



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 320**

51 Int. Cl.:
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01911175 .6**
86 Fecha de presentación : **26.02.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1261694**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.12.2002**

54 Título: **Células madre pluripotentes generadas a partir de células del estroma derivadas de tejido adiposo y sus usos.**

30 Prioridad: **26.02.2000 US 185338 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **Artecel, Inc.**
7600 Wisconsin Avenue
Bethesda, Maryland 20814, US

72 Inventor/es: **Wilkison, William, O. y**
Gimble, Jeffrey

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 300 320 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).

ES 2 300 320 T3

DESCRIPCIÓN

Células madre pluripotentes generadas a partir de células del estroma derivadas de tejido adiposo y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La invención está en el campo de los procedimientos para inducir que células del estroma aisladas derivadas de tejido adiposo se diferencien en células de linaje no mesenquimal. En particular la invención se refiere a procedimientos para inducir que una célula del estroma aislada derivada de tejido adiposo exprese al menos una característica fenotípica de una célula neuronal.

Antecedentes de la invención

Una célula madre debe cumplir los siguientes criterios: (1) capacidad de una población de células madre clonales para autorrenovarse; (2) capacidad de una población de células madre clonales para generar un nuevo tipo de célula terminalmente diferenciada *in vitro*; (3) capacidad de una población de células madre clonales para sustituir una población ausente de células terminalmente diferenciadas cuando se transplantan a un animal con sus propias células naturales drásticamente reducidas.

El periodo neonatal en el desarrollo humano se caracteriza por la presencia de células “madre” con el potencial para desarrollarse a lo largo de múltiples rutas de diferenciación. La diferenciación terminal de estas células está determinada por las señales de citoquinas y hormonales que coordinan la organogénesis y la arquitectura tisular. Se han aislado células madre embrionarias (ES) murinas y se han estudiado exhaustivamente *in vitro* e *in vivo*. Usando estímulos exógenos *in vitro*, los investigadores han inducido la diferenciación de células ES a lo largo de múltiples rutas de linaje. Estas rutas incluyen las rutas neuronal, linfocitoide de linaje B y de adipocitos (Dani y col. (1997) *J. Cell Sci.* 110:1279; Remoncourt y col. (1998) *Mech. Dev.* 79:185; O’Shea, S. (1999) *Anat. Rec.* 257:32, 1999). Las células ES se han manipulado *in vivo* por técnicas de recombinación homóloga para generar ratones que no expresan o nulos para un gen específico (Johnson, R. S. (1989) *Science* 245:1234). Una vez que se han aislado los clones de células ES que carecen de un gen específico, se transplantan a un cigoto murino fertilizado. La progenie de esta célula ES aislada puede desarrollarse en cualquiera y en todos los tejidos murinos de una forma coordinada.

Las células madre multipotenciales existen en tejidos del organismo adulto. El ejemplo mejor caracterizado de una “célula madre” es el progenitor hematopoyético aislado de la médula ósea y la sangre periférica. Los estudios fundamentales de Trentin y colaboradores (Trentin (1965) *Cardiovasc. Res. Cent. Bull* 4:38; Till & McCulloch (1961) *Rad. Res.* 14:213) examinaban ratones irradiados letalmente. En ausencia de tratamiento, estos animales murieron porque no consiguieron reponer sus células sanguíneas de la circulación; sin embargo, el trasplante de células de la médula ósea de animales donantes singénicos rescató al animal huésped. Las células del donante fueron responsables de la repoblación de todas las células sanguíneas de la circulación. Se han sucedido una gran cantidad de estudios elegantes para demostrar que la donación de un número finito de células madre hematopoyéticas sin diferenciación es capaz de regenerar cada uno de los ocho o más linajes de células sanguíneas diferentes en un animal huésped. Este trabajo ha proporcionado la base para el trasplante de médula ósea, una modalidad terapéutica ampliamente aceptada para el cáncer y los errores de metabolismo congénitos. Por lo tanto, las células madre hematopoyéticas siguen estando presentes en la médula ósea humana normal a lo largo de toda la vida; y no están limitadas al periodo neonatal.

Hay una nueva constatación apasionante de que los progenitores hematopoyéticos pueden no estar limitados al microentorno de la médula ósea. Investigadores de la Universidad de Calgary han examinado células madre neuronales, que habitualmente se diferencian en las rutas de linaje de células neuronales. Cuando estas células se transplantaron a huéspedes letalmente irradiados, los investigadores detectaron la presencia de marcadores de células del donante en células mieloides y linfocitoideas recién producidas (Bjornson (1999) *Science* 283:534). Investigadores en el Baylor College of Medicine han llevado a cabo estudios similares usando células satélite aisladas de músculo esquelético murino (Jackson y col. (1999) *PNAS* 96:14482). Cuando estas células derivadas de músculo se transplantaron a huéspedes letalmente irradiados, los investigadores detectaron la presencia de marcadores de genes musculares en todos los linajes de células sanguíneas. Conjuntamente estos estudios indican que el tejido neuronal y muscular contiene células madre capaces de diferenciación hematopoyética. Esto sugiere que otros sitios distintos de la médula ósea pueden proporcionar una fuente renovable de progenitores hematopoyéticos con potencial aplicación en la terapia de enfermedades humanas (Quesenberry y col. (1999) *J. Neurotrauma* 16:661; Scheffler y col. (1999) *Trends Neurosci.* 22: 348; Svendsen & Smith (1999) *Trends Neurosci.* 22:357).

