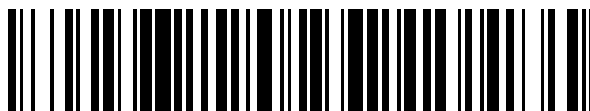


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 513**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008 E 15185035 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2985341**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular la diferenciación de células pluripotenciales**

30 Prioridad:

**03.12.2007 US 5211 P**  
**30.04.2008 US 125941 P**  
**10.06.2008 US 131577 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.10.2020**

73 Titular/es:

**SANBIO, INC. (100.0%)**  
**231 South Whisman Road, Suite A**  
**Mountain View, CA 94041-1522, US**

72 Inventor/es:

**AIZMAN, IRINA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 787 513 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

Métodos y composiciones para modular la diferenciación de células pluripotenciales

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud se refiere a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos de América n.º 61/005.211 presentada el 3 de diciembre del 2007; a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos de América n.º 61/125.941, presentada el 30 de abril del 2008; y a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos de América n.º 61/131.577, presentada el 10 de junio del 2008.

**Declaración con respecto al apoyo federal**

No aplicable.

**Campo**

La presente divulgación está en los campos de la biología del desarrollo y de la terapia celular.

20 **Antecedentes**

Las células madre mesenquimales, también conocidas como células estromales adherentes de médula son, tal como su nombre lo sugiere, una clase de células pluripotenciales, encontradas en la médula ósea, que pueden dar lugar a un cierto número de diferentes tipos de células de tejido conjuntivo que incluyen, por ejemplo, osteocitos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales, fibroblastos y células de músculos lisos.

Las células madre mesenquimales se pueden aislar y purificar a partir de muestras de médula ósea en virtud de su adherencia a la superficie plástica de los recipientes de cultivo. De esta manera, poblaciones enriquecidas de células madre mesenquimales, que están esencialmente libres de células progenitoras hematopoyéticas y de estroma de médula, se pueden obtener a partir de la médula ósea de individuos adultos. Véase la referencia de A. J. Friedenstein *et al.* (1976) Exp. Hematol. 4:276 (1976). Dichas poblaciones enriquecidas de células madre mesenquimales se pueden inducir, mediante la elección de condiciones de cultivo, para diferenciarse en diversos tipos de tejidos conjuntivos, que incluyen hueso, cartilago y tejido adiposo. Véanse, por ejemplo, las referencias de Prockop (1997) Science 276:71-74 y de Pittenger *et al.* (1999) Science 284:143-147.

Las células madre mesenquimales no se desarrollan, en el curso de la ontogenia normal, a la forma de células del sistema nervioso. Sin embargo, se ha mostrado que varios métodos de tratar a las células madre mesenquimales en cultivo desplazan su potencial de desarrollo por lo menos parcialmente en dirección a las células neuronales y gliales. Véanse, por ejemplo, la referencia de Dezawa *et al.* (2004) J. Clin. Invest. 113:1701-1710; las patentes de los Estados Unidos de América 6.528.245 (presentada el 4 de marzo del 2003), 6.989.271 (presentada el 24 de enero del 2006) y 7.129.034 (presentada el 31 de octubre del 2006); y las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos de América 2003/0003090 (presentada el 2 de enero del 2003), 2003/0203484 (presentada el 30 de octubre del 2003), 2004/0235165 (presentada el 25 de noviembre del 2004), 2006/0166362 (presentada el 27 de julio del 2006) y 2006/0251624 (presentada el 9 de noviembre del 2006). Estos documentos divulgan métodos de convertir a las células madre mesenquimales en células que tienen potencial neurogénico.

Ciertos de los métodos antes mencionados para desplazar el potencial de desarrollo de las células madre mesenquimales hacia células neuronales implican manipulación del sistema de señalización de Notch. En un aspecto de la señalización de Notch, una célula cebadora, a la que se ha encomendado diferenciarse en un linaje neuronal, señala a una segunda célula adyacente, que contiene el receptor transmembranaral de Notch en su superficie, de manera tal que se impide la diferenciación de la segunda célula en un linaje neuronal. La señal se transmite mediante un ligando de Notch (por ejemplo, *Delta*, *Serrate*, *Jagged*) situado en la superficie de la célula cebadora y da como resultado una disociación de la proteína de Notch y una translocación de su dominio intracelular al núcleo de la segunda célula. Para una recopilación, véase la referencia de Artavanis-Tsakonas *et al.* (1999) Science 284:770-776, que divulga aspectos del sistema de señalización de Notch.

Por lo tanto, en la ontogenia normal, la disociación de la proteína de Notch y la liberación de su dominio intracelular desde el interior de la superficie de una célula pueden bloquear la diferenciación neural de esa célula. Sin embargo, la transfección de un plásmido que codifica el dominio intracelular de Notch dentro de las células madre mesenquimales (también conocidas como células estromales adherentes de médula) puede provocar que los descendientes de las células transfectadas se desarrollen en la forma de linajes neurales y miogénicos. La referencia de Dezawa *et al.* (2004) J. Clin. Invest. 113:1701-1710; y la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos de América n.º 2006/0166362 (presentada el 27 de julio del 2006) describen métodos para inducir a las células madre mesenquimales a desarrollarse en la forma de células que tienen potencial neurogénico y miogénico mediante la transfección de las células madre mesenquimales con un ácido nucleico que codifica un dominio intracelular de Notch.

Shindo Kentaro *et al.* en *Experimental Cell Research*, vol. 290, edición 2, 1 de noviembre de 2013, páginas 370-380 describen que la diferenciación osteogénica de las células progenitoras mesenquimales, se suprime Kusa mediante señalización de Notch. Siguen siendo desconocidos muchos detalles de los procesos más arriba mencionados, mediante los cuales se redirige la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales. Por ejemplo, no se ha entendido el mecanismo mediante el cual la transfección de secuencias que codifican el dominio intracelular de Notch desplaza el potencial de desarrollo de las células madre mesenquimales. Además de ello, no se ha determinado el potencial de las células madre mesenquimales para retener la capacidad de diferenciarse en sus descendientes normales (por ejemplo, adipocitos, osteocitos, condrocitos), después de que se han sometido a tratamientos que alteran su repertorio de desarrollo para incluir linajes neurales y miogénicos. Una mayor comprensión de esta cuestión tiene una importante implicación para el uso terapéutico potencial de las células madre mesenquimales y sus derivados en sectores tales como los trastornos neurodegenerativos, los trastornos musculoesqueléticos, la reparación de cartílagos y la cicatrización de heridas.

15 **Sumario**

Se ha determinado ahora, y se divulga aquí, que tratamientos que alteran el potencial de desarrollo de las células estromales adherentes de médula (MASC, también conocidas como células madre mesenquimales) permitiendo que se diferencien en linajes no mesenquimales, también restringen la capacidad de tales células tratadas para diferenciarse en células del linaje mesenquimal. Esto quiere decir que el potencial normal de desarrollo de las células estromales adherentes de médula se ha expandido tanto como reducido.

Correspondientemente, se divulgan en el presente caso métodos y composiciones para redirigir el potencial de desarrollo de las células estromales adherentes de médula. También se proporcionan células estromales adherentes de médula y sus descendientes con potencial de desarrollo redirigido, tal como se ilustra a modo de ejemplo por las siguientes realizaciones.

1. Un método para restringir el potencial de una célula estromal adherente de médula para diferenciarse en un linaje condrogénico, comprendiendo el método:

(a) transfectar una célula estromal adherente de médula con un ácido nucleico que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular de Notch (NICD);

(b) someter a las células a una selección en cuanto al ácido nucleico de la etapa (a);

(c) retirar la selección después de un lapso de tiempo predeterminado; y

(d) expandir las células de la etapa (c).

En ciertas realizaciones, la transfección es transitoria, de manera tal que el ácido nucleico transfectado no persiste en descendientes de la célula transfectada. Esto puede dar como resultado una expresión transitoria del NICD.

En realizaciones adicionales, se produce una expresión estable de un NICD, durante un limitado lapso de tiempo, en las células transfectadas. Esto quiere decir que las células transfectadas se someten a una selección en cuanto al ácido nucleico que codifica el NICD, pero la selección se retira después de un lapso de tiempo predeterminado (por ejemplo, uno o más días, una semana o varias semanas).

2. El método según la reivindicación 1, en el que el NICD es un NICD humano.

3. El método según la reivindicación 1, en el que el NICD comprende aminoácidos 1703-2504 de la proteína de Notch humana.

4. El método según la reivindicación 1, en el que el lapso de tiempo predeterminado es siete días.

55 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1A y 1B muestran los niveles de ADN (figura 1A) y de ARNm (figura 1B) que codifican NICD en células restringidas en cuanto a la diferenciación (DRC) a lo largo de seis pases. La figura 1A muestra las copias por célula de secuencias exógenas transfectadas que codifican NICD, para los pases 0 hasta 6. La figura 1B muestra los niveles de ARNm transcrito a partir de las secuencias exógenas transfectadas que codifican NICD, normalizadas para los niveles de ARNm de GAPDH. Los datos para el pase 0 muestran los niveles de ADN y ARN después de una semana de selección en G418 seguida por cultivo durante dos semanas después de la retirada de G418. "MSC" designa células estromales adherentes de médula no transfectadas. "NTC" designa un control sin molde; es decir, una reacción de amplificación realizada con todos los componentes excepto ADN o ARN celular.

La figura 2 muestra los niveles de Alizarin Red extraído a partir de células que se habían tranfectado con diferentes

vectores que codifican un NICD y controles. Las células se transfectaron con el vector indicado, dejadas crecer durante dos pases en la presencia de 100  $\mu\text{g/ml}$  del G418 (excepto para unas DRC, marcadas como "SB623" en la figura), luego cultivadas en un medio de diferenciación osteogénico (que incluye 500 ng/ml de BMP6) durante seis días. Las células se fijaron, teñidas y el Alizarin Red se extrajo y se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm. Véase el ejemplo 9 para los detalles.

