3) (círculo blanco con una línea negra). Las células HFSC (clon nº 3) se cultivaron inicialmente en presencia de 10 ng/ml de EGF y 10 ng/ml de bFGF para expandir las células madre neurales convencionales. A continuación, la combinación de factores de

crecimiento se cambió a 20 ng/ml de PDGF-AA y 10 ng/ml de bFGF desde el pase 1. Se añadieron 10 ng/ml de IGF-1 y 10 ng/ml de NT-3 desde el pase 2. Basándose en los datos mostrados en la Figura 4, NT-3 se eliminó de ese cultivo y la concentración de PDGF-AA se incrementó de 20 ng/ml a 100 ng/ml desde el pase 4. Sin embargo, esto tenía muy poco efecto o ninguno sobre la tasa de expansión de las células como se muestra en el clon n° 2b. Se añadió 1-tioglicerol 50 μ M desde el pase 5, y después las células HFSC (clon n° 3) comenzaron a crecer rápidamente en presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M como las células HFSC (clon n° 2b). Este panel también incluye curvas de crecimiento para células HFSC humanas (clon n° 3) congeladas el día 7 del pase 10 (P10 Día 7: círculo blanco con línea discontinua). Las células congeladas se podían expandir con una velocidad similar después de la descongelación.

La Figura 10 son imágenes de contraste de fase tomadas con un microscopio invertido que muestra la morfología de las células HFSC (clon 4A y 4B) en varios pases en las láminas A-F. Las células se cultivaron en medio HFSCM1 y 1-tioglicerol 50 μ M con 20 ng/ml de PDGF-AA, 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de IGF-1 (clon n° 4A) o 100 ng/ml de PDGF-AA, 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de IGF-1 (clon n° 4B) en una incubadora mantenida a 37°C, 5% de O₂ y 5% de CO₂. El clon n° 4A crecía más lentamente que el clon n° 4B, inicialmente, pero comenzó a crecer aproximadamente a la misma velocidad que el clon n° 4B desde el pase 2. Se volvieron casi homogéneos y su morfología se volvió casi idéntica a la del clon n° 2b o n° 3 después de 3 pases.

La Figura 11 muestra una curva de crecimiento para células HFSC humanas (clon n° 4A: cuadrado blanco con línea discontinua y n° 4B: círculo blanco con línea negra). Se cultivaron células HFSC (clon n° 4A) en presencia de 20 ng/ml de PDGF-AA, 20 ng/ml de bFGF, 20 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M. Se cultivaron células HFSC (clon n° 4B) en presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M. El número de células de ambos clones se reducía fuertemente al principio y esta disminución era más prominente en el clon n° 4A. Después de esa disminución inicial del número de células, estas comenzaron a expandirse rápidamente. Este panel también incluye una curva de crecimiento para células HFSC humanas (clon n° 4B) congeladas el día 6 del pase 5 (P5 Día 6: círculo blanco con línea discontinua).

La Figura 12 ilustra el inmunofenotipo de células HFSC indiferenciadas en las láminas A-S; (clon n° 2b, pase 12-16) cultivadas en presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M, y una tinción positiva para cualquiera entre CD133, Sox2, Nestina, Olig2, PDGF-R α , NG2, A2B5, PSA-NCAM, GFAP o Vimentina. DAPI se utilizó para teñir con colorante de contraste los núcleos celulares. Estas figuras mostraban que al menos el 90% de las células eran positivas para CD133, Sox2, Nestina, Olig2, PDGF-R α , NG2, A2B5 y vimentina, pero no había células positivas para GFAP. La tinción con PSA-NCAM era un poco débil, pero todavía más del 90% de las células parecían positivas para PSA-NCAM.

La Figura 13, en las láminas A-H, muestra datos de una citometría de flujo que ilustran la proporción de células HFSC indiferenciadas (clon n° 2b, pase 13). Los histogramas de línea negra representaban el control de isotipo y los histogramas rellenos de gris representaban cada antígeno analizado. Estos datos mostraban que la mayoría de las células HFSC eran positivas para CD133 (Figura 13, lámina A), positivas para CD9 (Figura 13, lámina B), positivas para CD140a (Figura 13, lámina C), positivas para NG2 (Figura 13, lámina D), positivas para A2B5 (Figura 13, lámina E), positivas para O4 (Figura 13, lámina F) y positivas para PSA-NCAM (Figura 13, lámina G). Según se analizó mediante inmunocitoquímica (datos no mostrados), eran negativas para CD44 (Figura 13, lámina H).

La Figura 14 ilustra el inmunofenotipo de células HFSC diferenciadas (clon n° 3, pase 15) cultivadas en medio que contenía suero durante 31 días y teñidas con anticuerpos que reconocían neuronas (Tubulina β III, Neurofilamento-L y MAP2), oligodendrocitos (O4, MBP) y astrocitos (GFAP), seguido de un anticuerpo secundario fluorescente. DAPI se utilizó para una tinción de contraste de los núcleos celulares. Las células HFSC podían diferenciarse en células positivas con cada marcador. Para evaluar la localización conjunta del axón neuronal y la mielina, las células se tiñeron conjuntamente con anticuerpo anti-Tubulina β III y anticuerpo anti-MBP (Figura 14, láminas A-C), anticuerpo anti-Neurofilamento-L y anticuerpo anti-MBP (Figura 14, láminas D-F), anticuerpo anti-MAP2 y anticuerpo anti-MBP (Figura 14, láminas G-I). Solamente unos pocos axones neuronales y mielina parecían estar localizados juntos. Para evaluar la localización conjunta del antígeno O4 y MBP, las células se tiñeron conjuntamente con anticuerpo de O4 y anticuerpo anti-MBP (Figura 14, láminas J-L). La mayoría de las señales para MBP se localizaban junto con la señal para el antígeno O4. Las células HFSC también podían diferenciarse en astrocitos que eran positivos para el antígeno GFAP (Figura 14, láminas M-O). Además, muchas células dieron positivo para vimentina que se expresaba en muchas células epiteliales, incluyendo astrocitos y células mesenquimáticas. Además, las células indiferenciadas también eran positivas para vimentina (datos no mostrados).

La Figura 15 ilustra el potencial de diferenciación de las células HFSC (clon n° 2b, pase 15) en las láminas A-E. Las células se diferenciaron en DMEM/F12 que contenía glutamina y HEPES y se complementaron con complemento B27, complemento N2 y 1-tioglicerol 50 μ M con 10 ng/ml de PDGF-AA, 100 ng/ml de IGF-1, 10 ng/ml de BDNF y pCPT-AMPC 100 pM. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-GD3 y anticuerpo de O4 siguiendo con un anticuerpo secundario fluorescente después de una diferenciación durante 4 días. Las células indiferenciadas expresaban GD3 de forma más fuerte que las células progenitoras de oligodendrocitos y O4 viceversa (punta de flecha de la Figura 15, láminas A, B y C muestran células indiferenciadas). La mayoría de las células diferenciadas mostraban una morfología multipolar con una señal de GD3 débil y una señal de O4 fuerte, lo que indicaba que eran células progenitoras de oligodendrocitos o pro-oligodendroblastos. Otros tipos de células (por ejemplo, astrocitos y

neuronas) se definieron como una población de células negativas para GD3 y negativas para O4. La Figura 15, lámina D muestra la proporción de cada población celular a partir de 10 imágenes diferentes de las células diferenciadas. Más del 70% del total de células se diferenciaba en células progenitoras de oligodendrocitos ($75,8\% \pm 2,09\%$). Más del 20% del total de células todavía eran células indiferenciadas ($23,5\% \pm 2,03\%$). El otro tipo de células era menor del 1% del total de células ($0,7\% \pm 0,41\%$). Se calculó la proporción de células progenitoras de oligodendrocitos y otros tipos de células frente a células diferenciadas (células progenitoras de oligodendrocitos más otros tipos de células) y se muestra en la Figura 15, lámina E. Las células progenitoras de oligodendrocitos era el $99,1\% \pm 0,56\%$ de las células diferenciadas mientras que los otros tipos de células eran el $0,9\% \pm 0,56\%$ de las células diferenciadas.

10 Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

La invención es tal y como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un método para cultivar y expandir células madre neurales o células progenitoras neurales aisladas a partir de un sistema nervioso central de mamífero, que no es de un embrión humano, para producir una población pura o enriquecida de células madre neurales o células progenitoras neurales que tienen la capacidad de diferenciarse en oligodendrocitos o células del linaje de oligodendrocitos *in vitro*. Tanto las células madre neurales como las células progenitoras neurales generan una progenie que son células neuronales (como progenitores neuronales o neuronas maduras) o células gliales que incluyen astrocitos y oligodendrocitos. Aunque las células madre neurales son tienen la capacidad de auto renovarse (es decir, son capaces de proliferar indefinidamente), las células progenitoras neurales puede que sean capaces, pero no necesariamente, de una auto renovación. Los métodos de cultivo de la presente invención pueden producir una población celular expandida que se puede diferenciar en al menos en un 70%, 80%, 90% o 95% de células del linaje de oligodendrocitos, las cuales son células progenitoras de oligodendrocitos y oligodendrocitos, de células diferenciadas.

Las siguientes abreviaturas y definiciones se utilizan en esta solicitud:

La expresión "célula HFSC" o célula obtenida a partir de la médula espinal fetal humana, se refiere a la población pura o enriquecida de células madre neurales de mamífero expandida y/o de células progenitoras neurales que se describen en esta invención.

La expresión "medio HFSCM1" se refiere a DMEM/F12 que contiene glutamina y HEPES y está complementado con el complemento B27 (Invitrogen®), aminoácidos no esenciales (NEAA) (Invitrogen®), piruvato 1,5 mM (Invitrogen®), β -mercaptoetanol 55 μ M (Invitrogen®) y N-acetil-L-cisteína 1 mM (Sigma) en combinación.

La expresión "células gliales" se refiere a células no neuronales del sistema nervioso central e incluye oligodendrocitos maduros, astrocitos y células progenitoras asignadas a uno o a ambos tipos de estas células.

La expresión "células progenitoras multipotenciales" se refiere a células progenitoras neurales que tienen el potencial de dar origen a células a partir de linajes múltiples, pero un número limitado.

"Pluripotencial" (derivado del latín "plurimus" o "muchísimo" y "potentia" o "con potencia") se refiere a una célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, los pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, aparato urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las células madre neurales son multipotenciales y no pluripotenciales. Las células madre embrionarias son pluripotenciales y no multipotenciales.

Una "célula progenitora asignada" es una célula progenitora asignada o destinada a convertirse en un tipo específico de célula madura. Esto contrasta con una célula progenitora multipotencial o pluripotencial, que tiene el potencial de convertirse en uno entre dos o más tipos de células maduras (como las células progenitoras O-2A que pueden convertirse en oligodendrocitos o astrocitos de tipo 2, dependiendo de la sincronización y de factores ambientales).

Un "oligodendrocito" es un tipo de célula glial cuya función principal es aislar los axones de las células nerviosas en el sistema nervioso central de algunos vertebrados.

La expresión "células del linaje de oligodendrocitos" se refiere a oligodendrocitos, pro-oligodendroblastos y progenitores de oligodendrocitos (por ejemplo, el progenitor O2A). Esta expresión no incluye los precursores restringidos a la glía o a las células madre neurales.

Las expresiones "células progenitoras de oligodendrocitos" y "progenitores de oligodendrocitos" se usan indistintamente a lo largo de esta solicitud y se refieren a células que están determinadas para formar más células progenitoras y/o progenie que son oligodendrocitos preferentemente neuronas o tejido no neurológico. A menos que se especifique lo contrario, pueden, pero no necesariamente, tener la capacidad de producir otros tipos de células gliales (como los astrocitos de tipo 2). Esta expresión, tal como se usa en el presente documento, no incluye pre-progenitores de oligodendrocitos o precursores restringidos a la glía (véase la Figura 1).

Los "pre-progenitores de oligodendrocitos" son células predecesoras de los progenitores de oligodendrocitos.

Los "pro-oligodendroblastos" son células predecesoras de los oligodendrocitos posmitóticos.

Células "en expansión" en un cultivo significa aumentar el número de células en presencia de un medio de cultivo que contiene complementos que estimulan la proliferación celular.

5 La "tasa de expansión" celular se refiere al número de células en una fecha particular dividido por el número de células iniciales al comienzo del cultivo.

Las células progenitoras neurales o las células madre neurales "expandidas", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a células progenitoras neurales o células madre neurales que se obtienen a partir de células progenitoras neurales o células madre neurales aisladas que han proliferado *in vitro*, produciendo la población celular expandida.

10 Las células "sometidas a pases" (también conocidas como células en "subcultivo" o "división") se refiere a una técnica que permite que las células se mantengan vivas y crezcan en condiciones de cultivo de laboratorio durante largos períodos de tiempo al disociar las células entre sí (con enzimas como la tripsina o la colagenasa) y después transferir una pequeña cantidad de las células a un nuevo recipiente de cultivo. Las células pueden cultivarse durante más tiempo si se realizan pases a intervalos regulares, ya que se evita la senescencia prematura asociada
15 con una alta densidad celular prolongada.

Un "entorno de crecimiento" es un entorno en el que las células de interés proliferarán, se diferenciarán y/o madurarán *in vitro*. Las características del entorno incluyen el medio en el que se cultivan las células, cualquier factor de crecimiento o factor inductor de la diferenciación que pueda estar presente, y una estructura de soporte (como un sustrato sobre una superficie sólida), si está presente.

20 **Técnicas generales**

Los métodos generales en biología celular, química de proteínas y técnicas de anticuerpos se pueden encontrar en Current Protocols in Protein Science (J.E. Colligan et al., compiladores, Wiley & Sons); Current Protocols in Cell
25 Biology (J.S. Bonifacino et al., Wiley & Sons) y Current Protocols in Immunology (J.E. Colligan et al. compiladores, Wiley & Sons). Los métodos para el cultivo de células se describen en general en la edición actual de Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (R.I. Freshney etl, Wily & Sons); General Techniques of Cell Culture (M.A. Harrison & I.F. Rae, Cambridge Univ. Press). Los suministros y reactivos para el cultivo de tejidos están disponibles en proveedores comerciales como Chemicon®, Millipore®, R&D Systems®, Invitrogen®, Nalgene-Nunc® International, Sigma-Aldrich® y ScienCell.

Los libros de referencia especializados, relacionados con esta descripción incluyen Principles of Neuroscience, 4^a
30 edición, Kandel et al. compiladores, McGraw-Hill 2000; CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances, M. H. Tuszynski & J.H Kordower, compiladores, Academic Press, 1999; The Neuron: Cell and Molecular Biology, 3^a edición, I. B. Levitan y L.K. Kaczmarek, Oxford U. Press, 2001; Glial Cells: Their Role in Behavior, P.R. Laming et al. compiladores, Cambridge U. Press 1998; The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease, Matsas & Tsacopoulos compiladores, Plenum Pub. Corp, 1999; Glial Cell Development, Jessen & Richardson compiladores,
35 Oxford U. Press, 2001; y Man of Steel, Adrian Hill, 1996.