Al igual que las células neuronales y musculares pueden regenerar la médula ósea irradiada, las células derivadas de la médula ósea pueden repoblar otros sitios de órganos. Cuando las células hematopoyéticas y del estroma derivadas de la médula ósea se transplantan a un animal con un hígado dañado, son capaces de regenerar las células ovales hepáticas en el animal huésped (Peterse y col. (1999) *Science* 284:1168). De la misma forma, cuando las células del estroma de la médula ósea marcadas se implantan en el ventrículo lateral de un ratón neonatal, son capaces de diferenciarse en astrocitos maduros (Kopen y col. (1999) *PNAS* 96:10711). Realmente, cuando las células del estroma de la médula ósea se transplantan por vía intraperitoneal a ratones, se detectan por todos los órganos del animal huésped, incluyendo el bazo, pulmón, médula ósea, hueso, cartílago y piel (Pereira y col. (1998) *PNAS* 95:p1142, 1998). Estos estudios sugieren que la célula del estroma de la médula ósea se puede diferenciar en diferentes linajes a partir de su origen mesodérmico original (Kopen y col. (1999) *PNAS* 96:10711).

ES 2 300 320 T3

El reciente desarrollo de organismos enteros a partir de una sola célula de donante está de acuerdo con esta hipótesis. Por ejemplo, el experimento de “Dolly” mostró que células aisladas de una glándula mamaria ovina podían desarrollarse en una oveja madura. En estudios similares con murinos, células derivadas del cuerpo lúteo del ovario podían desarrollarse en un ratón maduro. Estos estudios sugieren que en el organismo adulto siguen existiendo células madre con capacidad para diferenciarse en cualquiera y en todos los tipos de células. Por lo tanto, las células madre “embrionarias” pueden mantenerse a lo largo de toda la vida de un individuo.

El microentorno de la médula ósea del adulto es la fuente potencial para estas hipotéticas células madre. Las células aisladas de la médula ósea de adulto se denominan con una variedad de nombres que incluyen células del estroma, células madre del estroma, células madre mesenquimales (MSC), fibroblastos mesenquimales, células endoteliales reticulares, y células de Westen-Bainton (Gimble y col. (1996) *Bone* 19:421, 1996). Los estudios *in vitro* han determinado que estas células pueden diferenciarse en múltiples linajes mesenquimales o mesodérmicos, que incluyen, pero no se limitan a adipocitos (células grasas) (Gimble y col. (1990) *Eur. J. Immunol.* 20:379), condrocitos (Bruder y col. (1994) *J. Cell Biochem.* 56:283), células de soporte hematopoyéticas (Pietrangeli y col. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18:863), miocitos del músculo esquelético (Prockop (1998) *J. Cell Biochem. Suppl.* 30-31:284-5), miocitos musculares lisos (Charbord) y osteoblastos (Beresford y col. (1992) *J. Cell Sci.* 99:131; Dorheim y col. (1993) *J. Cell Physiol.* 154:317) Además, las células del estroma de la médula ósea presentan la capacidad de diferenciarse en astrocitos (Kopen y col., (1999) *PNAS* 96:10711) y células ovales hepáticas (Petersen y col. (1999) *Science* 284:1168). Basándose en estos descubrimientos, se ha propuesto la médula ósea como una fuente de células madre del estroma para la regeneración ósea, de cartílago, músculo, tejido adiposo, hígado, neuronal y otros tejidos. Sin embargo, la extracción de células del estroma de la médula ósea presenta un alto nivel de riesgo e incomodidad para el paciente.

A diferencia de esto, las células del estroma derivadas de tejido adiposo extramedular humano de adulto representan una fuente de células madre del estroma que se puede recoger de forma rutinaria con riesgo e incomodidad mínimos para el paciente. Las pruebas patológicas sugieren que las células del estroma derivadas de tejido adiposo pueden diferenciarse en múltiples rutas de linajes. Los tumores de tejido blando más comunes, los liposarcomas, se desarrollan a partir de células de tipo adipocitos. Los tumores de tejidos blandos de origen mixto son relativamente comunes. Estos tumores pueden incluir elementos de tejido adiposo, muscular (liso o esquelético), cartílago y/u óseo. En pacientes con una afección rara conocida como heteroplasia ósea progresiva, los adipocitos subcutáneos forman hueso por razones que no se conocen.