La figura 3 muestra los niveles de ARNm de NICD en unas MASC que se habían transfectado con diferentes vectores, seleccionadas en 100  $\mu\text{g/ml}$  del G418 durante dos pases y luego cultivadas durante tres días adicionales en la presencia del G418. Las MASC de control no se transfectaron y tampoco se sometieron a selección ("MSC"). Las DRC (indicadas como "SB" en la figura) se ensayaron después de una transfección, de una selección durante una semana en G418 y de tres pases. Los niveles de ARN transcrito a partir de las secuencias que codifican un NICD en el vector se normalizaron a niveles endógenos de ARNm de GAPDH en las células. Los resultados se expresan en relación con este valor normalizado en las DRC.

### Descripción detallada

Los términos "células estromales de médula ósea", "células estromales adherentes de médula", "células madre adherentes de médula", "células madre de médula", "células madre mesenquimales" y "MASC" se refieren a células pluripotentes mitóticas, que se han obtenido a partir de médula ósea que, en el curso de un desarrollo normal, son capaces de dar lugar a un cierto número de tipos de células diferenciadas tales como, por ejemplo, osteocitos, y a células que normalmente se encuentran en tejido conjuntivo, que incluyen, pero no se limitan a, condrocitos y adipocitos. Las MASC pueden ser células humanas o células procedentes de otros mamíferos o vertebrados.

Los términos "célula precursora neural", "célula progenitora neural", "NPC" y "célula progenitora neural derivada de médula ósea" se usan de una manera intercambiable para referirse a células mitóticas, que descienden de células estromales adherentes de médula, que tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas, células gliales o sus precursoras. Por lo tanto, son distintas de las células precursoras neurales primarias, tales como las que se pueden obtener a partir de fetos o tejidos de individuos adultos, tales como el hipocampo y la zona subependimario periventricular. Las NPC pueden ser células humanas o células procedentes de otros mamíferos o vertebrados.

Para las finalidades de esta divulgación, los términos "célula restringida en cuanto a la diferenciación" y "DRC" se refieren a una célula que desciende de una célula madre mesenquimal, cuya especificación normal de linaje (a linajes mesenquimales tales como osteocitos, condrocitos y adipocitos) se ha restringido. Esto quiere decir que se reduce la capacidad de dicha célula para introducir un linaje que dé como resultado una diferenciación a la forma de osteocitos, adipocitos y/o condrocitos. Una célula restringida en cuanto a la diferenciación puede adquirir opcionalmente uno o más nuevos potenciales de desarrollo, que incluyen, pero no se limitan a, la capacidad de introducir un linaje neural y diferenciarse en neuronas y/o células gliales, y/o la capacidad de introducir un linaje miogénico. Una célula restringida en cuanto a la diferenciación puede también adquirir la capacidad, o ganar una capacidad aumentada de secretar unos factores solubles y/o insolubles que favorecen la regeneración y/o el crecimiento de tejido neural (por ejemplo, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía, células de Schwann), y/o impedir la muerte de tejido neural.

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones que se destinan, entre otras cosas, a restringir el potencial de diferenciación de células estromales adherentes de médula. Esto quiere decir que se restringe el potencial ontogénico normal de células estromales de médula para introducir linajes mesenquimales y dar lugar a, por ejemplo, condrocitos, osteocitos y adipocitos; y su desarrollo puede redirigirse a otros linajes, por ejemplo, neurales y miogénicos, haciendo que sean útiles para diversos tipos de terapias celulares, por ejemplo, en el tratamiento de una degeneración neural, un ictus, una distrofia muscular, etc.

Unas células estromales adherentes de médula se extraen con facilidad por aspiración de médula ósea sobre la base de un paciente no hospitalizado y, debido a su naturaleza altamente proliferativa, pueden cultivarse en grandes cantidades dentro de un período de tiempo relativamente corto. Por lo demás, una ventaja adicional de su uso como material de partida para diversos tipos de terapia celular reside en que permiten que se lleve a cabo un trasplante autólogo (por ejemplo, se puede formar nuevo tejido muscular y/o neural a partir de células que se derivan de células madre de médula ósea propias del paciente). La consiguiente carencia de rechazo inmunológico exime de la necesidad de administrar agentes inmunosupresores, haciendo posible por lo tanto un tratamiento seguro. Además de ello, puesto que las células madre de médula ósea se pueden obtener a partir de un banco de médula ósea, este método es también ventajoso desde un punto de vista de suministro.

Unas células estromales adherentes de médula se pueden obtener a partir de unos materiales aspirados de médula ósea cultivando durante tres días en un  $\alpha\text{MEM} + 10\%$  de FBS + L-glutamina, y luego separando por aspiración las células no adherentes. Véase el ejemplo 1 a continuación de un método ilustrativo para la extracción y la expansión de unas células estromales adherentes de médula.

En ciertas realizaciones, células restringidas en cuanto a la diferenciación se obtienen por medio de métodos que comprenden transfección de células estromales adherentes de médula con un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un dominio intracelular de Notch (NICD) tal como se describió, por ejemplo, en la publicación

de solicitud de patente de los EE.UU. nº 2006-0166362 (presentada el 27 de julio del 2006), y en la referencia de Dezawa *et al.* (2004) J. Clin. Invest. 113:1701-1710. En ciertas de estas realizaciones, el dominio intracelular de Notch se compone de los aminoácidos 1703-2504 de la proteína Notch-1 humana. Ellison *et al.* (1991) Cell 66:649-661. En realizaciones adicionales, células restringidas en cuanto a la diferenciación se obtienen tal como se describió en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. nº 2006-0251624 (presentada el 9 de noviembre del 2006). Alternativamente, tales células pueden obtenerse tal como se describió en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. nº 2003-0003090 (presentada el 2 de enero del 2003). El ejemplo 2 describe un método ilustrativo para la preparación de unas DRC.

Los métodos y las composiciones que aquí se divulgan implican el uso de procesos reconocidos en los sectores de biología molecular, biología celular y cultivo celular. Tales métodos se conocen por expertos en la materia y se han divulgado, por ejemplo, en las referencias de Sambrook *et al.* "Clonación molecular: Un manual de laboratorio", Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; de Ausubel *et al.*, "Protocolos actuales en biología molecular", John Wiley & Sons, New York, 1987 y actualizaciones periódicas; y de R. I. Freshney "Cultivo de células de animales: Un manual de técnica básica" Quinta Edición, Wiley, New York, 2005.

Ciertos de los ejemplos muestran que los tratamientos de unas MASC (obtenidas a partir de dos donantes diferentes), que dan como resultado su capacidad para diferenciarse en linajes no mesenquimales, también restringen la capacidad de dichas células tratadas para conseguir su potencial de desarrollo normal (es decir, que dichos tratamientos restringen su capacidad de diferenciarse en células mesenquimales tales como osteocitos y adipocitos). Las MASCs obtenidas a partir de seis donantes adicionales se han ensayado de una manera similar y, en todos los 8 casos, las células tratadas mostraron coherentemente una capacidad reducida, en comparación con las MASC, para diferenciarse en adipocitos y osteocitos.

Este restringido potencial de desarrollo de estas "células restringidas en cuanto a la diferenciación (DRC)" estimula el uso de las DRC y sus descendientes en diversos tipos de terapias celulares. Por ejemplo, las DRC pueden inducirse a diferenciarse en células neurales y en precursoras de células neurales en unas apropiadas condiciones de cultivo. Véanse, por ejemplo, la referencia de Dezawa *et al.* (2004) J. Clin. Invest. 113:1701-1710 y publicación de solicitud de patente de los EE.UU. nº 2006-0166362 (presentada el 27 de julio del 2006). El uso de tales células neurales y precursoras de células neurales para el tratamiento de lesiones neurales, por trasplante dentro de regiones en las que pueden exponerse potencialmente a señales osteogénicas y/o adipogénicas (por ejemplo, alrededor de lesiones del sistema nervioso periférico) es preferible con relación al uso de las MASC, puesto que se reduce o elimina la capacidad del anterior tipo de células para diferenciarse en linajes osteocíticos y adipocíticos. De una manera similar, para el uso en unas terapéuticas celulares que se trasplantan al cerebro o al sistema nervioso central, el desplazamiento en el potencial de desarrollo fuera de los linajes mesenquimales aumenta la seguridad y la eficacia de las DRC, en comparación con las MASC y unos tipos relacionados de células. Por lo tanto, las DRC tienen un mejor perfil de seguridad que otros tipos de células que pueden usarse para un trasplante.

Ciertos de los ejemplos muestran que la regulación de la expresión de genes se altera en células restringidas en cuanto a la diferenciación. En particular, se aumentan los niveles de ARNm codificado por los genes Hey1 y de ciclina D1; mientras que se disminuyen los niveles de ARNm codificado por los genes Hes1, HR y Wisp1, en unas DRC en comparación con sus MASC progenitoras. Por lo tanto, las DRC se distinguen, con respecto de sus MASC progenitoras y de otras células, en virtud de esta diferente expresión de genes. Por lo tanto, métodos para regular en sentido creciente de una manera artificial la expresión de Hey 1 y/o de ciclina D1, y/o de regular en sentido decreciente de una manera artificial la expresión de Hes1, HR y/o Wisp1, se pueden usar también para generar células restringidas en cuanto a la diferenciación. Por ejemplo, tal como se conoce en la materia, la expresión de genes puede regularse en sentido creciente por inserción de un ADNc que codifica el producto génico dentro de una célula; y la expresión de genes puede regularse en sentido decreciente insertando dentro de una célula un ARN pequeño de interferencia, un ARN de horquilla corta, un micro ARN y/o un ARN antisentido, de una manera complementaria con el gen que interesa. Por lo demás, se pueden usar factores de transcripción artificiales tanto para la activación como para la represión de la expresión de genes en una célula. Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. 6.534.261 y 6.933.113; que describen la síntesis y los usos de factores de transcripción artificiales.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de células estromales adherentes de médula (MASC)

Unos materiales aspirados de médula ósea, obtenidos a partir de donantes humanos, se dividieron en partes alícuotas de 12,5 ml dentro de unos tubos de 50 ml, y se añadieron a cada tubo 12,5 ml de un medio de crecimiento (10 % de FBS en un  $\alpha$ MEM, suplementado con penicilina/estreptomina y 2 mM de L-glutamina). Los contenidos de los tubos se mezclaron por inversión y los tubos se centrifugaron a 200 g durante 8 minutos. La fase transparente superior se desechó, el volumen de la fase inferior se ajustó a 25 ml con un medio de crecimiento fresco, y los tubos se mezclaron y centrifugaron de nuevo. La capa superior se retiró de nuevo. El volumen de la fase inferior en cada tubo se ajustó de nuevo a 25 ml y los contenidos de todos los tubos se agruparon en un tubo de 250 ml. Después de una determinación de la concentración de células por exclusión de Trypan Blue y determinación del cómputo de células nucleadas, las células se sembraron en placas dentro de unos marcos T225, a razón de 40 ml por matraz del medio

de crecimiento con una densidad de  $100 \times 10^6$  de células nucleadas totales por matraz. Los matraces se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 días en una incubadora con  $\text{CO}_2$ , durante cuyo período de tiempo las MASC se fijaron al matraz.