En el contexto de la ontogenia celular, el adjetivo "diferenciado" es un término relativo. Una célula diferenciada es una célula que ha progresado adicionalmente a lo largo de la vía de desarrollo que la célula con la que se compara.
40 Por lo tanto, las células madre neurales se pueden diferenciar de los progenitores con restricción de linaje. Estos, a su vez, se pueden diferenciar en células a lo largo de la vía o en células diferenciadas en la etapa terminal, como neuronas u oligodendrocitos maduros.

Las células diferenciadas de esta invención se pueden caracterizar dependiendo de si expresan marcadores fenotípicos característicos de los oligodendrocitos. Los marcadores inmunocitoquímicos clásicos para esas células que pueden estar presentes dependiendo de la madurez de la población celular, son los siguientes:

Sox2: un marcador para las células madre pluripotenciales y las células madre neurales.

45 Nestina: un marcador para las células madre neurales.

CD133: un marcador de la superficie celular para las células madre neurales.

Receptor alfa de PDGF (PDGF-Ra): la cadena α del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Un marcador para oligodendrocitos y sus progenitores.

50 CD140a: lo mismo que PDGF-Ra. El anticuerpo CD140a reconoce un dominio extracelular de PDGF-Ra. Un marcador de la superficie celular para oligodendrocitos y sus progenitores.

CD9: una glicoproteína de la superficie celular que se sabe que forma un complejo con las integrinas y otras proteínas de la superfamilia transmembranal 4. Un marcador de la superficie celular para células madre de la línea germinal, células madre neurales, oligodendrocitos y células madre mesenquimatosas.

PSA-NCAM: moléculas de adhesión celular neural polisialiladas. Un marcador de la superficie celular para el precursor neuronal restringido (NRP), el progenitor neuronal, el neuroblasto y el pre-progenitor de oligodendrocitos. Este marcador es negativo en el precursor restringido a la glía (GRP).

5 A2B5: un marcador de la superficie celular para el precursor restringido a la glía (GRP), las células progenitoras de la glía y las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) y los astrocitos de tipo 2. Este marcador de la superficie celular es negativo en el precursor restringido a neuronas (NRP).

NG2: un proteoglicano de sulfato de condroitina. Un marcador de la superficie celular para macrófagos y células progenitoras de oligodendrocitos.

10 GD3: Gangliósido GD3. Un marcador para el pre-progenitor de oligodendrocitos y los progenitores de oligodendrocitos.

O4: un marcador para oligodendrocitos y sus progenitores.

Galactocerebrósido C (GalC): un marcador para oligodendrocitos inmaduros.

Proteína básica de mielina (MBP): un marcador para oligodendrocitos maduros.

15 CD44: una glicoproteína de la superficie celular implicada en las interacciones célula-célula, la adhesión y la migración celular y un receptor para ácido hialurónico. Un marcador de la superficie celular para algunas células epiteliales y células de linaje de astrocitos.

Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP): un marcador para los astrocitos.

Tubulina β III: un marcador para los progenitores neuronales y las neuronas.

Neurofilamento-L: un marcador para las neuronas maduras.

20 Proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2): un marcador para las neuronas maduras.

Los marcadores específicos de tejido se pueden detectar utilizando cualquier técnica inmunológica adecuada, como la inmunocitoquímica de flujo para marcadores de la superficie celular, o la inmunohistoquímica (por ejemplo, de células fijadas o secciones de tejido) para marcadores intracelulares o de la superficie celular. Un método detallado para el análisis por citometría de flujo se proporciona en Gallacher et al., Blood., 96:1740, 2000. La expresión de un antígeno de la superficie celular se define como positiva si una cantidad de anticuerpo detectable de forma significativa se une al antígeno en un ensayo convencional de inmunocitoquímica o de citometría de flujo, opcionalmente después de la fijación de las células, y opcionalmente utilizando un anticuerpo secundario marcado u otro conjugado para amplificar el marcado. Para facilitar el uso en la investigación o la terapia, frecuentemente es beneficioso maximizar la proporción de células en la población que tiene las características de los oligodendrocitos o sus progenitores. Es posible obtener poblaciones de células que son al menos un 50%, 60%, 70%, 90% o 95% de células específicas de un linaje, identificadas como positivas para uno o más de los marcadores fenotípicos característicos de esas células.

35 Para aplicaciones terapéuticas relacionadas con la reconstitución de una función neural, frecuentemente es deseable minimizar la capacidad de la población celular para formar otros tipos de células, particularmente células madre indiferenciadas, y células de linaje no ectodérmico. Dependiendo de la aplicación, también puede ser ventajoso minimizar la proporción de células del linaje neuronal y sus progenitores que están determinadas o células del linaje de astrocitos y sus progenitores están determinadas. La contaminación de las poblaciones de acuerdo con esta invención es menor del 30%, 20%, 10% o 5% de contaminación con estos otros tipos de células.

40 Los métodos de la presente invención no pueden dar como resultado el desarrollo de un organismo humano completo.

El método de la presente invención implica cultivar células madre neurales y/o células progenitoras neurales aisladas procedentes de un sistema nervioso central de mamífero en un medio definido que permite la expansión de las células a través de múltiples pases. Las células cultivadas utilizando el método de la presente invención conservan su capacidad, a lo largo de la expansión, para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos. Con las células cultivadas utilizando el método de la presente invención se pueden realizar pases más de 6 veces y expandirlas más de 1.000 veces, al tiempo que conservan su capacidad para diferenciarse posteriormente en células del linaje de oligodendrocitos. En algunas realizaciones, la población celular expandida resultante del método de cultivo de la presente invención, comprende o se puede diferenciar en una población de células que tienen al menos 30%, 50%, 70% u 80% de células del linaje de oligodendrocitos de las células diferenciadas con condiciones de cultivo exento de suero. En una realización preferida, la población del cultivo celular expandido resultante del método de cultivo de la presente invención, comprende al menos 90% de células del linaje de oligodendrocitos de células diferenciadas. En realizaciones preferidas, las células expandidas son multipotenciales. En algunas realizaciones, la mayoría de las células expandidas son capaces de diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos después de un cultivo en medio con PDGF-AA disminuido (es decir, 20 ng/ml de PDGF-AA,

preferiblemente con 10 ng/ml de bFGF con o sin 1-tioglicerol 50 μ M y opcionalmente con al menos 10 ng/ml de IGF-1 sin reponer el bFGF entre los cambios de medio. En algunas realizaciones, la mayoría de las células expandidas son capaces de diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos después de un cultivo en 10 ng/ml de PDGF-AA, 100 ng/ml de IGF-1, pCPT-AMPC 100 μ M y 10 ng/ml de BDNF en DMEM/F12 que contiene glutamina y HEPES y complementado con complemento B27, complemento N2 y 1-tioglicerol 50 μ M.

Las células madre neurales de mamífero y/o las células progenitoras neurales aisladas para uso en la presente invención se pueden obtener a partir del sistema nervioso central de un mamífero, preferiblemente un primate tal como, pero sin estar limitado a, un ser humano, pero ninguna de las cuales proviene de un embrión humano. Se sabe que los progenitores y los pre-progenitores de oligodendrocitos se encuentran en la materia blanca del sistema nervioso central. Como tales, las fuentes adecuadas a partir de las cuales se pueden aislar células para uso en la presente invención incluyen, pero sin estar limitadas a, nervio óptico, cuerpo caloso y médula espinal, en donde ninguna de las cuales proviene de un embrión humano. Además, las células madre aisladas se pueden obtener a partir de un feto de mamífero, preferiblemente de un feto de primate, tal como, pero sin estar limitado a, un feto humano en la semana 12-24 de gestación, no un embrión, usando métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las células madre aisladas se preparan a partir de tejido de la médula espinal fetal humana, obtenido a partir de una columna vertebral fetal humana, en donde ninguno de los cuales proviene de un embrión humano. En una realización preferida, las células aisladas para uso en la presente invención se obtienen a partir de médula espinal fetal humana en la semana 8-24 de gestación, preferiblemente en la semana 12-18 de gestación. Las columnas vertebrales fetales humanas se pueden obtener, por ejemplo, comercialmente a través de compañías como Advanced Bioscience Resources, Inc. (Alameda, CA, EE. UU.) con el permiso del IRB y un consentimiento informado de un donante. El tejido de la médula espinal se puede diseccionar desde la columna vertebral, eliminando las meninges y los nervios periféricos. A continuación, el tejido se puede disociar, lavar y colocar en un recipiente de cultivo que contiene un medio de crecimiento que permite la proliferación celular.

Los recipientes de cultivo adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, recipientes de cultivo con una superficie de cultivo que tiene uno o una combinación de poli-aminoácidos (por ejemplo, poli-lisina y/o poli-ornitina), plástico para el cultivo de tejidos y superficies tratadas con laminina, vitronectina o fibronectina. Las células generalmente se pueden extender en placas con una densidad que varía de 10^4 a 10^5 células/cm², preferiblemente con una densidad de aproximadamente 3×10^4 a 5×10^4 células/cm². Se puede usar poli-ornitina o poli-lisina para recubrir los recipientes de cultivo como se ha informado anteriormente (Raff et al., J. Neurosci., 3:1289, 1983; Raff et al., Nature., 303:390, 1983; Protocols for Neural Cell Culture, 3^a edición, Humana Press, Inc., 3^a edición, Humana Press, Inc.). Los recipientes de cultivo pueden recubrirse con 1 a 40 μ g/ml de poli-ornitina, preferiblemente 2 a 20 μ g/ml, más preferiblemente 5 a 15 μ g/ml. La fuerza de la fijación de las células puede variar según el proveedor, la modificación de la superficie, el formato y el lote específico de recipientes de cultivo. La concentración óptima de los materiales de recubrimiento se puede determinar para cada fuente de recipientes de cultivo, utilizando métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se realiza una incubación de dos horas con 10 μ g/ml de poli-ornitina o poli-lisina para recubrir los recipientes, por ejemplo, procedentes de BD Falcon (Sparks, MD, EE. UU.). En algunas realizaciones, se puede realizar una incubación de 30 minutos con 5 μ g/ml de poli-ornitina o poli-lisina para recubrir los recipientes, por ejemplo, procedentes de Nalgen Nunc International (Rochester, NY, EE. UU.).

Las células madre neurales y/o las células progenitoras neurales aisladas, obtenidas a partir de un sistema nervioso central de mamífero, se cultivan en un medio de cultivo químicamente definido exento de suero que permite la expansión celular sin promover la diferenciación de las células (por ejemplo, en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos). El medio de cultivo comprende un medio base tal como, pero no limitado a, medio Eagle modificado por Dulbecco:mezcla de nutrientes F-12, 1:1 (DMEM/F12) (Invitrogen[®]) (por ejemplo, medio Dulbecco modificado por Iscove, RPMI-1640 y Neurobasal). El medio base se puede complementar con diversos componentes para favorecer la salud y la supervivencia de las células. Esos componentes pueden incluir, pero no se limitan a, al menos 0,25% de aminoácidos no esenciales [NEAA (Invitrogen[®]) - una solución al 1% contiene 100 μ M de L-alanina, L-asparagina H₂O, ácido L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, glicina, L-prolina y L-serina], al menos glutamina 1,0 mM, al menos piruvato 0,5 mM, al menos complemento B27 al 1% (Invitrogen[®]), al menos N-acetil-cisteína 0,1 mM y/o al menos β -mercaptoetanol 10 μ M. En algunas realizaciones, el medio base puede comprender NS21 (como se describe en Y. Chen et al., J. Neurosci. Methods., 171:239, 2008) en lugar del complemento B27. El complemento B27 contiene albúmina de suero bovino, transferrina, insulina, progesterona, corticosterona, triiodo-1-tironina, acetato de retinol, tocoferol DL, acetato de tocoferol DL, biotina, ácido linoleico, ácido linoléico, etanolamina, selenita Na, L-carnitina, glutatión reducido, catalasa, superóxido dismutasa, D-galactosa y putrescina. Invitrogen ha revelado sus ingredientes pero no ha descrito su concentración. Sin embargo, se ha descrito la concentración de cada uno de los ingredientes de su formulación original, el complemento B18. NS21 se desarrolló basándose en esa información y se describió la concentración de cada gradiente. Funcionaba en el cultivo neuronal igual de bien que el complemento B27. Además, NS21 se podía usar para cultivar células madre neurales y progenitores de oligodendrocitos obtenidos a partir de células madre embrionarias humanas. Por lo tanto, se piensa que ese complemento es un buen candidato para reemplazar el complemento B27. En una realización preferida, el medio de cultivo comprende DMEM/F12 complementado con glutamina 1-4 mM, más preferiblemente glutamina 2,5 mM; Hepes 10-25 mM más preferiblemente HEPES 15 mM; piruvato 0,5-2,0 mM, más preferiblemente piruvato 1 mM; 1 a 4%, más preferiblemente 2% de complemento B27; 0,25-3%, más preferiblemente 1% de NEAA; 1-tioglicerol 1-200 μ M, más preferiblemente 50 μ M; N-acetil-cisteína 0,1-3 mM, más preferiblemente 1 mM; y/o β -mercaptoetanol 10-

100 μM , más preferiblemente 55 μM).

Además, el oxígeno puede facilitar la diferenciación de las células progenitoras neurales. Por lo tanto, para reducir la diferenciación celular, las células se pueden cultivar en un entorno de crecimiento con 1-20% de O_2 . En una realización preferida, las células se cultivan en una incubadora que proporciona un entorno de crecimiento con una temperatura de 37°C, 1-10%, más preferiblemente 5% de O_2 , 5% de CO_2 . Después de establecer las células HFSC, se evaluó el efecto de la concentración de oxígeno, pero no había un incremento de las células diferenciadas con condiciones de 20% de O_2 en comparación con condiciones de 5% de O_2 en condiciones de cultivo para expandir las células HFSC. El crecimiento de las células HFSC en condiciones de 5% de O_2 era un poco más rápido que con condiciones de 20% de O_2 . El oxígeno es una causa de estrés oxidativo y se sabe que induce la mutación de p53 en células de roedor. Para reducir el riesgo de mutación, se continuó cultivando las células HFSC con condiciones de 5% de O_2 .

Las células madre neurales y/o las células progenitoras neurales se cultivan en un medio de cultivo que comprende además factores de crecimiento para estimular la proliferación para aislar las células. El medio de cultivo puede contener al menos 5, 10, 20 o 40 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), al menos 2,5, 5 o 10 ng/ml de FGF básico (bFGF) y/o al menos 1-tioglicerol 10, 25 o 50 μM para aislar las células. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además al menos 1, 5 o 10 ng/ml de factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1). En algunas realizaciones, el PDGF-AA se puede reemplazar por PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC o PDGF-DD. En algunas realizaciones, bFGF se puede reemplazar por otro miembro de los factores de crecimiento de fibroblastos (por ejemplo, FGF-4 o FGF-9). En algunas realizaciones, el IGF-1 se puede reemplazar por IGF-2. En una realización preferida, el medio de cultivo comprende 1-tioglicerol 40-60 μM , 40-200 ng/ml de PDGF-AA, 5-100 ng/ml de bFGF y 5-100 ng/ml de IGF-1 para aislar las células.