Estudios recientes han demostrado la capacidad específica de las células del estroma derivadas de la médula ósea para experimentar diferenciación neuronal *in vitro* (Woodbury y col. (2000) *J. Neuroscience Research* 61:364; Sanchez-Ramos y col. (2000) *Exp. Neurology* 164:247). En estas investigaciones, el tratamiento de las células del estroma de la médula ósea con antioxidantes, factor de crecimiento epidérmico (EGF) o factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), indujo a las células a experimentar cambios morfológicos consecuentes con la diferenciación neuronal, es decir, la extensión de proyecciones celulares largas que terminan en conos de crecimiento y filopodia (Woodbury y col. (2000) *J. Neuroscience Research* 61:364; Sanchez-Ramos y col. (2000) *Exp. Neurology* 164:247). Además, estos agentes indujeron la expresión de proteína específica neuronal incluyendo nestina, enolasa específica de neurona (NSE), neurofilamento M (NF-M), NeuN, y el receptor del factor de crecimiento de nervios trkA (Woodbury y col. (2000) *J. Neuroscience Research* 61:364; Sanchez-Ramos y col. (2000) *Exp. Neurology* 164:247).

La patente de EE.UU. n° 5.486.359 de Osiris se dirige a una población homogénea aislada de células madre mesenquimales humanas que pueden diferenciarse en células de más de un tipo de tejido conjuntivo. La patente describe un procedimiento para aislar, purificar y replicar en gran medida estas células en cultivo, es decir, *in vitro*.

La patente de EE.UU. n° 5.942.225 de Case Western y Osiris describe una composición para inducir la diferenciación dirigida al linaje de células madre mesenquimales humanas aisladas en un solo linaje mesenquimal particular, que incluye las células madre mesenquimales humanas y uno o más factores bioactivos para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales en un solo linaje particular.

La patente de EE.UU. n° 5.736.396 de Case Western describe un procedimiento para inducir la diferenciación dirigida al linaje *ex vivo* de células madre mesenquimales humanas aisladas, que incluye poner en contacto las células madre mesenquimales con un factor bioactivo para inducir de esta forma su diferenciación *ex vivo* en un solo linaje mesenquimal particular. La patente también describe el procedimiento para tratar un individuo que necesite células mesenquimales de un linaje mesenquimal particular, que incluye administrar a un individuo que lo necesita, una composición que comprende células madre mesenquimales humanas aisladas, que se han inducido para diferenciarse *ex vivo* por contacto con un factor bioactivo, para inducir así la diferenciación *ex vivo* de dichas células en un solo linaje mesenquimal particular.

La patente de EE.UU. n° 5.908.784 de Case Western describe una composición para la condrogénesis *in vitro* de células precursoras mesenquimales humanas y la formación *in vitro* de condrocitos humanos a partir de las mismas, cuya composición incluye células madre mesenquimales humanas aisladas estrechamente condensadas como un sedimento celular empaquetado y al menos un agente inductor de condrocitos en contacto con las mismas. La patente también describe un procedimiento para inducir la condrogénesis en células madre mesenquimales poniendo en contacto las células madre mesenquimales con un agente inductor de condrocitos *in vitro*, en el que las células madre se condensan estrechamente como un sedimento de células empaquetadas.

ES 2 300 320 T3

La patente de EE.UU. n° 5.902.741 de Advanced Tissue Sciences, Inc. describe un tejido de cartílago vivo preparado *in vitro*, que incluye células del estroma que producen cartílago y proteínas de tejido conjuntivo segregadas naturalmente por las células del estroma unidas a y sustancialmente que envuelven un marco tridimensional compuesto de un material biocompatible no vivo formado en una estructura tridimensional que tiene espacios intersticiales unidos por las células del estroma. La patente también describe una composición para hacer crecer cartílago nuevo, que comprende células madre mesenquimales en un vehículo polímero adecuado para la proliferación y diferenciación de células en cartílago.

La patente de EE.UU. n° 5.863.531 de Advanced Tissue Sciences, Inc. describe un tejido del estroma vivo tubular preparado *in vitro*, que comprende células del estroma y proteínas de tejido conjuntivo segregadas naturalmente por las células del estroma unidas a y que sustancialmente envuelven un marco tubular tridimensional compuesto de un material biocompatible no vivo, que tiene espacios intersticiales unidos por las células del estroma.

La patente de EE.UU. n° 5.811.094 de Osiris describe un procedimiento para producir tejido conjuntivo que incluye producir tejido conjuntivo en un individuo que lo necesite, administrando a dicho individuo una preparación celular que contiene células madre mesenquimales humanas, que se recuperan de médula ósea humana y que sustancialmente no tiene células sanguíneas.

La patente de EE.UU. n° 6.030.836 describe un procedimiento para mantener las células madre hematopoyéticas humanas *in vitro*, que comprende cocultivar células madre mesenquimales humanas con las células madre hematopoyéticas de modo que al menos algunas de las células madre hematopoyéticas mantengan su fenotipo de célula madre.

La patente de EE.UU. n° 6.103.522 describe una línea celular de estroma humano inmortalizada irradiada en un cultivo *in vitro* combinado con células precursoras hematopoyéticas humanas.

El documento WO 9602662A1 y la patente de EE.UU. n° 5.879.940 describen líneas celulares del estroma de médula ósea humana que sostiene la hematopoyesis.

La patente de EE.UU. n° 5.827.735 de Morphogen describe células madre mesenquimales pluripotentes purificadas que no tienen sustancialmente células comprometidas con el linaje miogénico multinucleadas, y que tienen predominantemente forma estelada, en las que las células madre mesenquimales forman predominantemente células fibroblásticas cuando se ponen en contacto con proteína morfogénica muscular en medio de cultivo tisular que contiene suero de ternero fetal al 10% y forman predominantemente estructuras multinucleadas ramificadas que se contraen espontáneamente cuando se ponen en contacto con proteína morfogénica muscular y factor inhibidor de cicatriz en cultivo tisular con medio que contiene suero de ternero fetal al 10%.