Después de 3 días, las células no fijadas se retiraron haciendo oscilar los matraces y retirando el medio de cultivo. Cada matraz se lavó tres veces con 40 ml de un  $\alpha\text{MEM}$  suplementado con penicilina/estreptomicina; luego se añadieron a cada matraz 40 ml del medio de crecimiento previamente calentado (a  $37^\circ\text{C}$ ) y las células se cultivaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$ . Durante este período de tiempo, el medio se reemplazó por 40 ml de un medio de crecimiento fresco cada 3-4 días, y las células se vigilaron en cuanto al crecimiento de colonias y la densidad de células.

Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia de 25-30 % (usualmente 10.000 – 20.000 células por colonia y en el lapso de 10-14 días), las MASC (en el pase M0) se cosecharon para un pase posterior. Las MASC se cosecharon a partir de hasta 10 matraces T-225 de una sola vez. El medio se retiró desde los matraces y las células adherentes se enjuagaron 2 veces con 20 ml de DPBS sin Ca/Mg (DPBS -/-, de HyClone). Se añadieron diez ml del medio 0,25 % de tripsina/EDTA (de Invitrogen, Carlsbad, CA) a cada matraz y los matraces se incubaron durante aproximadamente 5 min. a la temperatura ambiente. Cuando las células se habían desprendido y las colonias se habían dispersado a la forma de células individuales, la tripsina se desactivó por una adición de 10 ml del medio de crecimiento seguida por un mezclado suave. Las suspensiones de células se retiraron desde los matraces, y se agruparon en unos tubos de 250 ml. Los tubos se sometieron a una centrifugación a 200 g durante 8 minutos. Los materiales sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y los sedimentos celulares húmedos se volvieron a suspender en el medio de crecimiento hasta obtener una concentración estimada de células de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml. Se determinó el cómputo de células viables y las células se sembraron en placas dentro de unos matraces T225 con una concentración de  $2 \times 10^6$  células por matraz en el medio de crecimiento (en el pase M1). Las células se dejaron crecer durante 3-5 días, o hasta ser confluentes en 85-90 %, cambiando de medio cada 2 a 3 días. Con una confluencia de 85-90 %, las células de el pase M1 se cosecharon por tripsinización y se volvieron a sembrar en placas a razón de  $2 \times 10^6$  células por matraz T225 tal como se ha descrito más arriba, para generar cultivos de el pase M2. Los cultivos de M2 se alimentaron con medio fresco cada tres días, si fuese necesario. Cuando los cultivos de el pase M2 alcanzaron una confluencia de 85-90 % (usualmente en el lapso de 3-5 días), o bien se cosecharon para una transfección con el fin de generar unas DRC (ejemplo 2 siguiente), o se congelaron para un futuro uso (ejemplo 3 siguiente).

Ejemplo 2: Preparación de células restringidas en cuanto a la diferenciación (DRC)

Las DRC se prepararon o bien directamente a partir de las MASC cosechadas a partir de cultivos de el pase M2, o a partir de las MASC de el pase M2 que se habían congelado tal como se describirá en el ejemplo 3, y descongelado y revivido tal como se describirá en el ejemplo 4.

#### A. Preparación de mezcla de transfección

Unas células restringidas en cuanto a la diferenciación se prepararon por transfección de MASC de el pase M2 con un plásmido que codifica el dominio intracelular de Notch. El plásmido (pN2) comprendía una cadena principal de pCI-neo (de Promega, Madison, WI) en la que secuencias que codifican los aminoácidos 1703-2504 de la proteína Notch-1 humana, que codifica el dominio intracelular, se introdujeron dentro del sitio de clonación múltiple. En este vector, secuencias que codifican el NICD están bajo el control por transcripción del promotor del CMV, que es un promotor constitutivo fuerte. El pN2 también contiene un gen de neomicina fosfotransferasa (que codifica resistencia al G418) bajo el control por transcripción del promotor temprano e intensificador del SV40.

Para cada matraz con MASC, se usaron 5 ml de la mezcla de transfección, que contenía 40  $\mu\text{g}$  de un plásmido y 0,2 ml de una solución de Fugene 6<sup>®</sup>. Para preparar la mezcla de transfección, la cantidad apropiada de la solución de Fugene<sup>®</sup> (dependiendo del número de matraces con células que van a transfectarse) se añadió a un  $\alpha\text{MEM}$  en un tubo estéril de 250 ml, usando una pipeta de vidrio. La solución se mezcló suavemente e incubó durante 5 min. a la temperatura ambiente. La cantidad apropiada de ADN plasmídico se añadió luego gota a gota a la mezcla de Fugene<sup>®</sup>/ $\alpha\text{MEM}$ , se mezcló suavemente, y se incubó durante 30 min. a la temperatura ambiente.

Antes de la adición del ADN de pCI-Notch a la mezcla de Fugene<sup>®</sup>/MEM, se retiraron 5 ml y se colocaron dentro de un tubo de 15 ml al que se habían añadido 40  $\mu\text{g}$  del plásmido pEGFP. Esta solución se usó para transfectar un matraz con células, como un control de la eficiencia de transfección. Para ciertos experimentos, se prepararon también unas "DRC ficticias", transfectando unas MASC de M2 con un derivado del vector pCI-Notch, a partir del que se habían retirado las secuencias que codifican Notch. Todos los otros procesos fueron idénticos.

#### B. Transfección

Para realizar la transfección, unas MASC de el pase M2 se cosecharon por tripsinización (tal como se describió en el ejemplo 1) y se sembraron en placas con una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células en 40 ml de un medio de crecimiento por matraz T225. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 50-70 % (usualmente en el lapso de 18-24 horas) se prepararon para la transfección, reemplazando su medio de crecimiento por 35 ml por matraz del medio de transfección

( $\alpha$ MEM +10 % de FBS sin penicilina/estreptomicina).

Tres horas después de la introducción de un medio de transfección, se añadieron 5 ml de la mezcla de transfección (sección A anterior) a cada matraz T-225, pipeteándolos directamente dentro del medio, sin entrar en contacto con la superficie de crecimiento, seguido por un mezclado suave. Un matraz T-225 de control se transfectó con 40  $\mu$ g del plásmido pEGFP, para determinar la eficiencia de transfección.

Después de incubar los cultivos a 37°C en un medio de transfección durante 24 horas, el medio de transfección se reemplazó por el medio  $\alpha$ MEM +10 % de FBS + penicilina/estreptomicina.

#### C. Selección de células transfectadas

La selección de células que habían incorporado ADN plasmídico se comenzó a las 48 horas después de la transfección reemplazando el medio con 40 ml por matraz de un medio de selección (un medio de crecimiento que contenía 100  $\mu$ g/ml de G-418). Se proporcionó un medio de selección fresco a los 3 días, y de nuevo a los 5 días después de que comenzase la selección. Después de 7 días, se retiró el medio de selección y las células se alimentaron con 40 ml de un medio de crecimiento. Los cultivos se dejaron luego crecer durante aproximadamente 3 semanas (intervalo de 18 a 21 días), alimentándose de nuevo con un medio de crecimiento fresco cada 2-3 días.

Aproximadamente a las 3 semanas después de que se comenzó la selección, cuando las células supervivientes comenzaron a formar colonias, las células se cosecharon. El medio se retiró desde los matraces usando una pipeta aspiradora y se añadieron a cada matraz 20 ml de DPBS sin  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ , a la temperatura ambiente. La superficie de cultivo se enjuagó suavemente, la solución de lavado se retiró por aspiración y se repitió la etapa de enjuague. Luego se añadieron a cada matraz 10 ml de la mezcla de 0,25 % de tripsina/EDTA previamente calentada (a 37°C), se enjuagó sobre la superficie de crecimiento, y los matraces se incubaron durante 5-10 min. a la temperatura ambiente. Los cultivos se vigilaron con un microscopio para asegurarse del desprendimiento completo de las células. Cuando el desprendimiento se completó, la tripsina se desactivó por una adición de 10 ml del medio de crecimiento por matraz. La mezcla se enjuagó sobre la superficie de cultivo, se mezcló pipeteando 4-5 veces con una pipeta de 10 ml, y la suspensión se transfirió dentro de un tubo cónico de centrifuga de 50 ml estéril. Las células cosechadas a partir de varios matraces podrían agruparse en un único tubo. Si estuviese presente cualquier grumo, se dejaron sedimentar y la suspensión se retiró a un tubo fresco.

Las suspensiones de células se centrifugaron a 800 rpm (200 g) durante 8 min a la temperatura ambiente. Los materiales sobrenadantes se retiraron por aspiración. Los sedimentos de células se descohesionaron golpeando ligeramente el tubo, se añadieron a cada tubo aproximadamente 10 ml de DPBS sin  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  y las células se volvieron a suspender pipeteando suavemente 4-5 veces con una pipeta de 10 ml, para obtener una suspensión uniforme.