Las células madre neurales y/o las células progenitoras neurales aisladas se cultivan en un medio de cultivo que comprende además factores de crecimiento para estimular la proliferación después de aislar las células. El medio de cultivo puede contener al menos 1, 2 o 5 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), al menos 0,5, 1 o 5 ng/ml de FGF básico (bFGF), y/o al menos 1-tioglicerol 10, 25 o 50 μM para expandir las células. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además al menos 1, 2 o 5 ng/ml de factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1). En una realización preferida, el medio de cultivo comprende 1-tioglicerol 40-60 μM , 5-100 ng/ml de PDGF-AA, 1-50 ng/ml de bFGF y 5-100 ng/ml de IGF-1 para expandir las células después del aislamiento de las células HFSC.

Las células madre neurales y/o las células progenitoras neurales aisladas cultivadas en las condiciones de cultivo de la presente invención muestran un tiempo de duplicación de 50-120 horas. En realizaciones preferidas, el tiempo de duplicación es de aproximadamente 60 a 100 horas. Las células pueden continuar con esa tasa de proliferación a través de al menos 8, 11, 14 o 17 pases. Las células se pueden expandir al menos 100, 250, o preferiblemente al menos 500 veces por mes. En realizaciones preferidas, las células cultivadas usando el método de la presente invención muestran una tasa de expansión >1 para más de 18 pases.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Cultivo y expansión de células HFSC; identificación del medio base y factores de crecimiento.

Se sometieron a ensayo varios medios y complementos en un experimento preliminar empleando células HFSC obtenidas a partir de médula espinal fetal humana de 12 semanas, que se había obtenido en Advanced Bioscience Resources, Inc. (Alameda, CA, EE. UU.) con el consentimiento informado de un donante. Las células se cultivaron en DMEM:F12 (1:1) (DMEM/F12) (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE. UU.) complementado con glutamina 2 mM (Invitrogen®), piruvato 1 mM (Invitrogen®) y complemento B27 al 2% (Invitrogen®) inicialmente. Se examinaron diversos factores de crecimiento para ver si estimulaban el crecimiento de las células HFSC. Los factores de crecimiento más efectivos eran la combinación de PDGF-AA y bFGF. Las células podían crecer en presencia de PDGF-AA y bFGF, pero mostraban vacuolas y parecían poco sanas. Se probaron varios complementos y se observó que DMEM/F12 complementado con NEAA al 1% además de glutamina 2 mM, piruvato 1 mM y complemento B27 al 2%, podía disminuir las vacuolas y aumentar el número de células ligeramente (datos no mostrados). Otros complementos que incluían N-acetil-cisteína 1 mM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) y β -mercaptoetanol 55 μM (Invitrogen®) parecía que mejoraban el estado de las células, pero las mejoras no fueron tan importantes como con NEAA (datos no mostrados). Por lo tanto, DMEM/F12 complementado con glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, complemento B27 al 2%, NEAA al 1%, N-acetil-cisteína 1 mM y β -mercaptoetanol 55 μM se identificó como el medio base óptimo y se usó después para cultivar las células HFSC.

La médula espinal fetal humana de 15 semanas se diseccionó de la columna vertebral, eliminando las meninges y los nervios periféricos. A continuación, el tejido se disoció con Accutase y se lavó y las células obtenidas a partir de la médula espinal fetal humana se colocaron en un recipiente de cultivo que contenía el siguiente medio de crecimiento: DMEM/F12 que contenía glutamina 2,5 mM y HEPES 15 mM, complemento B27 al 2% (Invitrogen®), NEAA al 1%, piruvato 1,5 mM (Invitrogen®), β -mercaptoetanol 55 μM (Invitrogen®), N-acetil-L-cisteína 1 mM (Sigma-Aldrich®), 20 ng/ml de PDGF-AA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) y 10 ng/ml de bFGF (R&D Systems). Las células se colocaron en una incubadora mantenida a 37°C, 5% de O_2 y 5% de CO_2 . Se añadió bFGF

(10 ng/ml) diariamente al medio de cultivo. El medio se cambió cada 2-3 días durante el pase. Basándose en los experimentos preliminares, las células en crecimiento no eran muchas en presencia de PDGF-AA y bFGF, y muchas células dejaron de proliferar o murieron en unas pocas semanas. Este resultado parece ser debido a que las células que expresan PDGF-Ra suelen ser menos del 5% de las células. Para eliminar las células que no son sensibles a PDGF-AA y bFGF, las células se cultivaron en una placa de cultivo de adhesión ultra-baja (Corning Inc., Corning, NY, EE. UU.). Las células que eran sensibles a PDGF-AA y bFGF producían esferas (véase la Figura 3, lámina A) mientras que las células que no eran sensibles a los mismos, no formaron esferas. Las esferas se recogieron con una velocidad de centrifugación que era menor (300 rpm para la recogida de esferas frente a 1.000 rpm para la recogida de las células individuales) para el cambio de medio y los pases. Después de 9 días, las células se recogieron y se pasaron a recipientes de cultivo recubiertos con poli-ornitina. Después de este período, se realizaron pases con las células cada 7-14 días. Las células mostraban una morfología heterogénea en esas etapas tempranas (véase la Figura 3, láminas B y C) y muchas de las células dejaron de proliferar al cabo de un mes. La tasa de proliferación se volvió más lenta con el tiempo y las células finalmente dejaron de expandirse. Además, las células comenzaron a parecer poco sanas, formando vacuolas en su citoplasma.

5 Ejemplo 2 - Identificación de las condiciones de un crecimiento óptimo para la expansión de células HSCF

Como se ha mencionado en el Ejemplo 1, la inclusión de PDGF-AA y bFGF en el medio de cultivo favorecía un crecimiento adecuado de las células HFSC inicialmente, pero la tasa de proliferación se redujo después de 2 pases. NT-3 (R&D Systems) e IGF-1 (Sigma-Aldrich®) se analizaron para determinar si podían mejorar la proliferación de las células HFSC. La presencia de 20 ng/ml de PDGF-AA con 10 ng/ml de bFGF era insuficiente para estimular la tasa de proliferación de las células (la tasa de expansión era <1) (véase la Figura 4). Una adición posterior de 5 ng/ml de NT-3 y/o 10 ng/ml de IGF-1 daba como resultado una tasa de proliferación mejorada (la tasa de expansión se volvió >1). La combinación de NT-3 e IGF-1 era más eficaz en el pase 3. Con las células obtenidas a partir de cada condición se realizaron pases para confirmar sus efectos. Las células se recogieron antes porque las células comenzaron a formar esferas. En el pase 4, la recuperación de la tasa de proliferación mediante una combinación de NT-3 e IGF-1 se redujo y la adición de solo IGF-1 se volvió más eficaz en el pase 4. La combinación de NT-3 e IGF-1 podía causar una diferenciación de las células o formar más esferas y pérdidas durante el cambio de medio. Por lo tanto, la adición de IGF-1 se identificó como el factor de supervivencia más efectivo y se usó posteriormente para cultivar las células HFSC. Sin embargo, la tasa de proliferación de las células HFSC comenzó a disminuir nuevamente al final del pase 4 y el número de células se redujo en comparación con el número de células sembradas. Por lo tanto, se examinó otro complemento, el 1-tioglicerol, para analizar si podía mejorar la proliferación de las células HFSC en el pase 5.

La Figura 5 muestra el efecto del 1-tioglicerol sobre la proliferación de las células HFSC. Con la combinación inicial de factores de crecimiento (20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF) las células no se podían expandir en absoluto (los datos no se mostraron en esta figura porque estaban por debajo del intervalo contable). La combinación de factores de crecimiento utilizada desde el pase 3 (20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1) era más eficaz que esta combinación (20 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF) pero no podía estimular la proliferación de las células HFSC con posterioridad al pase 4 (Figura 4). Muchos cofactores relacionados, con la biosíntesis y la degradación de los ácidos grasos y los hidrocarburos de cadena larga relacionados presentan tioles. El 1-tioglicerol se analizó a continuación en las células HFSC, ya que es uno de los antioxidantes a base de tiol y se ha informado que estimula la proliferación de algunas células (es decir, neuronas embrionarias corticales y del hipocampo de ratón, mastocitos de la médula ósea de ratón y líneas de linfocitos B humanos) en cultivo. Además, también se analizaron dosis más altas de PDGF-AA (100 ng/ml) para ver si podían complementar la disminución de la reactividad frente a los factores de crecimiento.

La adición de 1-tioglicerol 50 μ M en presencia de 20 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF y 10 ng/ml de IGF-1 estimulaba ligeramente la proliferación, pero el número de células seguía disminuyendo (tasa de expansión <1). Este resultado era similar al obtenido en ausencia de 1-tioglicerol cuando la concentración de PDGF-AA se incrementaba a 100 ng/ml en presencia de 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1. Sin embargo, cuando se incluían tanto 1-tioglicerol 50 μ M como un incremento de PDGF-AA (100 ng/ml) en el medio de cultivo (junto con 10 ng/ml de bFGF y 10 ng/ml de IGF-1), los dos componentes parecían actuar de forma sinérgica, aumentando significativamente el número de células (tasa de expansión >1). Cuando se eliminaba el IGF-1 de esa mezcla de complementos (es decir, la complementación total era de 100 ng/ml de PDGF-AA + 10 ng/ml de bFGF + 1-tioglicerol 50 μ M), la tasa de expansión disminuía a <1, lo que indicaba que IGF-1 también favorecía la proliferación y/o la supervivencia de las células HFSC. Sin embargo, si las células HFSC se cultivaban con estas condiciones durante más tiempo, las células HFSC se podían expandir incluso con estas condiciones. Estos datos indicaban que la adición de 1-tioglicerol 50 μ M y el aumento de la concentración de PDGF-AA a 100 ng/ml además de 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1, eran importantes para expandir las células. Además, la adición de IGF-1 podía no ser obligatoria, pero seguía siendo eficaz incluso en presencia de 1-tioglicerol 50 μ M y 100 ng/ml de PDGF-AA para aumentar la tasa de expansión. La combinación de 1-tioglicerol 50 μ M y 100 ng/ml de PDGF-AA además de 10 ng/ml de bFGF + 10 ng/ml de IGF-1 se empleó después para cultivar las células HFSC.

Las células HFSC se expandieron adicionalmente en presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M después del pase 6. Las células comenzaron a proliferar más rápidamente con estas condiciones después del pase y se expandieron 3-4 veces en una semana. El tiempo de duplicación era de

aproximadamente 60-100 horas con estas condiciones. Las células HFSC eran capaces de mantener este estado proliferativo incluso después del pase 8 (véase la Figura 3, lámina D), el pase 11 (véase la Figura 3, lámina E) y el pase 19 (véase la Figura 3, lámina F). Por lo tanto, el medio definido que comprendía 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M se identificó como las condiciones de cultivo óptimas para una expansión a largo plazo de las células madre neurales y/o las células progenitoras neurales.

Ejemplo 3 - Técnica de diferenciación espontánea de una célula HSCF

Al someter a ensayo diversas condiciones de cultivo, se observó que cuando las células HFSC se cultivaban con la eliminación de bFGF del medio, muchas de las células parecían diferenciarse en células bipolares o multipolares (indicativas de oligodendrocito) y morían pronto. Para evitar esas muertes celulares, se desarrolló una técnica de diferenciación espontánea.

El medio de cultivo se cambiaba generalmente cada 2 días para expandir las células HFSC y se pensó que era muy importante mantener las células HFSC en estado proliferativo. Para mejorar la diferenciación celular, el medio se cambió cada 3 o 4 días en este experimento. Se pensaba que el FGF básico y la alta concentración de PDGF-AA bloqueaban la diferenciación de las células HFSC, pero también eran importantes para la supervivencia de las células HFSC. Por lo tanto, la concentración de PDGF-AA se redujo de 100 a 20 ng/ml en presencia de 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 con 1-tioglicerol 50 μ M o sin 1-tioglicerol. Las células HFSC no podían sobrevivir bien si se eliminaba el bFGF. Normalmente, el bFGF se reponía todos los días para mantener las células HFSC en estado proliferativo. Cuando se detuvo la reposición de bFGF, muchas células HFSC se separaron de sus agrupamientos y formaron pies similares a una red compleja (indicativos de pro-oligodendroblastos y/o oligodendrocitos inmaduros) y sobrevivían bien como se muestra en la Figura 7, láminas A y B.

Estas células portadoras de pies con morfología similar a una tela de araña eran positivas para el antígeno O4 y/o el antígeno GalC como se muestra en la Figura 7, láminas de C-F, por lo tanto, se pensaba que eran pro-oligodendroblastos (positivos para O4 y negativos para GalC) u oligodendrocitos inmaduros (positivos para O4 y positivos para GalC). Incluso en presencia de 1-tioglicerol, las células HFSC se podían diferenciar, pero la complejidad del pie parecía más simple cuando el 1-tioglicerol estaba presente en el medio de cultivo, como se muestra en la Figura 7, láminas A y B. Además, otros tipos de células (por ejemplo, los astrocitos y las neuronas) se observaban raramente y se pensó que las células HFSC eran propensas a diferenciarse solo en células del linaje de oligodendrocitos. Esta técnica permitió observar células del linaje de oligodendrocitos diferenciados en un estado sano.

Estos datos indican además que las condiciones del cultivo de la presente invención son particularmente útiles para expandir células madre neurales y/o células progenitoras neurales aisladas que son propensas a diferenciarse en oligodendrocitos, ya que la mayoría de las células diferenciadas mostraban características de oligodendrocitos y se parecían a oligodendrocitos o pro-oligodendrocitos.

Ejemplo 4 - Inducción de una célula HFSC a partir de una célula madre neural convencional

Como se muestra en la Figura 1, se cree que las células madre neurales convencionales son un predecesor de la célula HFSC. Para confirmar esta relación, se examinó si la célula HFSC se podía inducir a partir de una célula madre neural convencional como se había informado anteriormente. Las células de una segunda muestra de tejido de médula espinal fetal humana (11 semanas de gestación) se cultivaron inicialmente en presencia de 10 ng/ml de EGF y 10 ng/ml de bFGF en DMEM/F12 que contenía glutamina 2,5 mM, HEPES 15 mM, complemento B27 al 2%, NEAA al 1%, piruvato 1,5 mM, β -mercaptoetanol 55 μ M y N-acetil-L-cisteína 1 mM, durante 15 días para expandir células madre neurales convencionales. Inicialmente estaban presentes muchos tipos de células diferentes, pero se obtuvo alguna población de células con capacidad de expansión al final del cultivo primario. Estos resultados se ilustran en la Figura 8, lámina A, día 15 del pase 0. Después del primer pase, las células se cultivaron con las mismas condiciones que el clon n° 2b (es decir, medio HFSCM1 con 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1, 100 ng/ml de PDGF-AA y 1-tioglicerol 50 μ M) a lo largo de 15 pases.