El documento WO 99/94328 describe el uso de células madre mesenquimales para tratar el sistema nervioso central y un procedimiento para dirigir la diferenciación de las células del estroma de la médula ósea.

El documento WO 98/20731 de Osiris describe una composición precursora de megacariocitos mesenquimales y un procedimiento para aislar MSC asociadas con megacariocitos aislados, aislando megacariocitos.

El documento WO 99/61587 de Osiris describe CD45 humano y/o fibroblastos y células madre mesenquimales.

El documento WO 00/53795 de la Universidad de Pittsburgh y *The Regents of the University of California* describen células madre derivadas de tejido adiposo y retícula sustancialmente sin adipocitos ni glóbulos rojos y poblaciones clonales de células madre de tejido conjuntivo. Las células se pueden usar solas o con composiciones biológicamente compatibles, para generar tejidos y estructuras diferenciadas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, las células se pueden expandir y cultivar para producir hormonas y proporcionar medio de cultivo condicionado para soportar el crecimiento y la expansión de otras poblaciones de células. En otro aspecto, el documento WO 00/53795 describe una retícula lipoderivada que carece sustancialmente de células, que incluye material de matriz extracelular del tejido adiposo. La retícula se puede usar como un sustrato para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células, sea *in vivo* o *in vitro*, en anlagen o tejido o estructuras maduras. El documento WO 00/53795 no describe células del estroma derivadas de tejido adiposo que se hayan inducido para expresar al menos una característica fenotípica de una célula neuronal, astrogial, progenitora hematopoyética o hepática en su documento prioritario, ni describe una célula del estroma aislada derivada de tejido de adipocitos que se haya diferenciado de modo que haya una ausencia de marcadores fenotípicos de adipocitos.

El documento WO 99/28444 describe procedimientos y composiciones para diferenciar células del estroma de tejido adiposo en células que tienen propiedades osteoblásticas, y procedimientos para mejorar la estructura ósea de un sujeto.

El documento WO 00/44882 describe un procedimiento y una composición para inducir células del estroma derivadas de tejido adiposo en adipocitos.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos procedimientos para la producción celular de materiales deseados.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diferenciar una célula del estroma aislada derivada de tejido adiposo en una célula que tiene propiedades de una célula neuronal, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula del estroma con un antioxidante, induciendo de esta forma la diferenciación de dicha célula del estroma en una célula neuronal *in vitro*.

Por lo tanto, se induce a la célula del estroma aislada derivada de tejido adiposo a expresar al menos una característica de una célula neuronal. Estas células se pueden usar como producto terapéutico para tratar de forma autóloga o alógena un huésped que lo necesite, o con propósitos de diagnóstico. Las células se pueden administrar, por ejemplo, en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo solución salina tamponada con fosfato, en la zona objetivo. Alternativamente, las células se pueden administrar en una matriz, retículo u otros materiales que tienen estructuras bi o tridimensionales para formar un depósito estructurado, por ejemplo, un implante o un injerto. El marco tridimensional puede ser biodegradable o no biodegradable. Los ejemplos de materiales biodegradables para usar para administrar estas células incluyen alginato, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polilactida-coglicólido, proteínas tales como proteoglicanos, glucoproteínas, hialuroninas, fibronectinas y colágenos. Las células se pueden administrar, si se desea, combinadas con otro agente tal como una citoquina, factor de crecimiento, agente inductor químico, producto biológico, producto quimioterapéutico, hormona, otra célula, proteína, hidrato de carbono, péptido o ácido nucleico.

Las células derivadas de tejido adiposo inducidas se pueden usar de forma terapéutica (por ejemplo, en la reparación, regeneración, reconstrucción o potenciación de tejido, para el diagnóstico), como biorreactores para producir sustancias deseadas y en ingeniería genética y tisular.

La invención proporciona procedimientos para diferenciar células madre del estroma derivadas de tejido adiposo extramedular humano adulto en el linaje de células neuronales no mesenquimales. Las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo extramedular humano adulto se pueden usar como células madre pluripotentes para el tratamiento de una serie de afecciones y enfermedades humanas y animales.

Se proporciona un procedimiento para inducir células del estroma derivadas de tejido adiposo para expresar al menos una característica de una célula derivada de tejido no adiposo, que es una célula neuronal, que comprende: cultivar células del estroma aisladas derivadas de tejido adiposo en un medio de cultivo químicamente definido que comprende un antioxidante. El medio de cultivo puede contener opcionalmente suero y factores de crecimiento adecuados, hormonas, citoquinas, factores del suero, extractos embrionarios, preferiblemente un extracto embrionario no humano; y/o compuestos químicos para inducir la diferenciación de linaje específico.

Los procedimientos de la invención se pueden usar para obtener células para el trasplante autólogo o alógeno para el tratamiento de afecciones humanas, que incluyen pero no se limitan a discrasias sanguíneas, cáncer, enfermedades y traumatismo del sistema nervioso central, enfermedades y traumatismo del sistema nervioso periférico, enfermedades y traumatismo del hígado, entre otros.