#### D. Expansión de células transfectadas

El número de células se determinó para la suspensión de células transformadas seleccionadas, y las células se sembraron en placas dentro de unos matraces T-225 a razón de  $2 \times 10^6$  células por matraz (proporcionando una siembra de aproximadamente 30 % de células viables). Este cultivo se designa como M2P1 (pase n.º 1). Unos cultivos M2P1 se alimentaron con un medio fresco cada 2-3 días, y cuando las células alcanzaron una confluencia de 90-95 % (usualmente a los 4-7 días después de el pase), se cosecharon y se volvieron a sembrar en placas a razón de  $2 \times 10^6$  células por matraz para generar el pase M2P2. Cuando los cultivos de M2P2 alcanzaron una confluencia de 90-95 %, se cosecharon para una conservación criogénica (ejemplo 3) o para un ensayo posterior.

#### Ejemplo 3: Conservación criogénica

Las MASC y DRC se congelaron para su almacenamiento de acuerdo con el siguiente proceso. Las MASC se congelaron típicamente después de el pase M2, y las DRC se congelaron típicamente después de el pase M2P2. Tratando 4-5 matraces de una sola vez, el medio se aspiró desde los matraces de cultivo, se añadieron a cada matraz 10 ml de una mezcla de 0,25 % de tripsina y EDTA (a la temperatura ambiente), se enjuagó suavemente sobre la superficie de cultivo durante un lapso de tiempo no más largo que 30 segundos, y se retiraron por aspiración. Luego se añadieron a cada matraz 10 ml de una mezcla de 0,25 % de tripsina y EDTA calentada (a 37°C), se enjuagó sobre la superficie de crecimiento, y los matraces se incubaron durante 5-10 min a la temperatura ambiente. Los cultivos se vigilaron por medio de un examen con microscopio para asegurarse del desprendimiento completo de las células.

Cuando el desprendimiento se completó, se añadieron a cada matraz 10 ml del medio de crecimiento  $\alpha$ MEM, se enjuagó sobre la superficie de cultivo, y las células desprendidas se mezclaron pipeteando 4-5 veces con una pipeta de 10 ml. La suspensión de células se transfirió a un tubo cónico de centrifuga de 250 ml estéril, y se retiró cualquier grumo grande de células. Las células cosechadas a partir de 15-20 matraces se agruparon dentro de un tubo de 250 ml.

El tubo se sometió a centrifugación a 800 rpm (200 g) durante 8 min a la temperatura ambiente. El material sobrenadante se retiró por aspiración. El sedimento se descohesionó golpeando ligeramente el tubo, y se añadieron a cada tubo aproximadamente 25 ml de DPBS (-/-). Las células se volvieron a suspender pipeteando suavemente 4-5 veces con una pipeta de 10 ml para obtener una suspensión uniforme. Cualquier grumo presente en la suspensión se retiró pipeteando cada muestra a través de un tamiz estéril de 70  $\mu$ m colocado en el cuello de un tubo de 50 ml.

Las suspensiones de células se agruparon en un tubo de centrifuga de 250 ml y se retiró cualquier grumo remanente. El volumen final se ajustó a 200 ml con DPBS (-/-) y la muestra se sometió a centrifugación a 800 rpm (200 g) durante 8 min a la temperatura ambiente. El material sobrenadante se retiró por aspiración. El sedimento de células se descohesionó golpeando ligeramente, se añadieron al tubo 20 ml de DPBS (-/-) y las células se volvieron a suspender mezclando bien y pipeteando suavemente con una pipeta de 10 ml. El volumen final se ajustó con DPBS (-/-) para dar una concentración estimada de aproximadamente 0,5 - 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, de modo usual aproximadamente 4-5 ml por matraz T225 cosechado, o aproximadamente 200 ml para una cosecha de 40 matraces.

Un cómputo de células viables se realizó en la suspensión, que luego se sometió a centrifugación a 800 rpm (200 g) durante 8 minutos. El material sobrenadante se aspiró, y el sedimento de células se volvió a suspender en una solución Cryo Stor fría (de BioLife Solutions, Bothell, WA) en una concentración de 12 x 10<sup>6</sup> células/ml. Unas partes alícuotas de un ml se dispensaron dentro de unos viales, que se cerraron herméticamente y se colocaron a 4°C en un Cryo Cooler. Los viales se transfirieron a un estante de un aparato congelador CryoMed (de Thermo Forma) y se congelaron.

#### Ejemplo 4: Descongelación y recuperación

Unas células (MASC o DRC) congeladas se almacenaron en nitrógeno líquido. Cuando se las necesitó para los experimentos, se descongelaron rápidamente y se cultivaron de la siguiente manera. Un tubo con células congeladas se colocó en un baño a 37°C hasta descongelarlas. La suspensión de células descongeladas (1 ml) se colocó inmediatamente en 10 ml de un medio de crecimiento y se volvió a suspender suavemente. La suspensión se centrifugó a 200 g, el material sobrenadante se retiró, y las células se volvieron a suspender en el medio de crecimiento en una concentración estimada de 10<sup>6</sup> células/ml. Las células vivas contaron por exclusión de Trypan Blue y las células se sembraron en placas con una densidad de 2 x 10<sup>6</sup> células por matraz T225. Las células se cultivaron a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> durante 3-4 días hasta que se reanudase el crecimiento de las células. Se usaron luego en los ensayos de diferenciación osteogénica y adipogénica descritos en los ejemplos 5 y 6.

#### Ejemplo 5: Restricción del potencial de diferenciación osteogénica de células estromales adherentes de médula

Para el ensayo del potencial de diferenciación osteogénica, se sembraron células (MASC, DRC o DRC ficticias) en placas a razón de 10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos en un  $\alpha$ MEM (de Mediatech, Herndon, VA) suplementado con 10 % de suero de bovino fetal (FBS, de HyClone, Logan UT) y se cultivaron durante una noche.

Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por un DMEM (de Mediatech, Herndon, VA) que tenía un alto contenido de glucosa, piruvato, glutamina y 10 % de FBS suplementado con 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico (L-ácido ascórbico 2-fosfato, de Wako Chemical, Ltd., Japón, añadido recientemente antes del uso), 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 100 nM de dexametasona (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Este "medio de diferenciación osteogénica" se cambió cada 3-4 días.

Los ensayos de diferenciación osteogénica se realizaron en la ausencia o presencia de la proteína morfogenética ósea 6 humana recombinante (BMP-6; de R&D Systems, Minneapolis, MN), en una concentración de 500 ng/ml.

En el día 14 o 17 después de la transferencia de las células al medio de diferenciación osteogénica, los cultivos se ensayaron en cuanto a la presencia de osteocitos por tinción con Alizarin Red. Las células se fijaron añadiendo metanol al 100 % a los pocillos e incubando sobre hielo durante 3 min. Los pocillos se enjuagaron luego con agua, y se añadieron 40 mM de Alizarin Red S (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), de pH 4,2. Después de 2 min a la temperatura ambiente, los pocillos se enjuagaron con agua, la placa se colocó sobre la platina de un microscopio Zeiss Axiovert 40C y las células que estaban en los pocillos se fotografiaron con un Canon PC1049.

Los resultados de estos experimentos indicaron que, tanto en la presencia como en la ausencia de BMP-6, las MASC mostraron una extensión mucho mayor de diferenciación osteogénica que las DRC. Además de esto, se determinó que la inhibición de diferenciación osteogénica en las DRC se debe a la presencia del dominio intracelular de Notch (NICD) en estas células, por cuanto que las MASC que se transfectaron con un vector que carecía de secuencias que codifican un NICD (DRC ficticias) revelaron un grado de tinción con Alizarin Red similar al de las MASC. En todos los casos, la BMP-6 aumentó el grado de diferenciación osteogénica observado.

#### Ejemplo 6: Restricción del potencial de diferenciación adipogénica de células estromales adherentes de médula

Para el ensayo del potencial de diferenciación adipogénica, células se sembraron en placas a razón de 10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos en un  $\alpha$ MEM (de Mediatech, Herndon, VA) suplementado con 10 % de suero



de bovino fetal (FBS, de HyClone, Logan UT) y se cultivaron durante una noche.

Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por un DMEM (de Mediatech, Herndon, VA) que tenía un alto contenido de glucosa, piruvato, glutamina y 10 % de FBS suplementado con 1  $\mu$ M de dexametasona, 0,5  $\mu$ M de 1-metil-3 isobutilxantina, 100  $\mu$ M de indometacina y 10  $\mu$ g/ml de insulina (todos los suplementos son procedentes de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Este "medio de diferenciación adipogénica" se cambió cada 3-4 días.

Los ensayos de diferenciación adipogénica se realizaron en la ausencia o presencia de proteína morfogenética ósea 6 humana recombinante (BMP-6; de R&D Systems, Minneapolis, MN), en una concentración de 100 ng/ml.

En el día 17-21 después de la transferencia de las células a un medio de diferenciación adipogénica, las células se ensayaron en cuanto a la diferenciación adipocítica por tinción con Oil Red O. Las células se fijaron añadiendo formalina al 10 % a los pocillos e incubando durante 30-60 min a la temperatura ambiente. Luego los pocillos se lavaron con isopropanol al 60 % y se dejaron secar por completo. La solución de trabajo de Oil Red O se preparó recientemente a partir de una solución original de Oil Red (3,5 mg/ml en isopropanol) diluyéndola a 3:2 en agua y filtrándola. La tinción se realizó durante 10 min; y luego los pocillos se lavaron extensamente con agua. Después de una breve contratinción con una solución de hematoxilina Accustain Harris (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), la placa se colocó sobre la platina de un microscopio Zeiss Axiovert 40C y las células que estaban en los pocillos se fotografiaron con un Canon PC1049.