La morfología de las células procedentes de la población celular con capacidad de expansión obtenida al final del cultivo primario se volvió homogénea en torno al pase 5 y las células tendieron a formar agrupaciones y esferas, similares a las que se formaron con el clon n° 2b (véase la Figura 8, láminas B-F). Además, ese clon que se podía diferenciar espontáneamente en células del linaje de oligodendrocitos (datos no mostrados), mostraba el mismo inmunofenotipo que el clon n° 2b (datos no mostrados) y el mismo patrón de expresión de marcadores mediante citometría de flujo, como el descrito en el Ejemplo 7. Las células de ese clon se congelaron para futuras pruebas (por ejemplo, la Figura 12). Estos datos sugieren que una célula HFSC se podía inducir a partir de una célula madre neural convencional y se cree que la célula madre neural convencional es un predecesor de una célula HFSC.

Se pensó que el PDGF-AA actuaba a través del receptor α de PDGF. Se sabe que este receptor es estimulado por todos los miembros de la familia PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC y PDGF-DD). Se utilizó PDGF-BB para examinar si PDGF-BB podría reemplazar a PDGF-AA utilizando el clon n° 2b de células HFSC y el clon n° 3. Con PDGF-BB se podían expandir ambos clones con las mismas condiciones, excepto las de PDGF-AA, y se demostró que PDGF-AA se podía reemplazar con éxito por otros miembros de la familia de PDGF.

Ejemplo 5 - Confirmación de los componentes óptimos para el cultivo celular

Aunque el inventor sometió a ensayo varias condiciones de cultivo después de establecer la célula HFSC (clon nº 2b), el inventor observó que la respuesta a la dosis para cada factor de crecimiento había cambiado. Para aislar la célula HFSC (clon nº 2b), era necesaria una mayor concentración de PDGF-AA (100 ng/ml) además de 1-tioglicerol 50 µM. Después de que este clon empezara a proliferar de forma constante, ya no se requería una concentración elevada de PDGF-AA (100 ng/ml) para expandir ese clon. La tasa de expansión se saturó a aproximadamente 10-20 ng/ml de PDGF-AA y una mayor concentración de PDGF-AA (100 ng/ml) no tenía efectos adicionales sobre su crecimiento. Esto podía ser debido a un cultivo a largo plazo o a un uso continuo del 1-tioglicerol. Para establecer el clon nº 2b y el clon nº 3 de las células HFSC, se usó 1-tioglicerol después de varios pases. Para examinar el efecto de una concentración más elevada de PDGF-AA, se establecieron nuevos clones en presencia de 1-tioglicerol a partir de un cultivo inicial. Además, la respuesta frente a bFGF e IGF-1 parecía estar saturada a 20 ng/ml y 40 ng/ml, respectivamente. Cuando se utilizaba una concentración más alta de IGF-1 (50-500 ng/ml), se podían ver células más diferenciadas (parecía aproximadamente el 1%). Por lo tanto, se consideró que 20 ng/ml de IGF-1 era preferible para expandir las células HFSC. El uso de 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de IGF-1 mejoraba la tasa de expansión un 5-10%, en comparación con el uso de 10 ng/ml de bFGF y 10 ng/ml de IGF-1. Por lo tanto, se usaron 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de IGF-1 para este experimento.

Se cultivaron células HFSC procedentes de una tercera muestra (12 semanas de gestación) para ver si se requería una mayor concentración de PDGF-AA en los componentes identificados de un medio de cultivo óptimo y si esto proporcionaría características de crecimiento similares en otro lote de células. Las células se cultivaron en el mismo medio de cultivo que el clon nº 2b y nº 3 (es decir, medio HFSCM1 y 1-tioglicerol 50 µM) con 20 ng/ml (clon nº 4A) o 100 ng/ml (clon nº 4B) de PDGF-AA, además de 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de IGF-1. Al final del primer pase, el número de células del clon nº 4A era menos de un tercio que el del clon nº 4B (véase la Figura 11, lámina A y lámina B). Sin embargo, el clon nº 4A comenzó a proliferar con una velocidad similar a la del clon nº 4B después del pase 1, incluso con una menor concentración de PDGF-AA que el clon nº 4B. La morfología de las células se volvió homogénea en el pase 3 y las células tendían a formar agrupaciones y esferas, similares a las que se formaban con el clon nº 2b o nº 3 (véase la Figura 10, láminas C-F). Además, estas células se podían diferenciar en células del linaje de oligodendrocitos de forma espontánea como lo habían hecho los clones nº 2b y nº 3. Este resultado sugería que una mayor concentración de PDGF-AA no era obligatoria sino preferible para aislar células HFSC y que una mayor concentración de PDGF-AA no era necesaria una vez que se establecían las células HFSC. Además, este método de cultivo podía proporcionar unas características de crecimiento similares en otro lote de células y se confirmó que este procedimiento se podía repetir. Las células de este clon se congelaron para futuras pruebas.

Ejemplo 6 - Capacidad de las células HFSC expandidas para recuperarse y crecer después de un ciclo de congelación y descongelación

Las células del clon nº 2b se crioconservaron en presencia de DMSO al 8% en los pases 10, 11 y 12. Las células HFSC (clon nº 2b) congeladas en el pase 11 se depositaron en la ATCC (número de orden PTA-12291). Las células del clon nº 3 también se crioconservaron en presencia de DMSO al 8% en los pases 9 y 10. Las células del clon nº 4A y nº 4B crecieron más rápidamente que el clon nº 2b o nº 3, por lo que se crioconservaron en presencia de DMSO al 8% en el pase 4 y 5 (clon nº 4A) o en el pase 3, 4 y 5 (clon nº 4B) con las mismas condiciones. Para congelar las células HFSC se empleó el mismo medio que para cultivar las células HFSC (medio HFSCM1 y 1-tioglicerol 50 µM). Las células se descongelaron posteriormente y se cultivaron en el medio HFSCM1 exento de suero descrito anteriormente y 1-tioglicerol 50 µM con 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1, 100 ng/ml de PDGF-AA o 20 ng/ml de bFGF, 20 ng/ml de IGF-1, 20 ng/ml de PDGF-AA. Se observó que estas células proliferaban con una tasa similar a la de antes del congelamiento (véase la Figura 6, la Figura 9 y la Figura 11). Las células congeladas se usaron para experimentos posteriores que se muestran en las Figuras 12-15.

Ejemplo 7 - Caracterización de las células HFSC expandidas e indiferenciadas

Cuando las células HFSC del Ejemplo 2 se cultivaban en presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 µM, crecían en agrupaciones y/o esferas como se muestra en la Figura 3, láminas D-F. Las células dispersas que se separaban de las agrupaciones tendían a diferenciarse en oligodendrocitos como se muestra en la Figura 3, láminas D y E. Incluso cuando se realizaron pases con las células en estado de célula aislada, finalmente comenzaron a reunirse y formar nuevamente agrupaciones. Su forma en ese estado proliferativo se parecía a las células pre-progenitoras de oligodendrocitos (véase Ben-Hur y otros, *J. Neurosci.*, 18:5777, 1998; Gago et al., *Mol. Cell. Neurosci.*, 22:162, 2003), pero no como los progenitores de O-2A que crecen con una morfología bipolar sin formar ninguna agrupación. Incluso se ha descrito hace tiempo células pre-progenitoras de oligodendrocitos de rata, pero las homólogas humanas no se han descrito. Sin embargo, no fue necesario identificar el estadio preciso de la célula predecesora de oligodendrocitos en el cultivo de células expandidas, ya que conservaban independientemente su capacidad para diferenciarse en oligodendrocitos (como se muestra a continuación).

Con el fin de caracterizar el inmunofenotipo de las células HFSC indiferenciadas, las células en el pase 11-15 se disociaron en un estado de célula aislada con Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, EE. UU.) y crecieron en placas de cultivo de 24 pocillos recubiertas con poli-oritina y se cultivaron durante 3-7 días en

5 presencia de 100 ng/ml de PDGF-AA, 10 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1-tioglicerol 50 μ M. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y después se lavaron con PBS. Para teñir los antígenos de superficie, tales como CD133, PDGF-R α , NG2, A2B5, O4, O1, GalC y PSA-NCAM, las células se bloquearon con PBS que contenía suero de cabra normal al 3% (NGS) y se tiñeron con anticuerpos. Para la tinción de antígenos intracelulares como Sox2, nestina, Olig2, proteína básica de mielina (MBP), Vimentina, GFAP, Tublina β III, Neurofilamento-L y MAP2, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS enfriado con hielo durante 10 minutos antes del bloqueo. Se emplearon anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón para CD133/1 (clon AC133, Miltenyi Biotec), anticuerpo policlonal de conejo anti-PDGF-R α (Upstate), anticuerpo policlonal de conejo anti-NG2 (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgM de ratón anti-PSA-NCAM (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para A2B5 (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para O4 (R&D Systems), anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para O1 (Millipore), anticuerpo policlonal de conejo anti-Sox2 (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-Nestina (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgG2a de ratón anti-Olig2, anticuerpo monoclonal de IgG3 anti-GalC (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgG2a de rata anti-MBP (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-Vimentina (Santa Cruz), anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-tubulina β III (Millipore), anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-Neurofilamento-L (Cell Signaling), anticuerpo policlonal de conejo anti-MAP2 (Millipore) y anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-MAP2 (Millipore) en diluciones de 1:300 (CD133/1), 1:300 (PDGF-R α), 1:600 (NG2), 1:1000 (PSA-NCAM), 1:1000 (A2B5), 1:1000 (O4), 1:1000 (O1), 1:1000 (Sox2), 1:200 (Nestina), 1:200 (Olig2), 1:100 (GalC), 1:50 (MBP), 1:500 (Vimentina), 1:1000 (GFAP), 1:100 (Tublina β III), 1:200 (Neurofilamento-L), 1:1000 (MAP2, policlonal) o 1:200 (MAP2, monoclonal) en PBS que contenía NGS al 3%. Después de la incubación durante una noche a 4 °C, los pocillos se lavaron con 3 cambios de PBS que contenían NGS al 3%. En algunos casos, se usó una tinción de células vivas para algunos antígenos de la superficie celular (NG2, A2B5, O4, O1 y GD3) para reducir las señales no específicas. En ese caso, las células se tiñeron con cada anticuerpo primario antes de la fijación sin bloqueo. Anticuerpo policlonal de conejo anti-NG2, anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para A2B5, anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para O4, anticuerpo monoclonal de IgM de ratón de O1 y anticuerpo de IgG3 de ratón anti-disialogangliósido GD3 (Millipore) se emplearon en una dilución de 1:150 (NG2), 1:100 (A2B5), 1:200 (O4), 1:100 (O1) y 1:200 (GD3) en PBS que contenía BSA al 0,5%. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con 3 cambios de PBS que contenía BSA al 0,5%. Los anticuerpos secundarios, IgG de cabra anti-conejo de AffiniPure conjugada con DyLight 488 (específico para el fragmento Fc γ), IgG de cabra anti-ratón de AffiniPure conjugada con DyLight 488 (específico para el fragmento Fc γ), IgG de cabra anti-conejo AffiniPure conjugada con DyLight 488 (H+L), IgG de cabra anti-rata de AffiniPure conjugada con DyLight 594 (H+L) y/o IgM de cabra anti-ratón de AffiniPure conjugada con DyLight 594 (específica de la cadena μ) (todos los anticuerpos secundarios se adquirieron en Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) se emplearon en una dilución de 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 2 cambios de PBS. DAPI se utilizó para teñir por contraste los núcleos celulares. Las células se observaron después utilizando un Olympus IX81 equipado para epifluorescencia.

La mayoría de las células HFSC eran positivas para CD133 (véase la Figura 12, láminas A y B), positivas para Sox2 (véase la Figura 12, láminas C y D) y positivas para nestina (véase la Figura 12, láminas E y F), lo que es indicativo de células madre neurales. La mayoría de las células HFSC eran positivas para Olig2 (frecuentemente indicativo de células progenitoras de neuronas motoras y oligodendrocitos) (véase la Figura 12, láminas G y H), positivas para PDGF-R α (frecuentemente indicativo de células del linaje de oligodendrocitos) (véase la Figura 12, láminas I y J), positivas para A2B5 (A2B5 suele estar ausente en las células madre neurales y se encuentra en células progenitoras de glía, células progenitoras de oligodendrocitos y astrocitos de tipo 2) (véase la Figura 12, láminas M y N), lo que es indicativo de células progenitoras de oligodendrocitos. La mayoría de las células HFSC eran positivas para PSA-NCAM (véase la Figura 12, láminas O y P) pero había variedad en sus niveles de expresión (PSA-NCAM generalmente está ausente en las células madre neurales y se encuentra en las células progenitoras neuronales y en las células pre-progenitoras de oligodendrocitos). No se pudieron observar células positivas para GFAP aunque la mayoría de ellas eran positivas para vimentina (véase la Figura 12, láminas Q-S). Al menos el 90% de las células HFSC parecían ser positivas para los marcadores anteriores, excepto para GFAP, pero el recuento preciso era muy complicado porque las células HFSC tendían a formar agrupaciones y a separarse de los recipientes de cultivo muy fácilmente durante la fijación y la tinción. Para cuantificar su pureza, se realizó un análisis por citometría de flujo y se muestra en la Figura 13.

Además, las células HFSC indiferenciadas se teñían débilmente con el anticuerpo de O4 que es un marcador de pro-oligodendroblastos (positivo para O4, negativo para GalC) y oligodendrocitos inmaduros (positivo para O4, positivo para GalC) mediante inmunocitoquímica, pero era difícil de distinguir con una tinción débil y una tinción inespecífica. En ese cultivo se pudieron observar algunos pro-oligodendroblastos que mostraban células muy positivas para O4 con morfología multipolar, pero su frecuencia de aparición era inferior al 1% del total de células.

Además, las células HFSC indiferenciadas se teñían débilmente con el anticuerpo anti-MAP2, pero su morfología no era como una neurona. Cuando se empleaba el anticuerpo con las células diferenciadas en presencia de suero, las neuronas se identificaban con señales fuertes y morfología neuronal (véase la Figura 14, lámina H). Esa señal fuerte de MAP2 con morfología neuronal no se identificaba en las células HFSC indiferenciadas. Esa señal débil desaparecía cuando las células se diferenciaban, por lo que esa tinción parecía ser específica y las células HFSC indiferenciadas podían no ser una tinción no específica.

En general, la célula HFSC expresaba los marcadores específicos para células madre neurales (CD133, Sox2 y Nestina) y marcadores específicos para células del linaje de oligodendrocitos (Olig2, NG2, A2B5 y O4). Esos datos sugerían que la célula HFSC podía ser una célula intermedia entre la célula madre neural y la célula progenitora de oligodendrocitos. Además, las células HFSC expresaban PSA-NCAM además de los antígenos anteriores, lo que es indicativo de que es el homólogo humano de una célula progenitora de oligodendrocitos de rata.