Además, las células obtenidas por un procedimiento de la presente invención se pueden modificar genéticamente para expresar un producto génico terapéutico. Las células derivadas de tejido adiposo se pueden modificar genéticamente, p. ej. para expresar genes exógenos o para reprimir la expresión de genes endógenos. De acuerdo con esta realización, la célula se expone a un vector de transferencia de genes que comprende un ácido nucleico que incluye un transgén, de modo que el ácido nucleico se introduce en la célula en condiciones adecuadas para que el transgén sea expresado dentro de la célula. El transgén en general es un casete de expresión que incluye un polinucleótido codificante operativamente unido a un promotor adecuado. El polinucleótido codificante puede codificar una proteína o puede codificar ARN biológicamente activo, tal como ARN antisentido o un ribozima.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento *in vitro* para diferenciar una célula del estroma aislada derivada de tejido en una célula que expresa al menos una característica de una célula neuronal. Las células producidas por los procedimientos de la invención pueden proporcionar una fuente de células funcionales parcial o totalmente diferenciadas, que tienen características de múltiples linajes tisulares para la investigación, trasplante y desarrollo de productos de ingeniería tisular para el tratamiento de enfermedades animales, preferiblemente enfermedades humanas y la reparación y mejora de tejidos.

El tejido adiposo ofrece una alternativa potencial a la médula ósea como una fuente de células madre del estroma multipotenciales. El tejido adiposo es fácilmente accesible y abundante en muchos individuos. La obesidad es una afección de proporciones epidémicas en Estados Unidos, donde alrededor de 50% de los adultos superan el índice de masa corporal (IMC) recomendado basado en su altura y peso. Los adipocitos se pueden recoger por liposucción en condiciones ambulatorias. La liposucción es un procedimiento relativamente no invasivo con efectos cosméticos, que es aceptable para la amplia mayoría de los pacientes. Está bien documentado que los adipocitos son una población celular que se puede reponer. Incluso después de la eliminación quirúrgica por liposucción u otros procedimientos, es común ver la reaparición de los adipocitos en un individuo a lo largo del tiempo en el mismo sitio. Esto sugiere que el tejido adiposo contiene células que son capaces de producir nuevas células adiposas.

ES 2 300 320 T3

El procedimiento se usa para inducir a una célula del estroma derivada de tejido adiposo para que exprese al menos una característica fenotípica de una célula neuronal. Los marcadores fenotípicos de las células deseadas son conocidos para los expertos en la materia, y hay muchas publicaciones en la bibliografía. Se siguen describiendo o se pueden identificar marcadores fenotípicos adicionales sin excesiva experimentación. Se puede usar cualquiera de estos marcadores para confirmar que se ha inducido a la célula adiposa a un estado diferenciado. Las características fenotípicas específicas del linaje pueden incluir proteínas de superficie celular, proteínas citoesqueléticas, morfología celular y productos de secreción. Las características neuronales incluyen la expresión de marcadores neuronales tales como NeuN, NF-M, NSE, nestina y trkA. Los marcadores específicos de la sangre pueden incluir la presencia de CD4, CD8, CD7, CD19, CD45, CD33, CD34, TCR, etc. Un experto en la materia reconocerá que con procedimientos conocidos calorimétricos, de fluorescencia, inmunoquímicos, de reacción en cadena de la polimerasa, químicos o radioquímicos se puede determinar fácilmente la presencia o ausencia de un marcador específico de linaje.

En otra realización, la célula se diferencia en ausencia de suero pero en presencia de un agente químico, por ejemplo, un agente oxidante tal como 2-mercaptoetanol.

Las células diferenciadas que se producen de acuerdo con los procedimientos de la invención son útiles en los trasplantes autólogos y alogenos.

Por ejemplo, el sitio es el tejido del sistema nervioso central y la característica o fenotipo deseado es neuronal. Preferiblemente, el sujeto es mamífero, más preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Las células obtenidas de acuerdo con un procedimiento de la invención se pueden usar en un procedimiento para mejorar la hematopoyesis en un paciente, que comprende el trasplante de las células de la invención al paciente. Preferiblemente, el trasplante es por infusión intravenosa. En una realización, la célula se transfecta transitoria o establemente con al menos una secuencia de ácido nucleico. Puede mediar la transfección un virus u otro vehículo que contiene al menos una secuencia de ácido nucleico deseada que se va a introducir en la célula.

Las células del estroma derivadas de tejido adiposo útiles en los procedimientos de la invención se pueden aislar por una variedad de procedimientos conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, dichos procedimientos se describen en la patente de EE.UU. n° 6.153.432. En un procedimiento preferido, el tejido adiposo se aísla de un sujeto mamífero, preferiblemente un sujeto humano. Una fuente preferida de tejido adiposo es el tejido adiposo omental. En seres humanos, el tejido adiposo normalmente se aísla por liposucción. Si las células obtenidas por un procedimiento de la invención se van a transplantar a un sujeto humano, se prefiere que el tejido adiposo se aisle de ese mismo sujeto para proporcionar así un trasplante autólogo. Alternativamente, el tejido administrado puede ser alogeno.