Los resultados de estos experimentos indicaron que las MASC eran capaces de diferenciarse en adipocitos, tal como se evidencia por células con vacuolas rellenas con grasa teñidas por Oil Red O, y que la diferenciación adipocítica de las MASC se aumentó por la BMP-6. En contraste con ello, pocos adipocitos se formaron por las DRC, si es que se formó alguno, o bien en la presencia o en la ausencia de BMP-6; y los que se formaron contenían vacuolas mucho más pequeñas. Experimentos de control mostraron que la inhibición de la diferenciación adipogénica en las DRC se debe a la presencia del dominio intracelular de Notch (NICD) en estas células, por cuanto que las MASC se transfectaron con un vector que carecía de secuencias que codifican un NICD (DRC ficticias) revelaron un grado de tinción con Oil Red O similar al de las MASC.

Ejemplo 7: El potencial osteogénico de unas MASC se aumenta por activación con Jagged, que es un ligando de Notch

La proteína Jagged1 humana es un ligando de la proteína Notch1 humana. Por lo tanto, una célula que expresa Jagged sobre su superficie, cuando se ponga en contacto con una célula que expresa la Notch, inducirá la disociación de la Notch transmembranal y la generación de NICD citoplasmático en la célula que expresa la Notch. El efecto de una activación prolongada por la Notch en unas MASC, por la proteína Jagged, se investigó en el sistema de diferenciación osteogénica descrito en el ejemplo 5.

Unas MASC (preparadas esencialmente tal como se describió en el ejemplo 1) se sembraron en placas a razón de  $10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos en un  $\alpha$ MEM (de Mediatech, Herndon, VA) suplementado con 10 % de suero de bovino fetal (FBS, HyClone, Logan UT) y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, las células se transfirieron a un medio de diferenciación osteogénica (con la composición descrita en el ejemplo 5).

Durante el proceso de diferenciación, ciertas tandas de células se sometieron a activación con Notch mediante el ligando de Notch Jagged. Una fusión entre el dominio extracelular de la proteína Jagged1 de rata y la región  $F_c$  de una IgG humana (Jag1/ $F_c$ ) se obtuvo a partir de R&D Systems (Minneapolis, MN; n° de catálogo 599-JG), y la preparación liofilizada se reconstituyó a una concentración de 1 mg/ml en un PBS que contiene 0,1 % (en peso/volumen) de albúmina de suero bovino.

La proteína quimérica Jag1/ $F_c$  se "agrupó" por una incubación previa con exceso de peso diez veces mayor de  $F_c$  anti-humana de cabra (de Sigma, St. Louis MO). Antes del uso, la solución de anticuerpos (2 mg/ml) se dializó durante una noche, con tres cambios, frente a PBS para retirar el aziduro de sodio. El volumen de la solución de anticuerpos no se cambió por diálisis. Para el agrupamiento, la Jag1/ $F_c$  (1 mg/ml en PBS + 0,1 % de BSA) y la  $F_c$  anti-humana (2 mg/ml en PBS) se mezclaron e incubaron a la temperatura ambiente durante 40 min antes de la adición a los cultivos de células.

La Jag1/ $F_c$  agrupada se añadió a unos cultivos en una concentración final de 5  $\mu$ g/ml de Jag1/ $F_c$  y 50  $\mu$ g/ml de un anticuerpo. Cultivos de control recibieron solamente el anticuerpo. Cultivos adicionales recibieron la Jag1/ $F_c$  y la anti- $F_c$  como anteriormente, junto con 5  $\mu$ M del éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina (DAPT), que es un agente inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa. Se obtuvieron soluciones originales de 2 mM de DAPT en DMSO a partir de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. La  $\gamma$ -secretasa es una proteasa que, al realizarse activación de la proteína de Notch transmembrana por un ligando de Notch, disocia a la proteína de Notch en un sitio que permite la liberación del dominio intracelular de Notch. Ciertos cultivos también incluían la BMP-6 (en una concentración final de 500 ng/ml), tal como se describió en el ejemplo 5.

Después de 10 días en cultivo, las células se fijaron en metanol, se tiñeron con Alizarin Red y se examinaron por un microscopio tal como se describió en el ejemplo 5. Cuando la proteína de Notch endógena se activó en las MASC por el ligando Jagged1 soluble, concomitantemente con estimulación osteogénica, la osteogénesis se aumentó fuertemente. El efecto se observó o bien en la ausencia o en la presencia de la BMP6. Experimentos adicionales mostraron que la estimulación de la osteogénesis por Jagged era dependiente de la dosis.

La estimulación de la osteogénesis por Jagged se invierte completamente por el DAPT en la ausencia de la BMP6 y se reduce fuertemente en su presencia.

Estos experimentos también confirmaron el reducido potencial osteogénico de las DRC en comparación con el de las MASC, y mostraron que el pequeño grado de potencial osteogénico exhibido por las DRC en la presencia de la BMP6 se reduce por el DAPT.

La estimulación de la diferenciación osteogénica de las MASC por la Jagged, y la inversión de esta estimulación por el agente inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa DAPT, sugieren que la liberación del NICD en una MASC favorece su diferenciación a lo largo de un linaje osteogénico.

Ejemplo 8: Niveles de ADN y ARNm que codifican NICD en unas DRC durante un pase

La observación de que parece ser que la liberación de NICD endógeno en unas MASC estimula su diferenciación a lo largo de una ruta osteogénica (ejemplo 7) parecer estar en contradicción con la observación de que la transfección de las MASC con un ácido nucleico que codifica NICD exógeno bloquea una diferenciación osteogénica (ejemplo 5). Para obtener una información adicional, se determinaron los niveles de ADN y de ARN que codifican NICD en unas MASC transfectadas (es decir, unas DRC). Con esta finalidad, después de la preparación de unas DRC esencialmente tal como se describió en el ejemplo 2, se retiraron muestras en cada pase (es decir, después de que un cultivo haya alcanzado una confluencia de 90 % y justamente antes de la tripsinización y de la siembra renovada en placas) para el análisis de ADN y ARN.

Para aislar ADN celular, se recogieron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por tripsinización. Las células se lavaron en DPBS (Hyclone, Logan, UT) y se recogieron por centrifugación. Las células se volvieron a suspender en 0,2 ml de DPBS por  $2 \times 10^6$  células y se lisaron por medio de la adición de proteinasa K (de Qiagen, Valencia, CA). El ADN se purificó a partir de células lisadas usando un mini kit QiAmp DNA (de Qiagen, Valencia, CA).

El ADN celular aislado se ensayó en cuanto a la presencia de secuencias de Notch exógenos por QPCR usando un sistema de PCR en tiempo real Roche LightCycler<sup>®</sup> 480. Las secuencias de los cebadores fueron como sigue:

F6: TTGGTCTTACTGACATCCACTTTG (SEQ ID NO: 1)

R4: GCTAGCCTATAGTGAGTCGTATT (SEQ ID NO: 2)

La secuencia de la sonda fue:

5'CCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAG-3' (SEQ ID NO: 3)

Esta sonda contenía el fluoróforo 6-FAM en el extremo 5' y el extintor BHQ1<sup>®</sup> (de Biosearch Technologies, Novato, CA) en el extremo 3'. Los oligonucleótidos se obtuvieron de Operon Technologies (Huntsville, AL).

100 ng de ADN celular estaban presentes en cada tanda de reacción de amplificación de 20  $\mu$ l. Las concentraciones de los cebadores fueron de 900 nM de cada uno y la concentración de la sonda fue de 200 nM. La reacción de amplificación se realizó en una mezcla LightCycler<sup>®</sup> 480 Master Mix (de Roche, Mannheim, Alemania) con una incubación previa durante 1 min. a 95°C; seguida por 40 ciclos de 5 min. a 95°C. El formato de detección usado fue una sonda de hidrólisis mono color.

Para el análisis de los niveles de ARNm de NICD, ARN celular se aisló usando un mini kit RNeasy<sup>®</sup> de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA), seguido por tratamiento con la DNase (de Ambion, Austin, TX).

El ARN celular aislado se ensayó en cuanto a la presencia de secuencias de Notch exógenos por QRT-PCR usando un sistema de PCR en tiempo real Roche LightCycler<sup>®</sup> 480. Las secuencias de los cebadores fueron como sigue:

F1: CACTGGGCAGGTGTCCAC (SEQ ID NO: 4)

R2: CCATGGTGGCGCTCGAG (SEQ ID NO: 5)

La secuencia de la sonda fue la misma que se usó para el análisis del ADN (SEQ ID NO: 3, más arriba).

100 ng de ARN celular estaban presentes en cada tanda de reacción de amplificación de 20 µl. El cebador F1 estaba presente en una concentración final de 100 nM; el cebador R2 estaba presente en una concentración final de 900 nM, y la sonda estaba presente en una concentración final de 200 nM. Las tandas de reacción también contenían 10 unidades de la transcriptasa inversa M-MuLV (de New England Biolabs, Ipswich, MA) y 6 unidades de ARNsin® (de Promega, Madison, WI). La reacción de transcripción inversa/amplificación se realizó en una mezcla LightCycler® 480 Master Mix (de Roche, Mannheim, Alemania) con una incubación previa durante 30 min. a 48°C; seguida por 45 ciclos de 5 min. a 95°C. El formato de detección usado fue una sonda de hidrólisis mono color.

Los resultados, que se muestran en la figura 1, indican que, por el primer pase (es decir, a continuación de la transfección con secuencias que codifican NICD, una semana de selección y dos semanas de cultivo adicional después de la retirada del agente selectivo), la selección de células supervivientes contenía menos de una copia por célula del ADN que codifica NICD transfectado (basado en unos patrones producidos por una dilución en serie de pN2 en agua), y la cantidad continuó disminuyendo constantemente después de ello (figura 1A). De una manera similar, las secuencias de ARNm que codifica NICD exógeno disminuyen continuamente a lo largo de el pase (figura 1B). Estos resultados son compatibles con la posibilidad de que concentraciones iniciales más altas de NICD exógeno, que luego disminuyen en el transcurso del tiempo, estén implicadas en bloquear el potencial osteogénico de las DRC.