El poli(ácido siálico) (PSA) de PSA-NCAM es un glicano largo de la superficie celular cargado negativamente, con un enorme volumen hidratado que sirve para modular la distancia entre las células. El PSA está implicado en una serie de respuestas relacionadas con la plasticidad en el SNC adulto, que incluyen cambios en los patrones circadianos y hormonales, adaptaciones al dolor y al estrés, y aspectos del aprendizaje y la memoria (Rutishauser Nat. Rev. Neurosci., 9:26, 2008). Una de las funciones del PSA en el sistema nervioso neonatal es en la migración de los progenitores de oligodendrocitos. Cuando se elimina el PSA de los progenitores de O2A que migran, la migración del progenitor de O2A se inhibía en un modelo de herida (Barral-Moran et al., J. Neurosci. Res., 72:679, 2003). Otra función es controlar la sincronización de la diferenciación de las células. El PSA se expresa tanto en los axones en desarrollo como en los precursores de oligodendrocitos, y su regulación a la baja en esas células se correlaciona con el inicio de la mielinización. El PSA también está relacionado con las respuestas asociadas a la plasticidad del SNC adulto. Dada la capacidad del PSA para regular el desarrollo y la plasticidad adulta, se deduce que una célula que expresa PSA podría tener valor terapéutico en una situación en la que los tejidos han sido dañados por una lesión o enfermedad. Un crecimiento de nuevo axonal en la región que expresa PSA (expresión de PSA modificada por ingeniería genética en la cicatriz o en las células de Schwann injertadas) se observó a través de la cicatriz en un modelo de trauma. La célula HFSC es una célula endógena que expresa PSA y tendrá el mismo efecto sobre el tratamiento del trauma que una lesión cerebral o una lesión de la médula espinal.

Para caracterizar adicionalmente las células HFSC (clon nº 2b), las células que se congelaron en el pase 11, se descongelaron, se cultivaron en condiciones de crecimiento descritas anteriormente y se realizaron pases cada 7-9 días. Las células cultivadas durante 9 días en el pase 13, se sometieron después a citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-CD133/1 conjugado con PE (clon AC133, Miltenyi Biotec); anticuerpo monoclonal de IgG2a de ratón para CD140a conjugado con PE (clon α R1, BD Pharmingen); anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón para CD9 conjugado con PE (clon M-L13, BD Pharmingen); anticuerpo monoclonal de IgG2b de ratón para CD44 conjugado con PE (clon G44-26, BD Pharmingen); anticuerpo monoclonal de IgM de ratón anti-PSA-NCAM conjugado con PE (2-2B, Miltenyi Biotec); anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para A2B5 conjugado con PE (clon 105HB29, Miltenyi Biotec); anticuerpo monoclonal de IgM de ratón para O4 conjugado con PE (clon O4, Miltenyi Biotec); y anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón anti-NG2 conjugado con PE (R&D Systems). Brevemente, después de la disociación con Accutase, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS enfriado con hielo, con EDTA 2 mM y BSA al 0,5% y se conservaron sobre hielo. Después se contó el número de células y el número de células se ajustó a 1×10^7 células/ml utilizando PBS enfriado con hielo, con EDTA 2 mM y BSA al 0,5%. Se transfirieron 25 μ l de suspensión celular (250.000 células) a cada tubo de 1,5 ml. Después se añadieron los anticuerpos primarios a cada tubo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron controles del isotipo conjugados con PE para cada anticuerpo, para establecer las puertas de entrada apropiadas. Después de 20 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo, con EDTA 2 mM y BSA al 0,5% y se resuspendieron en tampón de fijación (BD Bioscience). Después de 20 minutos de fijación sobre hielo, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS helado con EDTA 2 mM y BSA al 0,5%. La fluorescencia de las células se midió utilizando FACS Canto II (BD Bioscience) y cada dato se analizó utilizando el programa informático GateLogic (Inivai Technologies Pty Ltd.).

Como se muestra en la Figura 13, todas o la mayoría de las células HFSC (clon nº 2b) eran positivas para CD133 (100% de las células), positivas para CD9 (100% de las células), positivas para CD140a (98,8% de las células), positivas para NG2 (89,8% de las células), positivas para A2B5 (99,9% de las células), positivas para O4 (94,6% de las células), positivas para PSA-NCAM (68,9% de las células) y negativas para CD44 (0,4% de las células eran positivas). Mediante inmunocitoquímica, la señal de O4 apenas podía distinguirse de la tinción inespecífica y era mucho más débil que la señal de O4 de los pro-oligodendroblastos u oligodendrocitos. Partiendo del resultado de la citometría de flujo, la señal de O4 de las células HFSC (clon nº 2b) se podía separar del control del isotipo y las células HFSC (clon nº 2b) aparecían débilmente positivas para el antígeno O4. Las células HFSC (clon nº 3) mostraban casi el mismo fenotipo por citometría de flujo. Eran positivas para CD133 (98,4% de las células), positivas para CD9 (99,4% de las células), positivas para CD140a (91,5% de las células), positivas para NG2 (63,4% de las células), positivas para A2B5 (99,8% de las células), positivas para O4 (71,6% de las células), positivas para PSA-NCAM (74,7% de las células) y negativas para CD44 (0,3% de las células eran positivas).

55 Ejemplo 8 - Potencial de diferenciación de las células HFSC expandidas en medio que contiene suero

Para someter a ensayo el potencial de diferenciación de las células expandidas, las células HFSC (clon nº 3) se sometieron a pases en la etapa de células separadas/individuales y se cultivaron en medio que contenía suero [medio de diferenciación de células precursoras de oligodendrocitos (OPCDM)] (ScienCell® Research Laboratories) para estimular la diferenciación. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpos que reconocían neuronas (anticuerpo anti-Tubulina β III, anticuerpo anti-Neurofilamento-L y anticuerpo anti-MAP2), células progenitoras de oligodendrocitos y oligodendrocitos [anticuerpo de O4, anticuerpo de O1, anticuerpo anti-GalC y anticuerpo anti-proteína básica de mielina (MBP)], y astrocitos (anticuerpo anti-GFAP), seguido de un anticuerpo secundario

conjugado con un colorante fluorescente (DyLight 488 o DyLight 594, Jackson ImmunoResearch). DAPI se utilizó para teñir con colorante de contraste los núcleos celulares.

Se observó que después de los tratamientos los tres principales fenotipos del sistema nervioso central (SNC) estimulaban la diferenciación de las células HFSC. Cuando las células HFSC se cultivaban en un medio que contenía suero, se detectaron células positivas para Tubulina β III, células positivas para Neurofilamento-L y células positivas para MAP-2 (indicativo de neuronas). Había muchas células positivas para Tubulina β III (Figura 14, lámina B), mientras que un pequeño número de células era positivo para Neurofilamento-L (Figura 14, lámina E) o MAP2 (Figura 14, lámina H). Este resultado indicaba que muchas de ellas son neuronas inmaduras. Las células HFSC también podían diferenciarse en células positivas para MBP. MBP es un componente importante de la mielina y se expresa solo en oligodendrocitos maduros. Estos datos indican que las células HFSC tienen la capacidad de diferenciarse en oligodendrocitos maduros. Se evaluó la co-localización de MBP y los marcadores neuronales anteriores, pero solo se pudo observar una co-localización escasa (Figura 14, láminas C, F, I). Esto podía deberse a una inmadurez de las neuronas porque la mielina no envuelve el axón de una neurona inmadura. También se evaluó la co-localización de MBP y el antígeno O4 (Figura 14, láminas J-L). La mayoría de la señal de MBP se localizaba conjuntamente con la señal del antígeno O4, pero solo la mitad de la señal del antígeno O4 se localizaba junto con la señal de MBP. Este resultado era razonable porque el antígeno O4 se expresa en los progenitores de oligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros y oligodendrocitos maduros, mientras que MBP se expresa solo en los oligodendrocitos maduros. Estas células también eran positivas para el antígeno GalC que es un marcador de los oligodendrocitos inmaduros (datos no mostrados). Las células positivas para GFAP (astrocitos) y las células positivas para vimentina también se detectaron como se muestra en la Figura 14, láminas M-O. Estos datos indican que las células HFSC expandidas son multipotenciales y que, por lo tanto, son probablemente células madre neurales, ya que son capaces de dar lugar a los tres fenotipos principales de células del sistema nervioso central dependiendo del entorno. La célula HFSC (clon n° 2b) también se sometió a ensayo con las mismas condiciones y se mostró la misma multipotencia que la célula HFSC (clon n° 3).

Ejemplo 9 - Potencial de diferenciación de las células HFSC expandidas en medio exento de suero

Las células HFSC mostraban una buena potencia de diferenciación en oligodendrocitos al reducir la concentración de PDGF-AA, sin reponer el bFGF como se muestra en la Figura 5. Sin embargo, las células diferenciadas eran menos de la mitad del total de células. Si las células HFSC se sembraban con una densidad muy baja ($<0,5 \times 10^4$ células/cm²) sin bFGF con 10 ng/ml de PDGF-AA y 100 ng/ml de IGF-1, la mayoría de las células parecían diferenciarse pero se perdieron en un día. Para examinar su potencia para diferenciarse en oligodendrocitos adicionalmente, se consideró que una inducción de la diferenciación y una supervivencia celular a largo plazo eran muy importantes. Se sabe que el AMP cíclico (AMPc) induce la diferenciación de muchos tipos de células. El pCPT-AMPc, que es un análogo del AMPc permeable para las células, se analizó para determinar si podía inducir la diferenciación en células HFSC. pCPT-AMPc 100 μ M podía inducir la diferenciación de las células HFSC con una densidad elevada (3×10^4 células/cm²) pero las células no podían sobrevivir bien incluso en presencia de 100 ng/ml de IGF-1. Se ha informado que el BDNF mejora la diferenciación de los progenitores de oligodendrocitos y favorece la supervivencia celular de las células diferenciadas. Cuando las células HFSC se diferenciaban en presencia de 10 ng/ml de PDGF-AA, 100 ng/ml de IGF-1, pCPT-AMPc 100 μ M y 10 ng/ml de BDNF en DMEM/F12 que contenía glutamina y HEPES y se complementaron con complemento B27, complemento N2 y 1-tioglicerol 50 μ M, al menos más de la mitad de las células HFSC se diferenciaban en células portadoras de pies. Debido a que las células HFSC expresan varios marcadores de oligodendrocitos, tales como O4 o NG2, se requería el nuevo método para distinguir las células HFSC y las células del linaje de oligodendrocitos. Basándose en diversos ensayos, el inventor observó que las células indiferenciadas expresan GD3 de forma más fuerte que las células progenitoras de oligodendrocitos y O4 viceversa (punta de flecha de la Figura 11, lámina A, lámina B y lámina C). Cuando las células se teñían con GD3 y O4, los oligodendrocitos se podían distinguir usando su patrón de tinción y su morfología. Además, otros tipos de células como las neuronas o los astrocitos también se podían identificar porque no expresan el antígeno GD3 o O4. La Figura 15, lámina D muestra la proporción de cada tipo celular. Las células indiferenciadas eran el 23,5% \pm 2,0% del total de células. Las células progenitoras de oligodendrocitos eran el 75,8% \pm 2,1% del total de células. Los otros tipos de células eran solo el 0,9% \pm 0,6%. Como se ha mencionado anteriormente, la proporción de células progenitoras de oligodendrocitos frente a células diferenciadas (células progenitoras de oligodendrocitos más otros tipos de células) era del 99,1% \pm 0,56% de las células diferenciadas, mientras que otros tipos de células eran el 0,9% \pm 0,56% de las células diferenciadas. Estos datos indican que las células HFSC tienen un alto potencial para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos.

Ejemplo 10: La célula HFSC se enriquece o se selecciona mediante un método de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o un método de clasificación magnética

La presente invención describe el fenotipo de una célula HFSC que es positiva para CD133, positiva para CD140a, positiva para CD9, negativa para CD44, positiva para PSA-NCAM, positiva para A2B5, positiva para O4 y positiva para NG2. Esta información permite seleccionar o enriquecer una célula HFSC sin cultivar. CD133 es un marcador de células madre neurales y no se expresa en las células progenitoras o precursoras. CD9 también se usa como un marcador de células madre neurales, pero se sabe que algunos oligodendrocitos expresan CD9. PSA-NCAM y A2B5 se utilizan para detectar precursores con restricción de neurona o precursores con restricción de glía. Se piensa que la mayoría de los precursores y progenitores neurales expresan PSA-NCAM y A2B5 o bien PSA-NCAM o A2B5, su

5 uso no puede enriquecer tan bien las células HFSC, especialmente en el primer y segundo trimestre. CD140a, NG2, A2B5 y O4 se utilizan como marcadores de células precursoras de oligodendrocitos, pro-oligodendroglía y oligodendrocitos. El nivel de expresión de CD140a y NG2 era más alto en las células HFSC que en las células precursoras de oligodendrocitos, pro-oligodendroglía u oligodendrocitos, mientras que el nivel de expresión de A2B5 y O4 era más bajo en las células HFSC que en las células precursoras de oligodendrocitos, pro-oligodendroglía u oligodendrocitos. Se cree que el uso de CD140a y NG2 es más apropiado para enriquecer las células HFSC. Basándose en la información anterior y los datos descritos en esta invención, la eficacia de cada marcador para enriquecer las células HFSC será CD140a > NG2 > CD9 > CD133 > A2B5 > O4, PSA-NCAM, pero este orden variará dependiendo de su semana de gestación.

10 Sin embargo, un solo marcador no será suficiente para seleccionar las células HFSC y con la combinación de 2 marcadores se pueden seleccionar las células HFSC más específicamente. La combinación de uno de los marcadores de células madre neurales (CD133 o CD9) y uno de los marcadores del linaje de oligodendrocitos (CD140a, NG2) será muy eficaz para seleccionar las células HFSC. Basándose en el conocimiento anterior, las combinaciones más eficaces de marcadores para seleccionar las células HFSC serán CD133 y CD140a entre esas combinaciones, pero otras combinaciones también deberían ser más eficaces que la selección con un solo marcador.

15 La frecuencia de aparición de CD133 o CD140a suele ser baja (menos del 5%) y la aparición de CD140a es más tardía (la expresión comienza aproximadamente a las 8 semanas y es máxima aproximadamente a las 18 semanas de gestación) que la de CD133. Por lo tanto, las células que expresan tanto CD133 como CD140a serán muy pocas (menos del 1% del total de células) dependiendo de su semana de gestación. La mayoría de las células positivas para CD133 puede que no expresen CD140a si las células se han obtenido a partir de tejido fetal humano en la semana de gestación 15 o antes. Debido a que las células positivas para CD133 y negativas para CD140a expresarán CD140a más tarde, las células HFSC se pueden obtener cuando las células se cultivan con las mismas condiciones que para las células HFSC después del enriquecimiento inicial de las células positivas para CD133.