En un procedimiento de aislamiento de células del estroma derivadas de tejido adiposo, el tejido adiposo se trata con colagenasa en concentraciones entre 0,01 y 0,5%, preferiblemente de 0,04 a 0,2%, lo más preferiblemente aproximadamente 0,1%, tripsina en concentraciones entre 0,01 y 0,5%, preferiblemente 0,04%, lo más preferiblemente aproximadamente 0,2%; y/o dispasa en concentraciones de 0,5 ng/ml a 10 ng/ml; y/o concentraciones eficaces de hialuronidasa o DNasa; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en concentraciones de aproximadamente 0,01 a 2,0 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 mM, lo más preferiblemente 0,53 mM; a temperaturas entre 25 y 50°C, preferiblemente entre 33° y 40°C, lo más preferiblemente a 37°C, durante periodos entre 10 minutos y 3 horas, preferiblemente entre 30 minutos y 1 hora, más preferiblemente 45 minutos. Las células se pasan por un filtro de malla de nailon o estopilla de entre 20 micrómetros y 800 micrómetros, más preferiblemente entre 40 y 400 micrómetros, más preferiblemente 70 micrómetros. Después, las células se someten a centrifugación diferencial directamente en medio o en gradiente de Ficoll o Percoll u otras partículas. Las células se centrifugaron a velocidades entre 100 y 3000 x g, más preferiblemente de 200 a 1500 x g, lo más preferiblemente a 500 x g, durante periodos entre 1 minuto y 1 hora, más preferiblemente de 2 a 15 minutos, lo más preferiblemente 5 minutos, a temperaturas entre 4° y 50°C, preferiblemente entre 20 y 40°C, lo más preferiblemente aproximadamente a 25°C.

La invención comprende el tratamiento de las células del estroma derivadas de tejido adiposo para inducir las para que formen linajes de células neuronales. Aunque la invención no está ligada a ninguna teoría de acción, se cree que el tratamiento de los precursores con un medio que contiene un antioxidante y opcionalmente una combinación de suero, extractos embrionarios, preferiblemente extracto embrionario no humano, factores de crecimientos purificados o recombinantes, citoquinas, hormonas y/o agentes químicos, en un microentorno bi o tridimensional, inducirá la diferenciación.

Los ejemplos no limitantes de medios base útiles en los procedimientos de la invención incluyen medio esencial mínimo de Eagle, ADC-1, LPM (sin albúmina de suero bovino), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, medio BGJ (con o sin modificación de Fitton-Jackson), medio base de Eagle (BME-con adición de base de sal de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, medio de Eagle modificado por Glasgow (GMEM), medio de Leibovitz L-15, medio de McCoy's 5A, medio M199 (M199E-con base de sal de Earle), medio M199 (M199H-con base de sal de Hank), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-E-con base de sal de Earle), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-H-con base de sal de Hank) y medio esencial mínimo de Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre muchos otros, que incluyen medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, Williams' G, Neu-man & Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Un medio preferido para usar en la presente invención es DMEM. Estos y otros medios útiles están disponibles en GIBCO, Grand Island, N.Y., EE.UU. y Biological Industries,

ES 2 300 320 T3

BetHaEmek, Israel, entre otros. Una serie de estos medios se resumen en *Methods in Enzymology*, Volume LVIII, "Cell Culture", pp. 62-72, editado por William B. Jakoby y Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc.

5 Los ejemplos no limitantes adicionales de medios útiles en los procedimientos de la invención, pueden contener suero fetal bovino o de otra especie en una concentración de al menos 1% a aproximadamente 30%, preferiblemente al menos aproximadamente 5% a 15%, lo más preferiblemente aproximadamente 10%. El extracto embrionario de pollo o de otra especie puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1% a 30%, preferiblemente al menos aproximadamente 5% a 15%, más preferiblemente aproximadamente 10%.

10 Por "factores de crecimiento, citoquinas, hormonas" se entienden los siguientes factores específicos que incluyen, pero no se limitan a hormona de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleuquina 3, interleuquina 6, interleuquina 7, factor estimulador de las colonias de macrófagos, factor de ligando/célula madre c-kit, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de nervios, factor neutrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea en concentraciones de niveles de picogramos/ml a miligramos/ml. Con dichas concentraciones, los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas útiles en los procedimientos de la invención pueden inducir hasta 100% de formación de células sanguíneas (linajes linfóide, eritroide, mielóide o de plaquetas) a partir de células del estroma derivadas de tejido adiposo en ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC). (Moore y col. (1973) *J. Natl. Cancer Inst.* 50:603-623; Lee y col. (1989) *J. Immunol.* 142:3875-3883; Medina y col. (2993) *J. Exp. Med.* 178: 1507-1515.

25 Se reconoce además que se pueden añadir componentes adicionales al medio de cultivo. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica para el cultivo de células. Además, se puede añadir componentes para potenciar el proceso de diferenciación.

Por "agentes químicos" se entiende que se incluye, pero no se limita a compuestos antioxidantes tales como hidroxianisol butilado (BHA) o 2-mercaptoetanol, esteroides, retinoides y otros compuestos o agentes químicos que inducen la diferenciación de células del estroma derivadas de tejido adiposo.