#### Ejemplo 9: Expresión estable de NICD exógeno aumenta el potencial osteogénico de unas MASC

Una posible interpretación de estos resultados es que la presencia continua del NICD conduce a una diferenciación osteogénica de unas MASC; pero para la conversión de unas MASC en unas DRC, se requiere una expresión más transitoria del NICD, en un estadio temprano del proceso de conversión (es decir como resulta de un período de selección de una semana). Para ensayar esta posibilidad, las MASC se transfectaron con vectores que codifican NICD cuya expresión se estabilizó por una selección continua, y su potencial osteogénico se ensayó tal como se describió en el ejemplo 5.

Dos vectores diferentes que codifican NICD se usaron en estos estudios. El vector pN2 es el mismo vector que se usó en los experimentos precedentes. Contiene secuencias que codifican un NICD bajo el control por transcripción del promotor del CMV, y secuencias que codifican la neomicina fosfotransferasa bajo el control por transcripción del promotor temprano e intensificador del SV40. El vector pNFK contiene un promotor del CMV que impulsa la transcripción de una unidad de transcripción multicistónica que incluye secuencias que codifican el NICD Notch 1 humano, una marca inmunitaria Flag, secuencias del péptido 2A y un gen de neomicina fosfotransferasa. A continuación de la transcripción y de la traducción, la secuencia del péptido 2A en la resultante poliproteína se disocia por proteasas celulares para generar cantidades equimolares del NICD y de la neomicina fosfotransferasa.

El vector pN0 se usó como control. Contiene secuencias que codifican la neomicina fosfotransferasa (NPT) bajo el control por transcripción del promotor temprano e intensificador del SV40, y no contiene secuencias que codifican un NICD.

Unas MASC, preparadas esencialmente tal como se describió en el ejemplo 1, se transfectaron por separado con los vectores que se describieron más arriba. Las transfecciones se realizaron esencialmente tal como se describió para las transfecciones con el pN2 en el ejemplo 2. A continuación de la transfección, las células se mantuvieron en una selección continua con 100 µg/ml de G418 durante dos pases; requiriendo cada pase el crecimiento de células hasta una confluencia de 90 % (en comparación con una selección durante una semana para generar las DRC). Este proceso de selección y propagación necesitó aproximadamente dos meses. Las células se transfirieron luego a un medio de diferenciación osteogénica (ejemplo 5) que contenía 100 µg/ml de G418 y se cultivaron durante otros seis días, después de que se fijaron, tiñeron y examinaron tal como se describió en el ejemplo 5.

Los resultados del ensayo de osteogénesis indicaron que, en unas condiciones de selección continua (en que las células crecieron más lentamente), las MASC transfectadas establemente con los vectores pNFK y pN2 que codifican NICD muestran una tinción con Alizarin Red mucho más fuerte que unas MASC transfectadas establemente con un vector que codifica solamente la NPT (pN0), tanto en la presencia como en la ausencia de 500 ng/ml de BMP6. Una comparación de las células que no se habían sometido a una selección continua mostró que unas DRC, que se sometieron a una selección durante solamente una semana después de la transfección con un vector que codifica NICD, tenían un potencial osteogénico más débil (como se pone en evidencia por una tinción con Alizarin Red) que unas MASC no transfectadas.

Para cuantificar la extensión de la diferenciación osteogénica, el Alizarin Red se extrajo a partir de unos duplicados de las muestras analizadas tal como se describió más arriba, y los niveles del Alizarin Red extraído se determinaron por espectrofotometría. Las muestras se extrajeron con una mezcla de HCl 0,5 N y SDS al 5 % y el extracto se transfirió a un micropocillo nuevo para la determinación de la absorbancia a 450 nm. La figura 2 muestra que los niveles de Alizarin Red (y por lo tanto el potencial osteogénico) eran altísimos en células que se habían transfectado establemente con pNFK y pN2, y bajísimos en unas DRC (marcadas como SB623 en la figura) y en células transfectadas con un vector que carece de secuencias de NICD (pN0).

En un experimento separado, se determinaron los niveles de ARNm que codifica NICD transcrito a partir de ADN exógeno en células transfectadas establemente. En el momento en que los diversos cultivos de células transfectadas establemente se transfirieron a un medio de diferenciación, unas muestras separadas de 0,5 ml de unas suspensiones de células se sembraron en unos platos de 10 cm y se cultivaron durante tres días. ARNm que codifican NICD en estas muestras de células se determinaron tal como se describió en el ejemplo 8. Los niveles de ARNm de NICD se normalizaron a unos niveles de ARNm de GAPDH, y el valor normalizado en DRC se ajustó arbitrariamente a 1,0. La figura 3 muestra los resultados, expresados como niveles de ARNm de NICD normalizado a GAPDH en relación con el que se presenta en unas DRC (marcadas como "SB" en la figura). Los niveles más altos de ARNm que codifica NICD se encontraron en unas células transfectadas establemente con pN2- y pNFK. Puesto que estas células también muestran también los niveles más altos de tinción con Alizarin Red (por ejemplo, véase la figura 2), estos resultados son compatibles con la idea de que unos altos niveles de NICD en posteriores momentos después de una transfección estimulaban a la diferenciación osteogénica.

Ejemplo 10: El potencial adipogénico de unas MASC se inhibe por activación con Jagged , que es un ligando de Notch

Este ejemplo muestra que, aunque la generación de NICD intracelular por activación de células con Jagged 1 estimulaba el potencial osteogénico de las MASC, inhibía su potencial adipogénico.

Las MASC se prepararon esencialmente tal como se describió en el ejemplo 1. El cultivo en un medio de diferenciación adipogénica fue tal como se describió en el ejemplo 6. El tratamiento de las células con Anti-Fc y la Jag1/Fc agrupada fue tal como se describió en el ejemplo 7. La fijación, la tinción con Oil Red O y el análisis de la diferenciación adipogénica fueron tal como se describió en el ejemplo 6.

Los resultados de este experimento indicaron que se observó desde poca a ninguna diferenciación adipogénica en la ausencia del DAPT o de la BMP6; aunque la poca adipogénesis que se realizó se bloqueó por la Jag. El DAPT (que inhibe la generación del NICD) aumentaba ligeramente la adipogénesis. La presencia de la BMP6 en el medio de diferenciación aumentaba fuertemente la adipogénesis; y este efecto se invierte por la Jag. La estimulación de la adipogénesis por la BMP6 se aumenta por el DAPT; y la Jag no tiene ningún efecto en este caso. Las DRC exhibían desde poco a ningún potencial adipogénico en cualquiera de estas condiciones. Estos resultados indican que la activación de la Notch por Jagged inhibe la adipogénesis en MASC; mientras que el bloqueo de la generación del NICD con el DAPT estimula la adipogénesis, especialmente en la presencia de la BMP6.

Ejemplo 11: Efecto de la expresión prolongada de NICD sobre la adipogénesis

En experimentos adicionales, se determinó el efecto de la expresión prolongada del NICD sobre la adipogénesis, en cultivos de células transfectadas establemente. Los resultados de estos experimentos mostraron que, después de una selección continua en G418, no se observó ninguna adipogénesis (ensayado por tinción con Oil Red O) en células transfectadas establemente con pNFK o pN2; mientras que las células transfectadas establemente con pN0 exhiben adipogénesis en la presencia de la BMP. Tal como se mostró con anterioridad, las MASC son aptas para someterse a diferenciación adipogénica; mientras que el potencial de diferenciación adipogénica de las DRC está ausente o se ha reducido en gran parte en comparación con las MASC. Estos resultados indican que la expresión tanto transitoria como estable de NICD exógeno da como resultado inhibición de la adipogénesis.

Ejemplo 12: Alteraciones en la expresión de genes en células restringidas en cuanto a la diferenciación

Con el fin de determinar si cambios en la expresión de genes acompañan a las restricciones en el potencial de desarrollo que resulta a partir de transfección de las MASC con secuencias que codifican NICD, la expresión de genes seleccionados en las MASC se comparó con una expresión de los mismos genes en unas DRC, por medición de sus niveles de ARNm.

En el primer experimento, se analizaron dos dianas directas de la acción de NICD, los genes Hes1 y Hey1. En condiciones normales, la activación por la Notch unida a una membrana da como resultado disociación del dominio intracelular (NICD), que se transloca al núcleo y se fija a un agente inhibidor de la transcripción de Hes1 y Hey1. El resultado es que se activa la transcripción de los genes Hes1 y Hey1.

De manera correspondiente, los niveles de los ARNm de Hes1 y Hey1 se midieron en varios conjuntos apareados de DRC y MASC (es decir, se obtuvieron unas MASC a partir de un donante y una parte de estas MASC se convirtió en unas DRC). El ARN total se purificó y usó como un molde para una RT-PCR, usando unos cebadores de la PCR que son específicos para Hes1 y Hey1. Los niveles de ARNm de GAPDH se midieron también en las mismas células, para su uso como un patrón de normalización.

Tal como se muestra en la tabla 1, los niveles de ARNm de Hey 1 se aumentaron en unas DRC en comparación con sus MASC parentales, lo que es compatible con las anteriores observaciones a continuación de la activación por Notch *in vivo*. Sorprendentemente, sin embargo, los niveles de ARNm de Hes 1 disminuyeron en las DRC. Sin desear estar vinculado por ninguna teoría, el autor del invento señala que, durante la conversión de las MASC en las DRC, se realizó una selección en cuanto a la presencia del NICD durante un período de tiempo de una semana. Por lo tanto,

la extensión y/o la duración de la actividad de NICD pueden diferir de las que se presentan durante activación fisiológica por NICD, y esto puede dar como resultado diferentes efectos en sentido de 3' en comparación con los que se presentan a continuación de la activación normal por Notch. Por lo demás, el producto del gen Hes1 autorregula negativamente su expresión; por lo tanto, activación inicial del Hes1 por el NICD en unas DRC puede seguirse por su autorrepresión.