20
25

REIVINDICACIONES

1. Una célula neural humana aislada con capacidad de expansión en donde la célula es una célula progenitora o una célula madre,
- 5 en donde la célula se ha obtenido a partir de un feto de mamífero, no a partir de un embrión humano y se ha cultivado en condiciones eficaces para enriquecer la célula neural con capacidad de expansión, comprendiendo dichas condiciones, un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de un complemento del crecimiento, para aislar una célula neural fetal humana,
- 10 en donde la célula conserva su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, en donde la célula conserva su capacidad de diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos de manera eficaz a lo largo de los pases subsiguientes,
- y en donde la célula expresa al menos los antígenos de la superficie celular CD133, CD140a, A2B5 y PSA-NCAM.
2. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, en donde dicha célula se ha depositado en la ATCC con el número de orden PTA-12291.
- 15 3. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, en donde la célula se obtiene a partir de un tejido neural fetal humano seleccionado a partir del grupo que consiste en médula espinal, corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado, cerebro anterior basal, mesencéfalo ventral, locus cerúleo, hipotálamo, cerebelo, cuerpo calloso y nervio óptico.
4. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, en donde dicho tejido neural se aísla a partir de la médula espinal humana de un feto humano a las 12-24 semanas de gestación.
- 20 5. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de complemento del crecimiento en el medio de cultivo es de al menos 1-tioglicerol 10 μM , preferiblemente 1-tioglicerol 10-100 μM y más preferiblemente 1-tioglicerol 50 μM .
6. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, en donde las condiciones de cultivo comprenden adicionalmente dos factores de crecimiento y un factor de supervivencia;
- 25 preferiblemente en donde dichos dos factores de crecimiento son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y están presentes en una concentración de al menos 5 ng/ml de PDGF y al menos 2,5 ng/ml de bFGF para aislar una célula neural humana;
- o preferiblemente en donde dichos dos factores de crecimiento son PDGF y bFGF y están presentes en una concentración de 40 ng/ml a 200 ng/ml de PDGF y de 5 ng/ml a 40 ng/ml de bFGF para aislar una célula neural humana;
- 30 o preferiblemente en donde dichos dos factores de crecimiento son PDGF y bFGF y están presentes en una concentración de al menos 1 ng/ml de PDGF y al menos 0,5 ng/ml de bFGF para expandir una célula HFSC después de que se establece una línea celular y para conservar la célula;
- o preferiblemente en donde dichos dos factores de crecimiento son PDGF y bFGF y están presentes en una concentración de 5 ng/ml a 100 ng/ml de PDGF y de 1 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml de bFGF para expandir una célula neural humana después del establecimiento;
- 35 y preferiblemente en donde dicho un factor de supervivencia es un factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), el cual está presente preferiblemente en una concentración de al menos 1 ng/ml de IGF, o preferiblemente en una concentración de 5 ng/ml a 100 ng/ml de IGF.
- 40 7. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 6, en donde al aislar la célula, la cantidad eficaz de complemento del crecimiento en el medio de cultivo es de al menos 1-tioglicerol 10 μM , preferiblemente 1-tioglicerol 10-100 μM y más preferiblemente 1-tioglicerol 50 μM .
8. Célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, para uso en un medicamento.
- 45 9. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión para uso según la reivindicación 8, en donde dicha célula neural humana con capacidad de expansión es una célula indiferenciada.
10. Célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una lesión de la médula espinal (SCI) o una afección causada por una pérdida de mielina o una pérdida de oligodendrocitos, en donde dicha afección es una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad desmielinizante, preferiblemente en donde dicha afección es una enfermedad desmielinizante, la enfermedad desmielinizante se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en esclerosis múltiple (EM),
- 50

leucodistrofia hereditaria, mielopatía/mielitis transversa, leucoencefalopatía focal progresiva múltiple u otras enfermedades desmielinizantes congénitas.

5 11. La célula neural humana aislada con capacidad de expansión para uso según la reivindicación 10, en donde dicha célula neural humana con capacidad de expansión se inyecta en el tejido neural o en los ventrículos laterales afectados por dicha enfermedad desmielinizante o la enfermedad neurodegenerativa.

12. Una composición farmacéutica de células madre neurales que comprende una célula neural humana aislada con capacidad de expansión según la reivindicación 1.

13. Una población enriquecida de células neurales humanas expandidas en donde las células son células progenitoras o células madre,

10 en donde las células se han cultivado en condiciones eficaces para enriquecer las células neurales expandidas, comprendiendo dichas condiciones, un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de un complemento del crecimiento,

en donde las células conservan su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos,

15 en donde las células conservan su capacidad para diferenciarse en células del linaje de oligodendrocitos de manera eficaz a través de pases subsiguientes, y en donde la población de células expresa al menos los antígenos de la superficie celular CD133, CD140a, A2B5 y PSA-NCAM, y

en donde las células no se obtienen a partir de un embrión humano.

20 14. La población enriquecida según la reivindicación 13, en donde el complemento del crecimiento es 1-tioglicerol y la cantidad eficaz de complemento del crecimiento en el medio de cultivo es de al menos 1-tioglicerol 10 μ M, preferiblemente 1-tioglicerol 10-100 μ M y más preferiblemente 1-tioglicerol 50 μ M para aislar células neurales fetales humanas.

25 15. Un método para cultivar *in vitro* una célula neural con capacidad de expansión en donde la célula es una célula progenitora o una célula madre aislada a partir de un sistema nervioso central de mamífero, en donde dicha célula conserva su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y su capacidad para diferenciarse eficazmente en células del linaje de oligodendrocitos, comprendiendo dicho método:

a) aislar y disociar al menos una célula procedente de un tejido neural fetal humano,

b) cultivar la célula a una temperatura de 37°C, en una atmósfera que comprende 1-20% de O₂ y 5% de CO₂, y en un medio de cultivo exento de suero definido químicamente, en donde el medio comprende:

30 - al menos 5 ng/ml de PDGF-AA

- al menos 2,5 ng/ml de bFGF y

- al menos 1-tioglicerol 10 μ M,

35 c) realizar pases con la célula de b) para obtener dicha célula neural humana con capacidad de expansión y, preferiblemente, en donde dicho medio de cultivo comprende adicionalmente al menos 1,0 ng/ml de IGF-1;

y preferiblemente en donde en la etapa a) dicho tejido neural se selecciona a partir del grupo que consiste en médula espinal, corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado, cerebro anterior basal, mesencéfalo ventral, locus cerúleo, hipotálamo, cerebelo, cuerpo calloso y nervio óptico;

40 y preferiblemente en donde en la etapa a), dicho tejido neural procede de una médula espinal fetal humana, preferiblemente dicha médula fetal humana está en la semana 12-24 de gestación, y preferiblemente en donde en la etapa a), dicho aislamiento se realiza mediante un método de aislamiento, dicho método se selecciona preferiblemente a partir de un método que utiliza al menos uno entre clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o inmunoclasificación.

16. El método según la reivindicación 15 en donde en la etapa b), dicho medio de cultivo comprende:

45 - 40-200 ng/ml de PDGF-AA,

- 5-100 ng/ml de bFGF,

- 1-tioglicerol 10-100 μ M y

50 - 5-100 ng/ml de IGF-1,

y preferiblemente el medio de cultivo exento de suero definido químicamente comprende DMEM/F12 complementado con aminoácidos no esenciales, glutamina, piruvato, B27, N-acetil-cisteína y β -mercaptoetanol.

5 17. Una composición farmacéutica de células madre neurales que comprende una célula neural con capacidad de expansión que ha sido cultivada *in vitro* por el método según la reivindicación 15, en donde dicha célula neural con capacidad de expansión expresa al menos los antígenos de la superficie celular CD133, CD140a, A2B5 y PSA-NCAM.

18. La composición farmacéutica según la reivindicación 12 o la reivindicación 17, para uso como un medicamento.

19. La composición farmacéutica según la reivindicación 12 o la reivindicación 17, para uso en el tratamiento de una afección causada por una pérdida de mielina o una pérdida de oligodendrocitos.

10 20. Un método para aislar una célula neural humana con capacidad de expansión en donde la célula es una célula progenitora o una célula madre aislada a partir de un sistema nervioso central de mamífero, en donde dicha célula conserva su capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y su capacidad para diferenciarse eficazmente en células del linaje de oligodendrocitos, comprendiendo dicho método las etapas de:

- identificar y disociar al menos una célula procedente de un tejido neural no embrionario humano;

15 - cultivar la célula disociada en un medio de cultivo para aislar células neurales fetales humanas, a una temperatura de 37°C, en una atmósfera que comprende 1-20% de O₂ y 5% de CO₂, y en un medio de cultivo exento de suero definido químicamente, en donde el medio de cultivo contiene al menos 5 ng/ml de PDGF-AA, al menos 2,5 ng/ml de bFGF y al menos 1-tioglicerol 10 μ M;

20 - realizar pases con las células cultivadas para obtener dichas células neurales humanas con capacidad de expansión.

21. El método según la reivindicación 20, en donde dicho medio de cultivo comprende además al menos 1,0 ng/ml de IGF-1.

25 22. Un cultivo *in vitro* que comprende al menos una célula neural aislada obtenida a partir de un sistema nervioso central de mamífero en donde la célula aislada se sumerge en un medio de cultivo exento de suero definido químicamente que comprende:

- al menos 5 ng/ml de PDGF-AA,

- al menos 1 ng/ml de bFGF; y

30 - al menos 1-tioglicerol 10 μ M;

y preferiblemente también comprende al menos 1,0 ng/ml de IGF-1;

y preferiblemente en donde el medio de cultivo exento de suero definido químicamente comprende además DMEM/F12 complementado con aminoácidos no esenciales, glutamina, piruvato, B27, N-acetil-cisteína y β -mercaptoetanol;

35 y preferiblemente en donde dicha célula neural es positiva para CD133, A2B5, PSA-NCAM y positiva para CD140a.

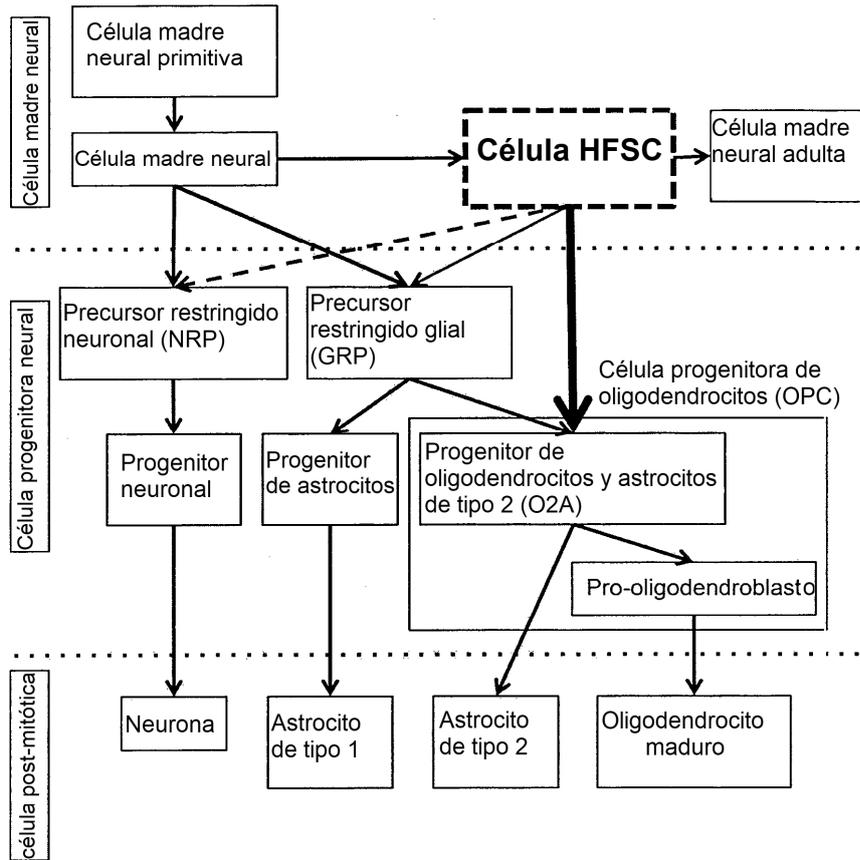


Figura 1

Tipo celular	Marcadores positivos	Marcadores negativos
Célula HFSC	CD133, Sox2, Nestina, CD9, NG2 CD140a (PDGF-R [!]), A2B5 (débil), O4 (débil), Olig2, PSA-NCAM	CD44, GFAP, Neurofilamento
Célula madre neural	CD133, Nestina, Sox2, integrina β 1/CD29, SSEA-1/LEX/CD15, CXCR4/CD184	CD34, CD45, CD44
Glía radial	GLAST, Vimentina, RC2, BLBP	
Precursor restringido neuronal (NRP)	PSA-NCAM, CD56	A2B5
Precursor restringido glial (GRP)	A2B5	PSA-NCAM
Progenitor neuronal	PSA-NCAM, tublina beta III, Nestina	A2B5
Neurona inmadura	" tublina III, Doblecortina	
Neurona madura	MAP2, Neurofilamento, Tau	
Progenitor de astrocito	S100 β , CD44	GFAP
Astrocito de tipo 1	GFAP	A2B5
Astrocito de tipo 2	GFAP, A2B5	
Progenitor de oligodendrocito y astrocito de tipo 2 (O2A)	CD140a (PDGF-R [!]), Olig2, NG2, A2B5, GD3, O4 (débil),	CD133
Pro-oligodendroblasto	NG2, A2B5, GD3 (débil), O4, Sox10	CD133, Sox2, GalC, CNPasa, MBP, PLP
Oligodendrocito inmaduro	A2B5, O4 (fuerte), GalC, CNPasa 3'-fosfodiesterasa de 2',3'-nucleótido cíclico	MBP
Oligodendrocito maduro	MBP, CNPasa, PLP	NG2, GalC