30 Por "caracterización" de las células diferenciadas resultantes se entiende la identificación de proteínas de superficie e intracelulares, genes y/u otros marcadores indicativos del compromiso del linaje de células del estroma a un estado diferenciado terminal particular. Estos procedimientos incluirán, pero no se limitan a (a) detección de proteínas de superficie celular por procedimientos inmunofluorescentes usando anticuerpos monoclonales ligados específicos de proteínas, usando un marcador fluorescente secundario, incluyendo el uso de procedimientos de citometría de flujo; 35 (b) detección de proteínas intracelulares por procedimientos inmunofluorescentes usando anticuerpos monoclonales ligados específicos de proteínas, usando un marcador fluorescente secundario, incluyendo el uso de procedimientos de citometría de flujo; (c) detección de genes celulares por la reacción en cadena de la polimerasa, hibridación *in situ* y/o análisis de transferencia northern.

40 Las células parcial o terminalmente diferenciadas se pueden caracterizar por la identificación de proteínas de superficie e intracelulares, genes y/u otros marcadores indicadores del compromiso de linaje de las células del estroma a un estado diferenciado terminal particular. Estos procedimientos incluirán, pero no se limitan a (a) detección de proteínas de superficie celular por procedimientos inmunofluorescentes tales como citometría de flujo o inmunotinción *in situ* de las proteínas de la superficie de células del estroma derivadas de tejido adiposo tales como la fosfatasa alcalina, CD44, CD146, integrina beta 1 u osteopontina (Gronthos y col. (1994) *Blood* 84:4164-4173); (b) detección de proteínas intracelulares por procedimientos inmunofluorescentes tales como la citometría de flujo o inmunotinción *in situ* de células del estroma derivadas de tejido adiposo usando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra receptores activados por el proliferador de peroxisomas, receptores de retinoide X, receptores de vitamina D o Cbfa 1; 45 (c) detección de la expresión de ARNm selectivos de linaje tales como de osteocalcina, PPAR gamma, leptina, Cbfa1, interleuquina 7, ligando de osteoprotegerina y/o factor estimulador de colonias de macrófagos, marcador de leucocitos y factor de crecimiento, por procedimientos tales como la reacción en cadena de la polimerasa, hibridación *in situ* y/o otros análisis de transferencia (Véase Gimble y col. (1989) *Blood* 74: 303-311).

55 Las células se pueden administrar a un huésped en una amplia variedad de formas. Los modos de administración preferidos son la administración parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraes- ternal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, subcutánea, intraor- bital, intracapsular, tópica, parche transdérmico, vía rectal, vaginal, o uretral, incluyendo vía supositorio, percutánea, pulverizador nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter. El agente y el vehículo se pueden administrar, por ejemplo, en una formulación de liberación lenta tal como una inyección tisular 60 directa o bolo, implante, micropartículas, microsferas, nanopartículas o nanosferas.

La presencia de células diferenciadas obtenidas por un procedimiento de la invención se puede detectar en un sujeto por una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a técnicas de citometría de flujo, inmunohistoquímicas, de hibridación *in situ* y/o histológicas o biológicas celulares. Véase, por ejemplo, Kopen y col., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:10711-10716.

Las enfermedades o patologías incluyen enfermedades neurodegenerativas, enfermedades hepatodegenerativas, enfermedades nefrodegenerativas, lesión de la médula espinal, traumatismo craneal o cirugía, infecciones víricas que

dan como resultado la degeneración del tejido, órgano o glándula, y similares. Dichas enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no se limitan a complejo de demencia del SIDA; enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple y mielitis por deficiencia aguda de transferasa; trastornos extrapiramidales y cerebelosos, tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelosos; trastornos del movimiento hiperkinéticos, tales como corea de Huntington y corea senil; trastornos del movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos del movimiento hipocinéticos, tales como enfermedad de Parkinson; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelosas, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelosas, (Mencel, Dejerine Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph), trastornos sistémicos, tales como la enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia; y trastornos multisistémicos mitocondriales; trastornos desmielinizantes centrales, tales como la esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda; y trastornos de la unidad motora, tales como atrofia muscular neurogénica (degeneración de células del cuerno anterior, tales como esclerosis lateral amiotrófica; atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; síndrome de Down en la mediana edad; enfermedad difusa de cuerpos de Lewy; demencia de tipo de cuerpos de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallervorden-Spatz; y demencia pugilística. Véase, p. ej., Berkow y col., (eds.) (1987), *The Merck Manual*, (15th ed.), Merck and Co., Rahway, NJ.