Tabla 1: Niveles relativos de ARNm de genes activados por NICD en unas DRC en comparación con sus MASC parentales \*

Donante	Hes 1	Hey 1
D33	0,09	
D36	0,21	
D38	0,25	
D41	0,55	2,11
D51	0,74	3,52
Promedio	0,37	2,82
Desviaciones típicas	0,27	1,0

\*Se midieron los niveles de Hes 1 y se compararon en cinco diferentes conjuntos de pares de DRC/MASC emparejadas y se da la relación de niveles en DRC/niveles en MASC. En dos de estos pares de donantes, se midieron también los niveles de Hey. Las relaciones promedio y las desviaciones típicas se presentan en las dos filas inferiores.

Ejemplo 13: Análisis de dianas adicionales de Notch, miembros de la ruta de Notch y miembros de la ruta de Wnt

La expresión de un número de genes que están implicados en señalización por Notch, y en rutas de señalización que interactúan con la ruta de Notch (Wnt, Shh), se comparó en DRC y MASC, usando un conjunto comercial (placa RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Notch Signalling Pathway, de SA Biosciences n° PAHS-059F). Los genes que se analizaron se muestran en la tabla 2 (tomada del catálogo online de SA Biosciences). Los miembros de la ruta de Notch incluyen genes que codifican ligandos de Notch, enzimas que modifican a la proteína de Notch y diversas proteínas reguladoras de la transcripción que controlan la expresión de los miembros de la ruta de Notch. Las dianas de la ruta de Notch son genes cuya expresión se regula o bien directamente o indirectamente por activación con Notch. Los miembros de la ruta de Wnt son ligandos o proteínas Wnt que participan en rutas de señalización mediadas por WNT. La ruta de Wnt se investigó a causa del conocido solapamiento entre las rutas de señalización de Notch y Wnt, y a causa de que está implicada en diferenciación osteogénica, que se inhibe en las DRC.

Tabla 2: Genes implicados en, o relacionados con, señalización de Notch

**Ruta de señalización de Notch:**

Fijación de Notch: DLL1 (DELTA1), DTX1, JAG1, JAG2.

Procesamiento de receptores de Notch: ADAM10, PSEN1, PSEN2, PSENEN (PEN2).

**Genes dianas de la ruta de señalización de Notch:**

Genes de apoptosis: CDKN1A, CFLAR (CASH), IL2RA, NFKB1.

Reguladores del ciclo celular: CCND1 (Ciclina D1), CDKN1A (P21), IL2RA.

Proliferación de células: CDKN1A (P21), ERBB2, FOSL1, IL2RA.

Genes que regulan la diferenciación de células: DTX1, PPARG.

Neurogénesis: HES1, HEY1.

Regulación de la transcripción: DTX1, FOS, FOSL1, HES1, HEY1, NFKB1, NFKB2, NR4A2, PPARG, STAT6.

Otros genes diana con funciones no especificadas: CD44, CHUK, IFNG, IL17B, KRT1, LOR, MAP2K7, PDPK1, PTCRA.

**Otros genes implicados en la ruta de señalización de Notch:**

Genes de apoptosis: AXIN1, EP300, HDAC1, NOTCH2, PSEN1, PSEN2.

Reguladores del ciclo celular: AXIN1, CCNE1, CDC16, EP300, FIGF, JAG2, NOTCH2, PCAF.

Proliferación de células: CDC16, FIGF, FZD3, JAG1, JAG2, LRP5, NOTCH2, PCAF, STIL (SIL).

Genes que regulan la diferenciación de células: DLL1, JAG1, JAG2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PAX5, SHH.

Neurogénesis: DLL1, EP300, HEYL, JAG1, NEURL, NOTCH2, PAX5, RFNG, ZIC2 (HPE5).

Regulación de la transcripción: AES, CBL, CTNNB1, EP300, GLI1, HDAC1, HEYL, HOXB4, HR, MYCL1, NCOR2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PAX5, PCAF, POFUT1, RUNX1, SNW1 (SKIIP), SUFU, TEAD1, TLE1.

Otros genes con funciones no especificadas: ADAM17, GBP2, LFNG, LMO2, MFNG, MMP7, NOTCH2NL, NUMB, SEL1L, SH2D1A.

**Otras rutas de señalización que se solapan con la ruta de señalización de Notch:**

Ruta de Sonic Hedgehog (Shh): GLI1, GSK3B, SHH, SMO, SUFU.

Ruta de señalización de receptores de Wnt: AES, AXIN1, CTNNB1, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, GSK3B, LRP5, TLE1, WISP1, WNT11.

Otros genes implicados en la respuesta inmunitaria: CXCL9, FAS (TNFRSF6), G1P2, GBP1, IFNG, IL2RA, IL2RG, IL4, IL4R, IL6ST, IRF1, ISGF3G, OAS1, OSM, STAT5A, STUB1.

- Unas MASC y DRC, preparadas y congeladas tal como se describió en los ejemplos 1-3, se descongelaron (ejemplo 4), se dejaron crecer durante 4-7 días en un medio alfa-MEM/10 % de FBS/pen-strep, luego se volvieron a sembrar en placas dentro de platos de Petri de 10 cm en una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/plato, por duplicado. Después de volver a sembrar, las células se dejaron crecer durante 4 días para permitir que los niveles intracelulares de NICD endógeno, activados por tripsinización, volviesen a los basales. Al final de este período de tiempo, el medio de cultivo se aspiró cuidadosamente, las células se lisaron en 400  $\mu$ l del tampón RLT Buffer (Qiagen, Valencia, CA), y el material lisado se separó por raspadura desde la placa.
- 5
- 10 Como control, unas MASC que se habían expuesto a la proteína Jagged1 soluble agrupada, con el fin de activar a la ruta de señalización de Notch (véase el ejemplo 7), se analizaron también y se compararon con otras MASC.
- El material lisado se homogeneizó usando un QiaShredder (de Qiagen, Valencia, CA). El material homogeneizado se mezcló con etanol, y la mezcla se aplicó a una columna RNeasy (de Qiagen, Valencia, CA) y se trató de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El material eluido se trató con un kit ADN-free™ (de Ambion, Austin, TX), de acuerdo con el protocolo del fabricante, para la eliminación del ADN genómico.
- 15
- La concentración y la pureza de ARN se ensayaron en un espectrofotómetro Nanodrop (de Thermo Scientific, Wilmington, DE). Si una muestra de ARN tenía una relación OD260/OD280 >2 y una relación OD260/OD230 >1,7, las muestras de ARN se usaron para un análisis posterior. Si una muestra de ARN no cumplía con estos criterios, se purificó de nuevo usando una columna RNeasy (como anteriormente) y se volvió a ensayar por espectrofotometría. Cuando se obtuvo la requerida pureza, las muestras de ARN se convirtieron en ADNc usando el kit Superarray RT<sup>2</sup> First Strand (de SA Biosciences, Frederick, MD, n.º de Cat. C-03), usando 0,5  $\mu$ g del molde de ARN. Se realizó síntesis de la primera cadena en paralelo para las muestras de MASC y DRC procedentes del mismo donante.
- 20
- 25 Las muestras del ADNc, sintetizadas tal como se describió más arriba, se diluyeron y añadieron a RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Master Mix (de SA Biosciences) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las muestras se aplicaron luego a la placa de RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Notch Signalling Pathway (de SA Biosciences n.º PAHS-059F), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La placa contiene, en cada pocillo, un par de cebadores que son específicos para un gen particular (véase la tabla 2 para una lista de genes que se ensayaron). Una PCR en tiempo real se realizó en un Light Cycler R (de Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y usando un programa recomendado por SA Biosciences para ensayar sus conjuntos de RT<sup>2</sup>. Según se produce y se autotempla el producto de la amplificación, el tinte verde de SYBR se fija al material de doble cadena. La fluorescencia del verde de SYBR, normalizada para controles, que también estaba presente en el conjunto, se usa como una medida del nivel de ARNm.
- 30
- 35 Los resultados se analizaron usando herramientas de análisis proporcionadas por SA Biosciences, asignando los

resultados de MASC al campo “control” y los resultados de DRC al campo “ensayo” campo, para obtener valores para los cambios relativos en expresión para los genes ensayados. Este análisis se realizó para cada de uno de los tres pares de donantes de MASC y DRC, y los resultados se promediaron.

5 La tabla 3 muestra una lista de genes (entre los 84 ensayados en el conjunto) cuya expresión se alteró en al menos dos veces en unas MASC activadas por la Jag. Las MASC activadas por la Jag se ensayaron para proporcionar unos resultados para células en las que la activación por Notch y la liberación de NICD se realizan a través del mecanismo fisiológico de contacto entre un ligando de Notch y un receptor de Notch en la superficie de las células. Además de  
 10 de sus niveles de ARNm en DRC a sus niveles de ARNm en las MASC (promediados a lo largo de tres pares de MASC y DRC, obteniéndose cada par a partir del mismo donante), se dan en la tabla 4.

Los criterios para los cambios en la expresión de genes, para ambos tipos de análisis, se establecieron de la siguiente manera. Cualquier gen cuyos niveles de ARNm aumentaron en dos veces o más en unas DRC en comparación con unas MASC, o en unas MASC activadas por la Jag en comparación con unas MASC, se calificó como activado; y cualquier gen cuyos niveles de ARNm disminuyeron en dos veces o más en unas DRC o en unas MASC activadas por Jag, en comparación con unas MASC (es decir los niveles fueron de 50 % o menos en unas DRC o unas MASC activadas por la Jag, en comparación con unas MASC) se calificó como reprimido.

20 Usando estos criterios, 18 genes exhibieron expresión aumentada, y tres genes mostraron una expresión reducida, en unas MASC activadas por la Jag, en comparación con unas MASC. De estos 21 genes, solamente cuatro genes (HR, Hes1, Hey1 y Wisp1) exhibieron cambios en su expresión, en más de dos veces en cualquiera de las direcciones, en las DRC (véase la tabla 4). La expresión de Hey1 se activó, y la de HR, Hes1 y Wisp1 se reprimió. Como detalle interesante, mientras que la expresión de HR, Hes1 y Wisp1 se reprimió en las DRC; la expresión de estos genes se reguló en sentido ascendente en unas MASC activadas por la Jag. Por lo demás, la expresión de CCND1 (ciclina D1, un agente regulador del ciclo celular), se activó en las DRC en comparación con las MASC; mientras que su expresión no se alteró en unas MASC activadas por la Jag, de acuerdo con los criterios que se han expuesto más arriba.