Figura 2

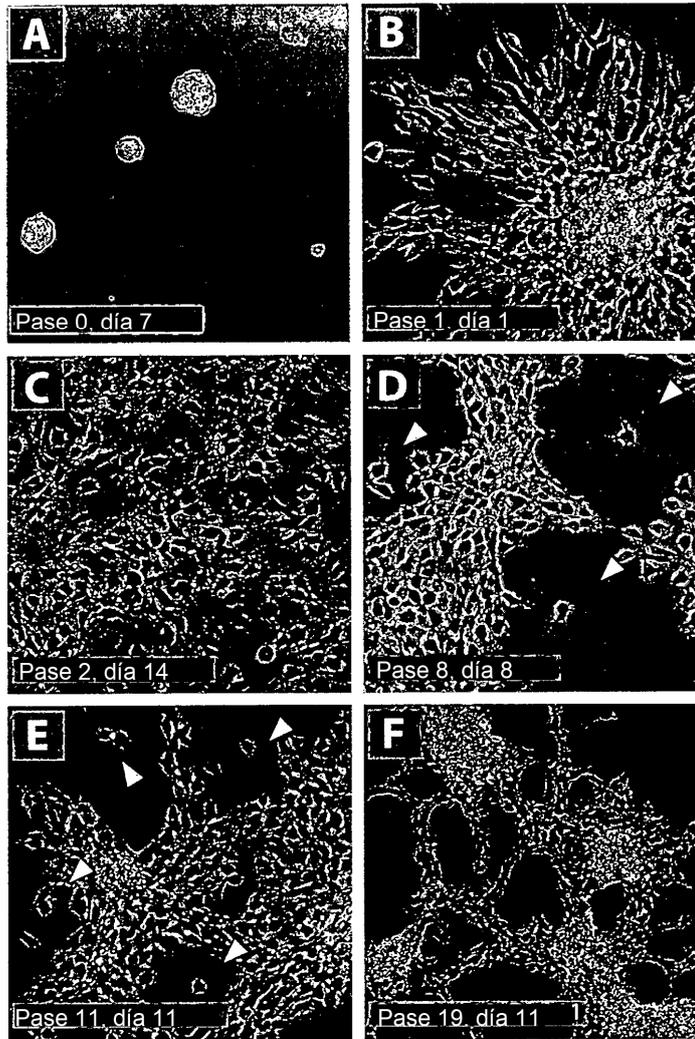


Figura 3

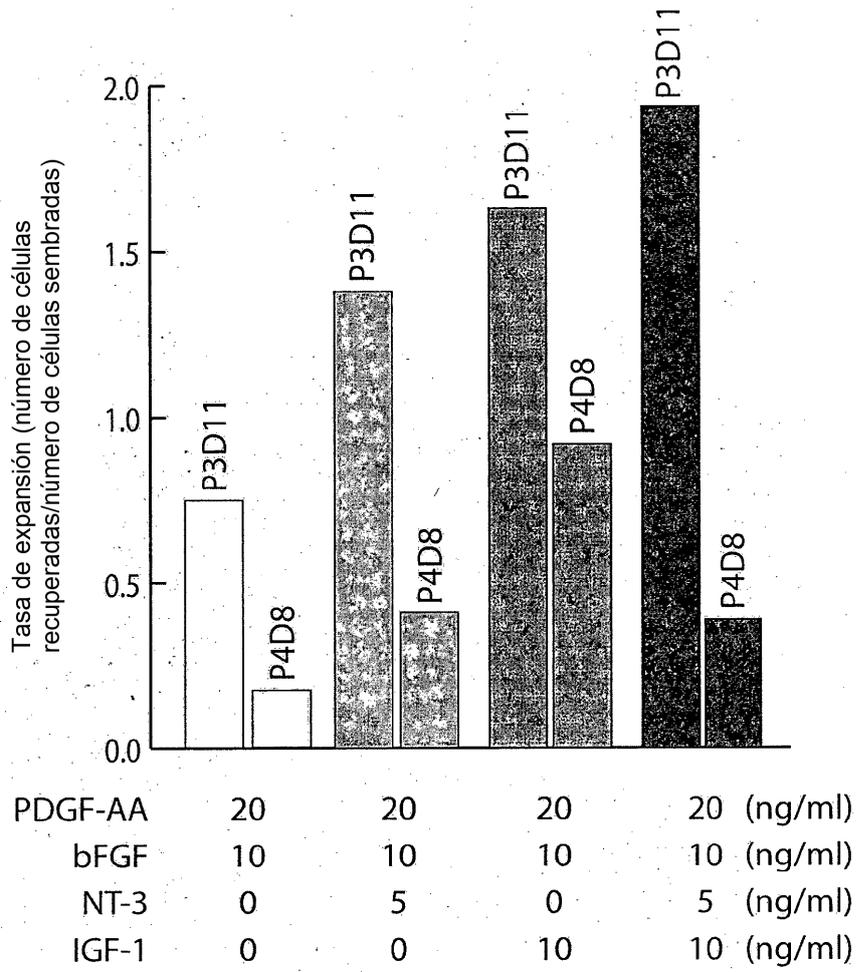


Figura 4

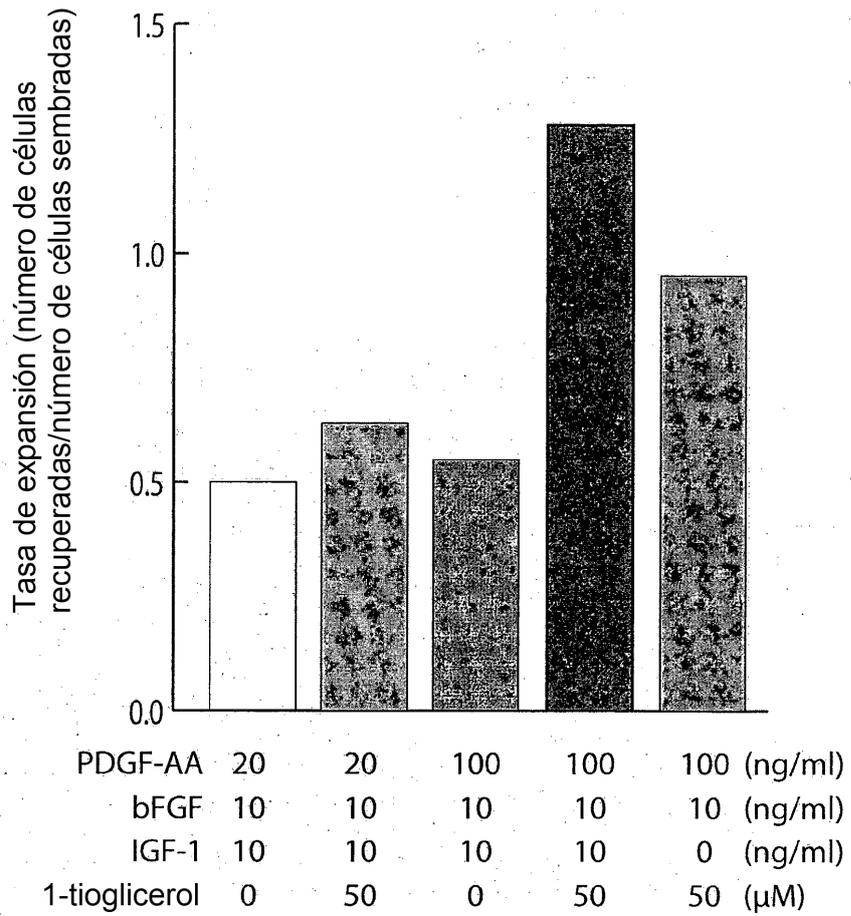


Figura 5

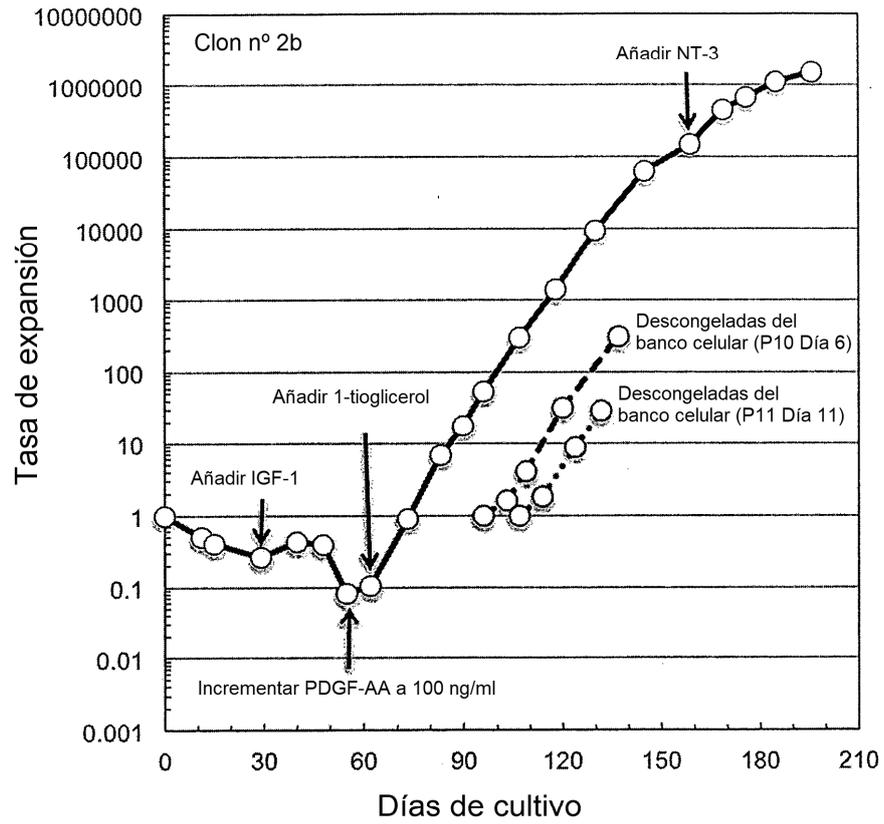


Figura 6

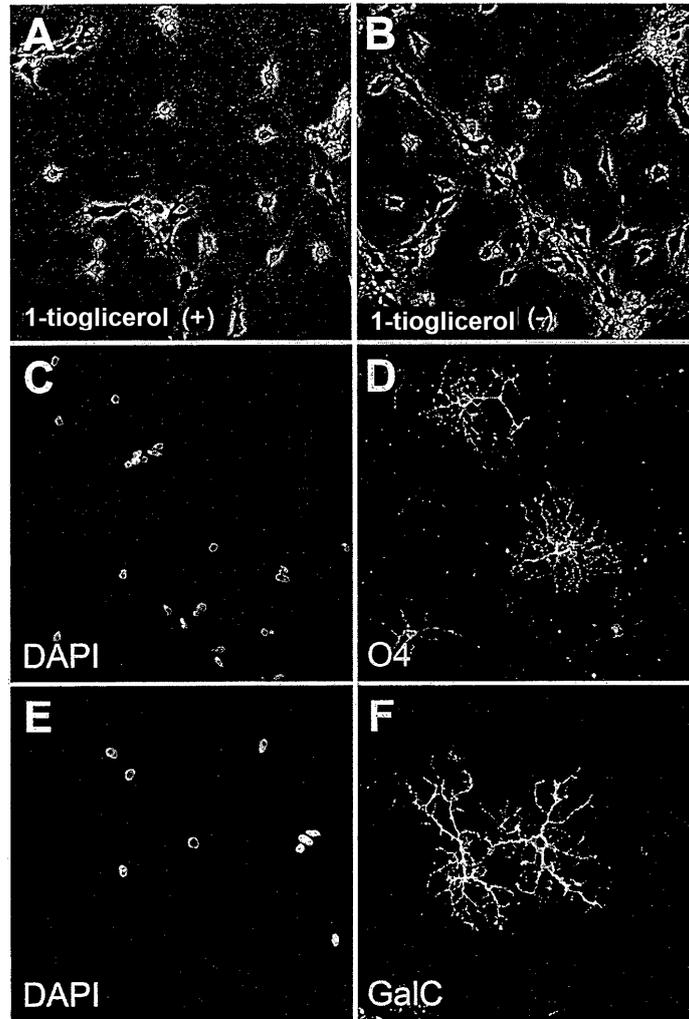


Figura 7

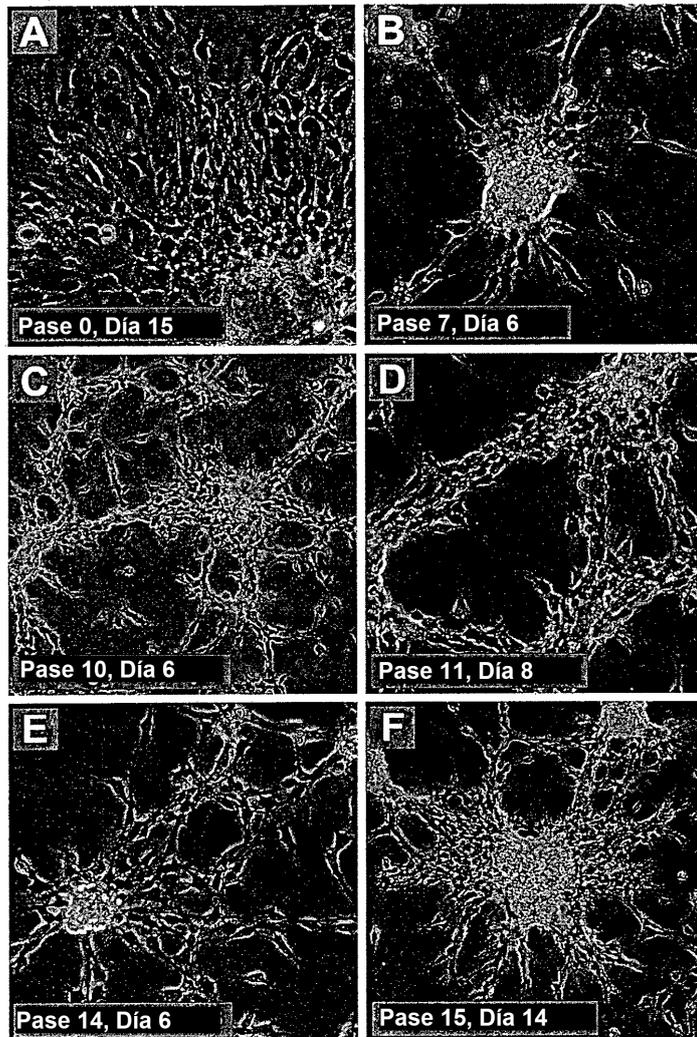


Figura 8

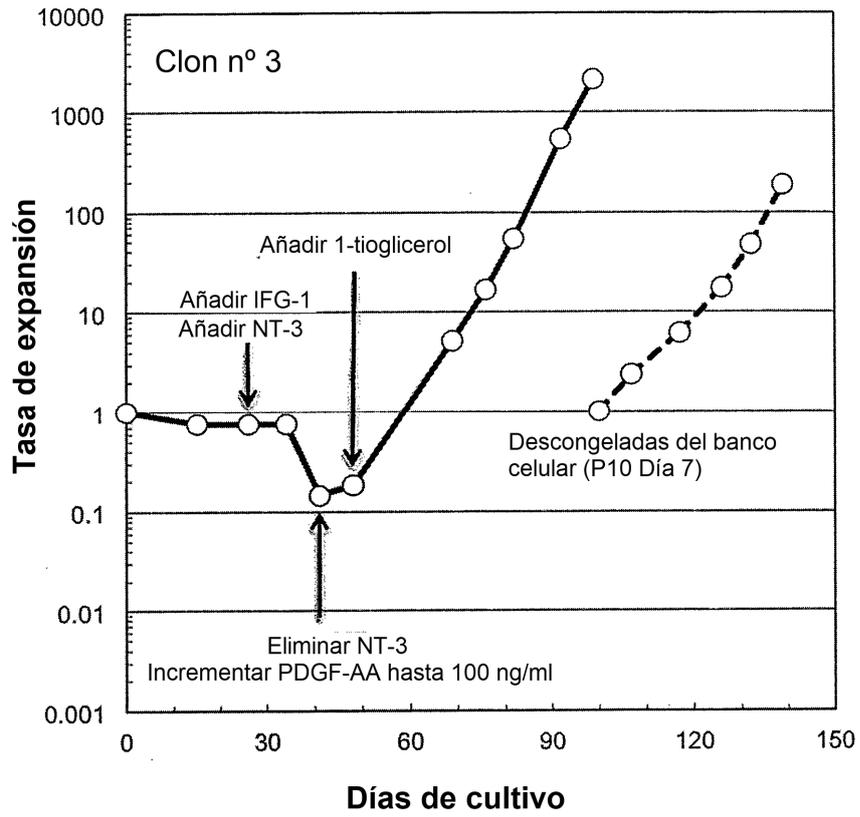