30 Estos cambios en la expresión de genes sirven para distinguir a las DRC con respecto de sus células progenitoras (MASC) y pueden influir sobre su potencial de desarrollo alterado.

Tabla 3: Genes cuya expresión se alteró después de activación de la ruta de Notch en unas MASC por activación de las MASC con el ligando Jagged agrupado

Abreviatura	Nombre del Gen	Información adicional
DLL1	<i>Delta-like 1</i>	Homólogo de un ligando de Notch de <i>Drosophila</i>
HR	<i>Hairless</i>	Homólogo de un represor de la transcripción murino
JAG1	<i>Jagged 1</i>	Homólogo de un ligando de Notch de <i>Drosophila</i>
LFNG	LFNG-O-fucosilpéptido 3-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa	Proteína de Notch glicosilado
NEURL	Homólogo <i>Neuralized</i>	Ubiquitinación de proteínas de la familia <i>Delta/serrate/lag - 2</i>
NOTCH3	Homólogo de <i>Notch 3</i>	Receptor de Notch
PCAF	Factor asociado con p300/CBP	Proteína reguladora de la transcripción
CD44	Agrupación de diferenciación 44	Marcador de la superficie de células hematopoyéticas
CDKN1A	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina A1	Regulador del ciclo celular
FOSL1	antígeno 1 <i>FOS-like</i>	Factor de transcripción; regula la proliferación de células
HES1	<i>Hairy</i> y potenciador de <i>split 1</i>	Factor de diferenciación neural
HEY1	<i>Hairy</i> /potenciador de <i>split</i> - relacionado con el motivo 1 de YRPW	Factor de diferenciación neural
MAP2K7	Proteína cinasa 7 activada por mitógenos	Mediador de la transducción de señales
PDPK1	Proteína cinasa 1 dependiente del 3-fosfoinositido	Mediador de la señalización del factor de crecimiento
PPAR $\gamma$	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	Receptor nuclear; factor de transcripción
FZD3	<i>Frizzled</i> homólogo 3	Receptor de <i>Wnt</i>
FZD4	<i>Frizzled</i> homólogo 4, CD344	Receptor de <i>Wnt</i>
FZD6	<i>Frizzled</i> homólogo 6	Receptor de <i>Wnt</i>
WISP1	Proteína 1 de la ruta de señalización inducible por <i>Wnt1</i>	Mediador de señalización de <i>Wnt</i>
WNT 11	Miembro de la familia del sitio de integración 11 MMTV tipo <i>Wingless</i>	Homólogo <i>Wnt</i>
GLI1	Homólogo 1 de un oncogén asociado a glioma	Proteína de dedo de zinc



Tabla 4: Análisis de conjunto de la expresión de genes en DRC en comparación con MASC

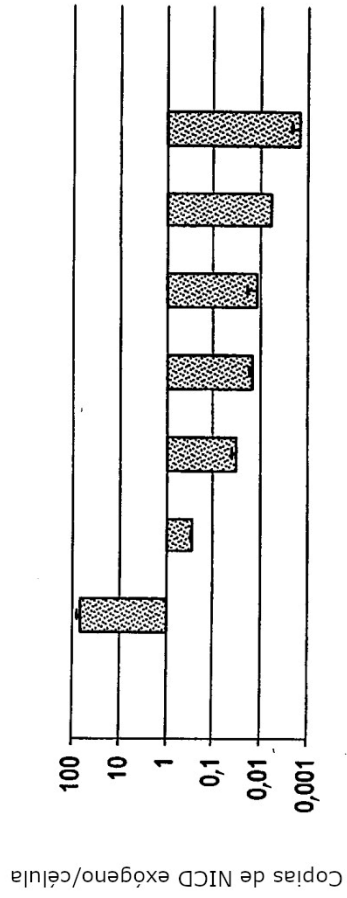
	Gen <sup>‡</sup>	Relación DRC/MASC*	Desv. Típic.
Miembros de la ruta de Notch	DLL1	0,86	0,08
	HR	0,38	0,27
	JAG1	0,86	0,09
	LFNG	0,57	0,19
	NEURL	1,68	1,19
	NOTCH3	0,86	0,14
	PCAF	1,32	0,79
Dianas de la ruta de Notch	CCND1	2,11	0,42
	CD44	0,81	0,74
	CDKN1A	1,04	0,37
	FOSL1	1,07	0,09
	HES1	0,49	0,21
	HEY1	2,85	1,09
	MAP2K7	0,95	0,86
	PDPK1	1,13	0,15
Miembros de la ruta de <i>Wnt</i>	PPAR <sub>γ</sub>	0,82	0,40
	FZD3	1,74	2,44
	FZD4	1,51	0,5
	FZD6	1,10	0,29
	WISP1	0,40	0,11
	WNT11	1,96	2,22

5 ‡ Véase la tabla 2 para la identificación de los genes

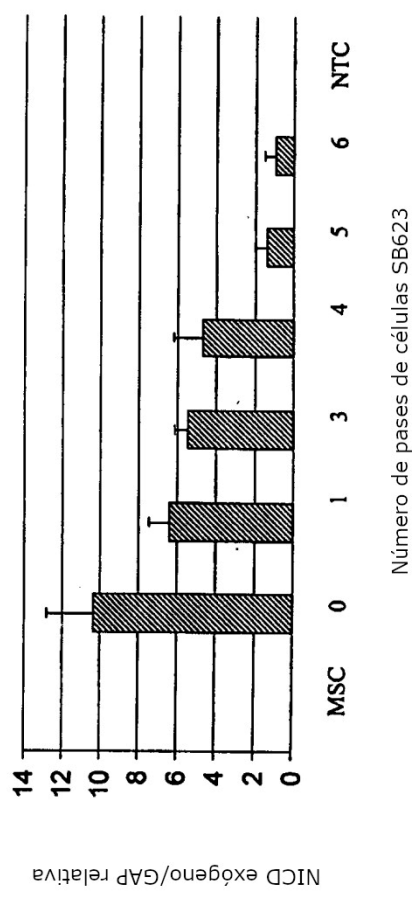
\* Promediado a partir de pares de MASC/DRC apareadas procedentes de tres donantes

**REIVINDICACIONES**

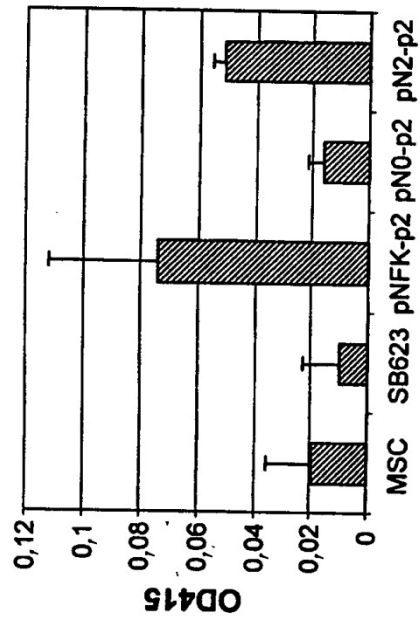
1. Método para restringir el potencial de una célula estromal adherente de médula para diferenciarse en un linaje condrogénico, comprendiendo el método:
- 5
- (a) transfectar una célula estromal adherente de médula con un ácido nucleico que comprende secuencias que codifican un dominio intracelular de Notch (NICD);
- (b) someter a las células a una selección en cuanto al ácido nucleico de la etapa (a);
- 10
- (c) retirar la selección después de un lapso de tiempo predeterminado; y
- (d) expandir las células de la etapa (c)
- 15
2. Método según la reivindicación 1, en el que el NICD es un NICD humano.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el NICD comprende aminoácidos 1703-2504 de la proteína de Notch humana.
- 20
4. Método según la reivindicación 1, en el que el lapso de tiempo predeterminado es siete días.



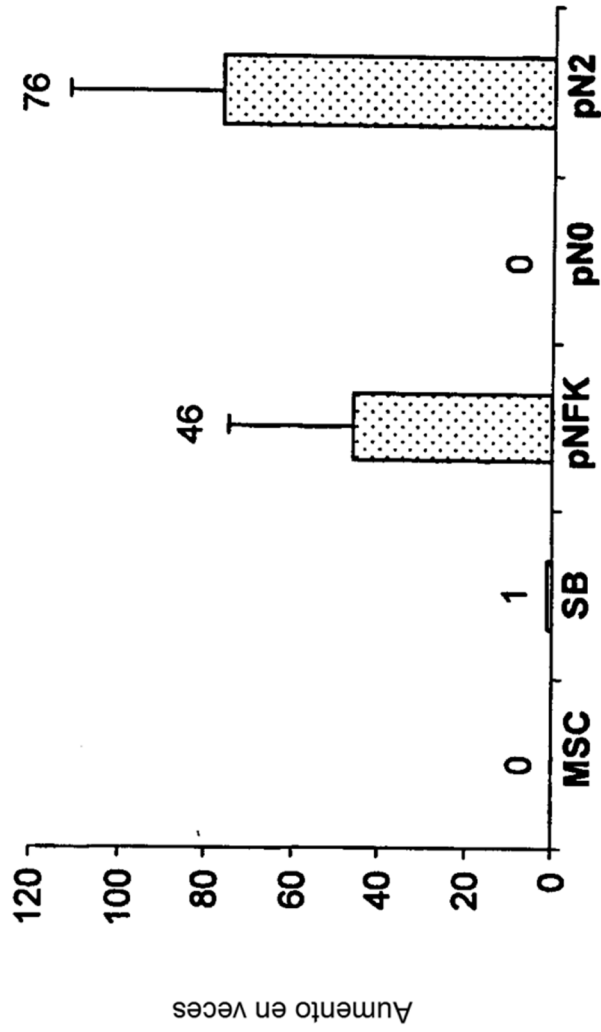
**Fig. 1A**



**Fig. 1B**



**Fig. 2**



**Fig. 3**