Figura 9

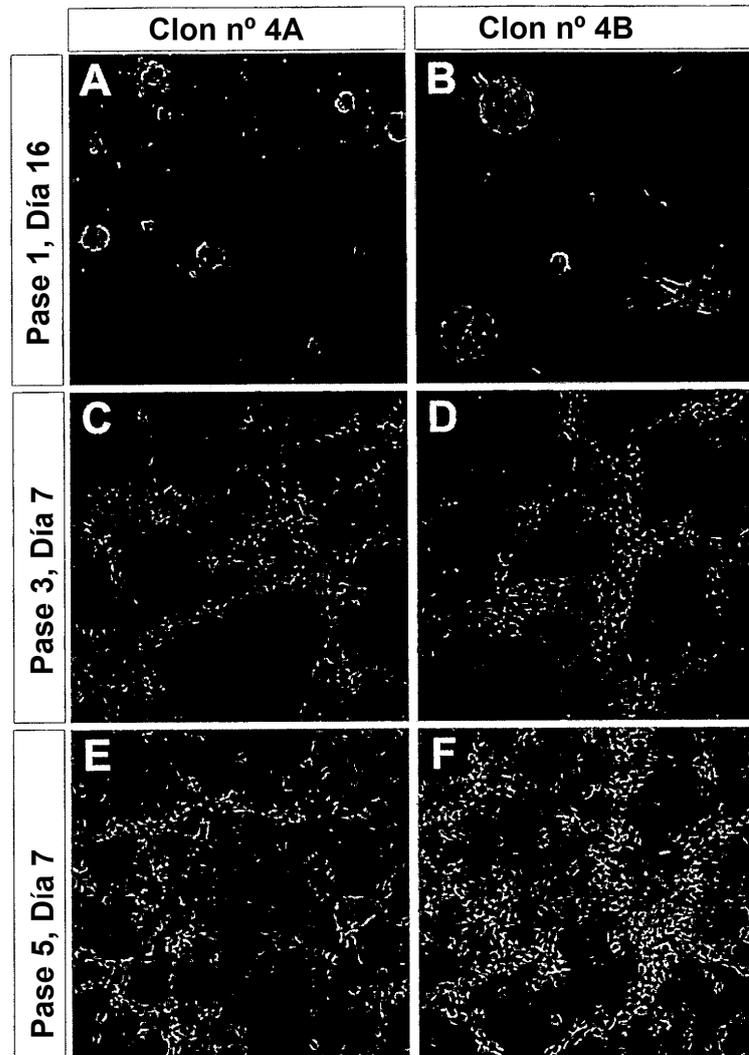


Figura 10

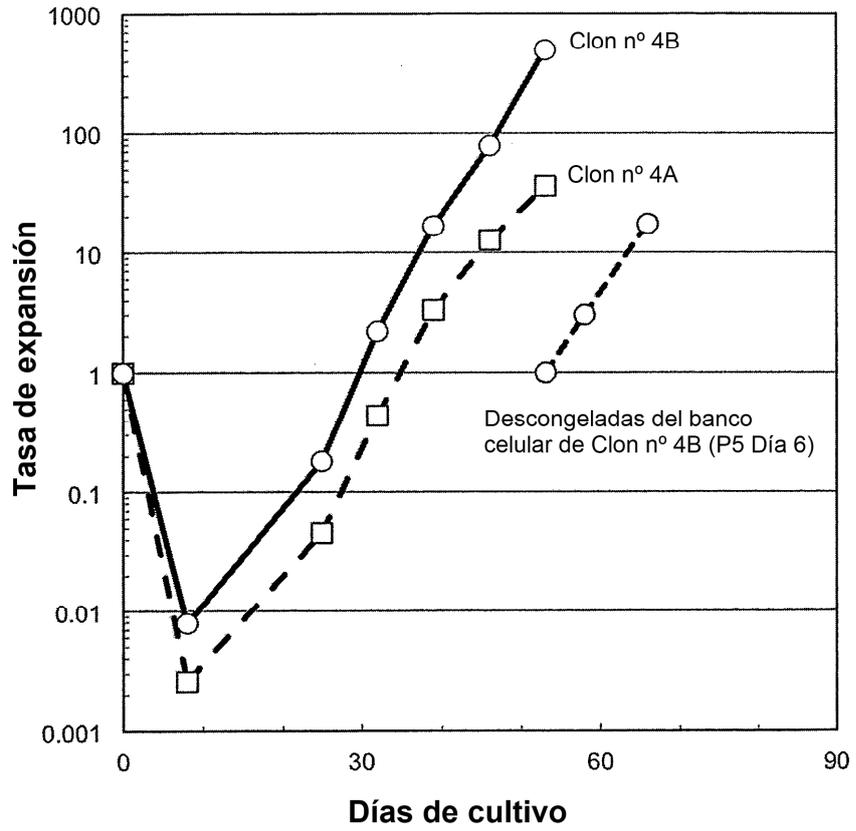


Figura 11

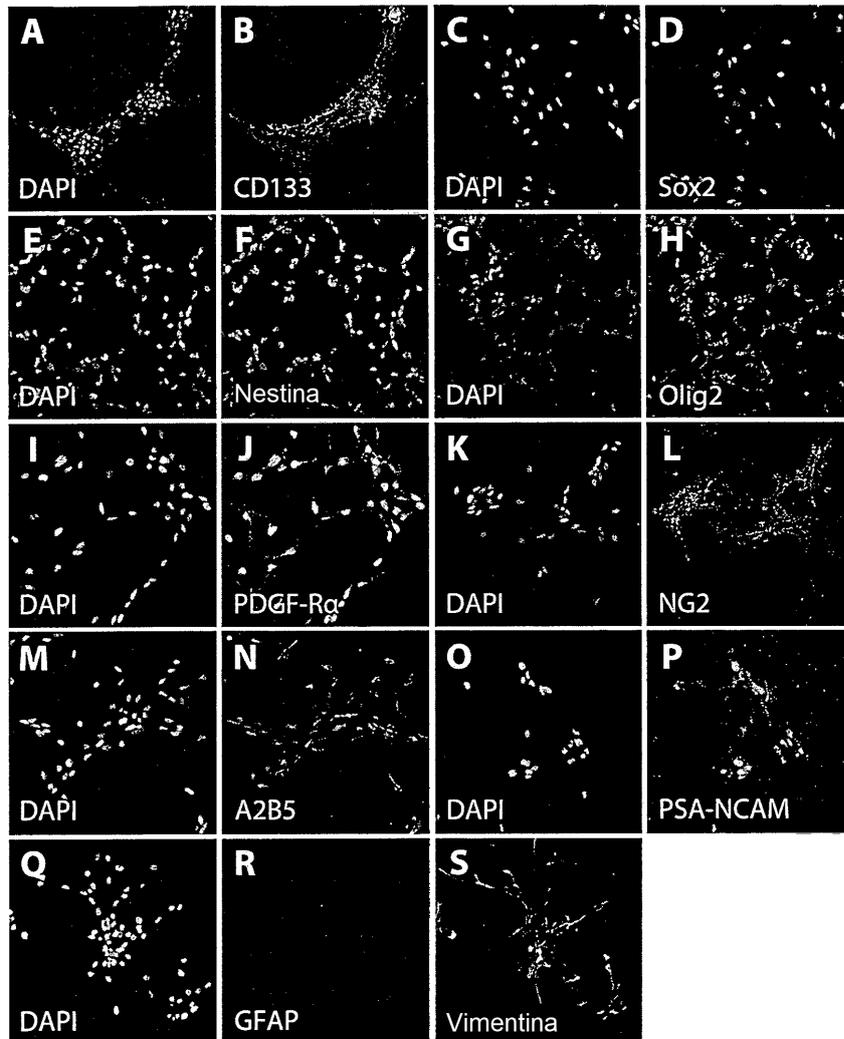


Figura 12

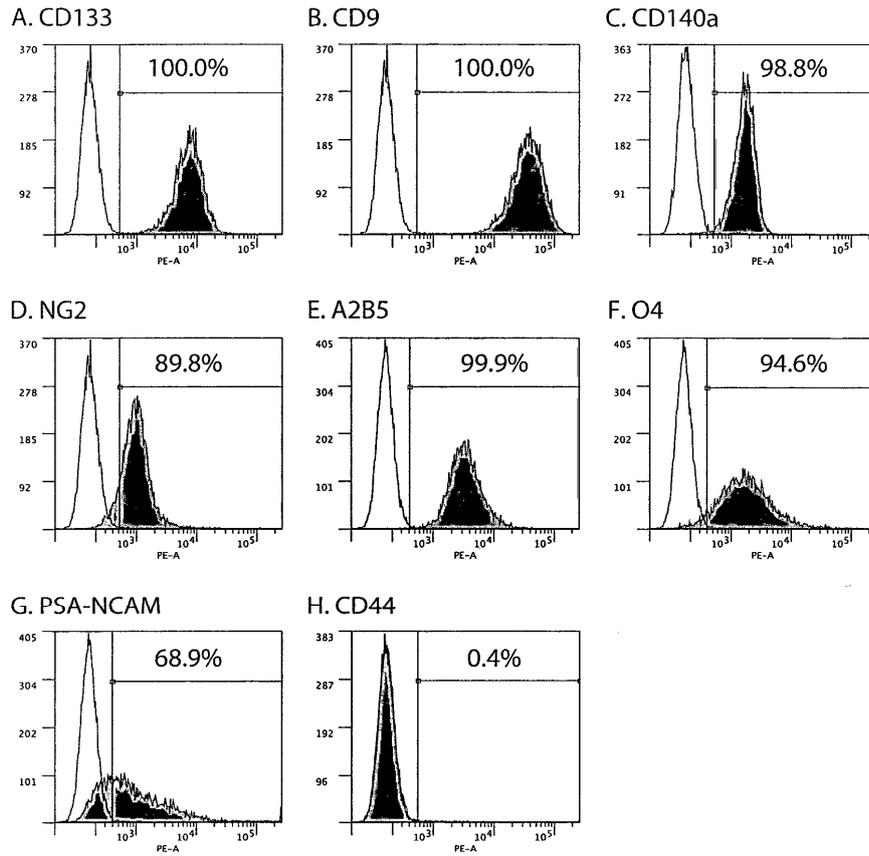


Figura 13

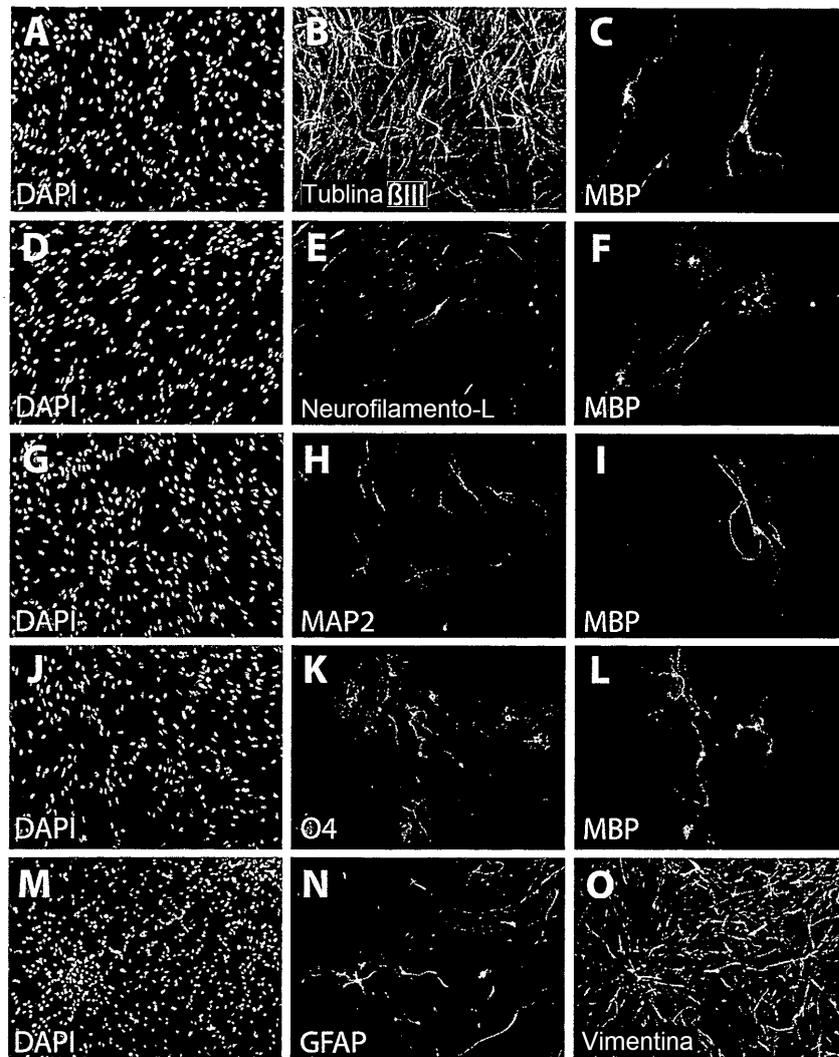


Figura 14

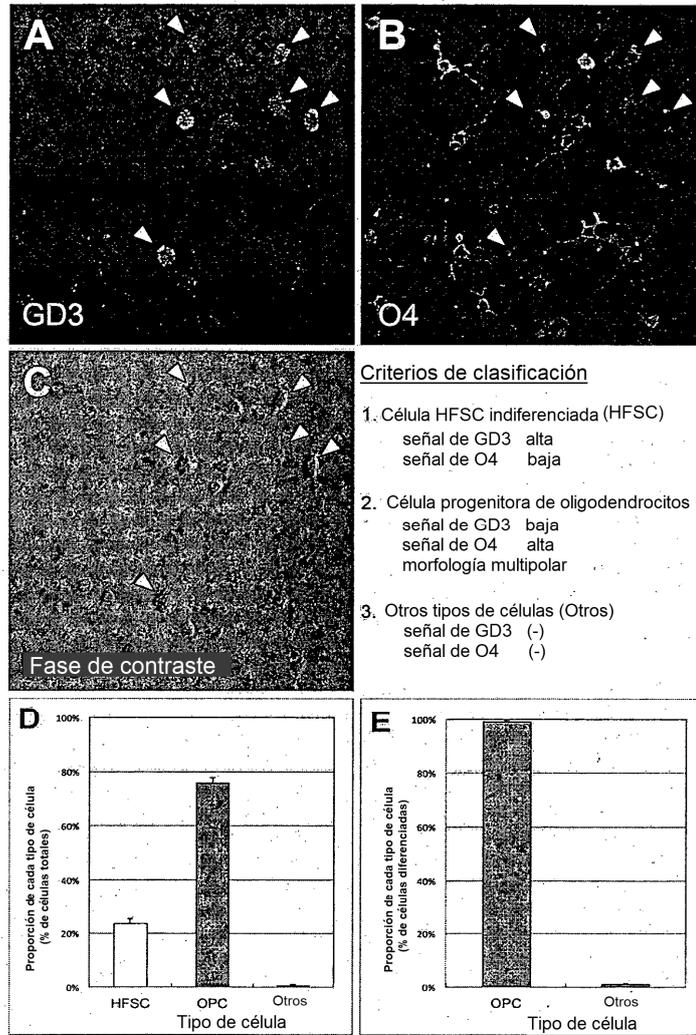


Figura 15