En otra realización, las células derivadas de tejido adiposo obtenidas por un procedimiento de la invención se pueden modificar genéticamente, p. ej., para expresar genes exógenos o para reprimir la expresión de genes endógenos. De acuerdo con esta realización, la célula se expone a un vector de transferencia de genes que comprende un ácido nucleico que incluye un transgén, de modo que el ácido nucleico se introduce en la célula en condiciones adecuadas para que el transgén sea expresado dentro de la célula. El transgén en general es un casete de expresión, que incluye un polinucleótido codificante operativamente unido a un promotor adecuado. El polinucleótido codificante puede codificar una proteína o puede codificar ARN biológicamente activo, tal como ARN antisentido o un ribozima. Por lo tanto, el polinucleótido codificante puede codificar un gen que confiere, por ejemplo, resistencia a una toxina, una hormona (tal como hormonas del crecimiento peptídicas, factor de liberación de hormonas, hormonas sexuales, hormonas adrenocorticotróficas, citoquinas tales como interferones, interleuquinas y linfoquinas), un resto de señalización intracelular unido a la superficie celular tal como moléculas de adhesión celular y receptores de hormonas, y factores que promueven un linaje de diferenciación dado, o cualquier transgén con secuencia conocida.

El casete de expresión que contiene el transgén debe incorporarse en el vector genético adecuado para suministrar el transgén a la célula. Dependiendo de la aplicación final deseada, se puede usar cualquiera de dichos vectores para modificar genéticamente las células (p. ej., plásmidos, ADN desnudo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, lentivirus, papilomavirus, retrovirus, etc.). Se puede usar cualquier procedimiento de construcción del casete de expresión deseado en estos vectores, muchos de los cuales son conocidos en la técnica, tal como por clonación directa, recombinación homóloga, etc. El vector deseado determinará en gran medida el procedimiento usado para introducir el vector en las células, que en general son conocidos en la materia. Las técnicas adecuadas incluyen fusión de protoplastos, precipitación con fosfato cálcico, pistola de genes, electroporación e infección con vectores víricos.

Las células obtenidas por un procedimiento de la invención se pueden usar combinadas con cualquier técnica conocida de ingeniería de tejidos, incluyendo pero sin limitar a las tecnologías descritas en las patentes y publicaciones citadas en los antecedentes de la invención (incluidas las patentes de EE.UU. n° 5.902.741 y 5.863.531 de Advanced Tissue Sciences, Inc.) así como, pero no limitado a: patente de EE.UU. n° 6.139.574, Vacanti y col. (10/31/2000) *Vascularized Tissue Regeneration Matrices Formed By Solid Free Form Fabrication Techniques*; patente de EE.UU. n° 5.759.830, Vacanti y col. (6/2/98) *Three-Dimensional Fibrous Scaffold Containing Attached Cells For Producing Vascularized Tissue In Vivo*, patente de EE.UU. n° 5.741.685, Vacanti, (4/21/98) *Parenchymal Cells Packaged In Immunoprotective Tissue For Implantation*; patente de EE.UU. n° 5.736.372, Vacanti y col. (4/7/98) *Biodegradable Synthetic Polymeric Fibrous Matrix Containing Chondrocyte For In Vivo Production Of A Cartilaginous Structure*; patente de EE.UU. n° 5.804.178, Vacanti y col. (9/8/98) *Implantation Of Cell-Matrix Structure Adjacent Mesentery, Omentum Or Peritoneum Tissue*, patente de EE.UU. n° 5.770.417, Vacanti y col. (6/23/98) *Three-Dimensional Fibrous Scaffold Containing Attached Cells For Producing Vascularized Tissue In Vivo*; patente de EE.UU. n° 5.770.193, Vacanti y col. (6/23/98) *Preparation of Three-Dimensional Fibrous Scaffold For Attaching Cells To Produce Vascularized Tissue In Vivo*; patente de EE.UU. n° 5.709.854, Griffith-Cima y col. (1/20/98) *Tissue Formation By Injecting A Cell-Polymeric Solution That Gels In Vivo*; patente de EE.UU. n° 5.516.532, Atala y col. (5/14/98) *Injectable Non-Immunogenic Cartilage And Bone Preparation*; patente de EE.UU. n° 5.855.610, Vacanti y col. (1/5/99) *Engineering Of Strong, Pliable Tissues*; patente de EE.UU. n° 5.041.138, Vacanti y col. (8/20/91) *Neomorphogenesis Of Cartilage In Vivo From Cell Culture*; patente de EE.UU. n° 6.027.744, Vacanti y col. (2/22/00) *Guided Development and Support Of Hydrogel-Cell Compositions*; patente de EE.UU. n° 6.123.727, Vacanti y col. (9/26/00) *Tissue Engineered Tendons And Ligament*; patente de EE.UU. n° 5.536.656, Kemp y col. (7/16/96) *Preparation Of Tissue Equivalents By Contraction Of A Collagen Gel Layered On A Collagen Gel*; patente de EE.UU. n° 5.144.016, Skjak-Braek y col. (9/1/92) *Alginate Gels*; patente de EE.UU. n° 5.944.754, Vacanti (8/31/99) *Tissue Re-Surfacing With Hydrogel-Cell Compositions*; patente de EE.UU. n° 5.723.331, Tubo y col. 55 (3/3/98) *Methods And Compositions For The Repair Of Articular Cartilage Defects In Mammals*; patente de EE.UU. n° 6.143.501, Sittinger y col. (11/7/00) *Artificial Tissues, Methods For The Production And The Use Thereof*.

Ejemplos

Los ejemplos 1, 2 y 4 no están dentro del alcance de la presente invención y se incluyen solo con propósitos ilustrativos.

Ejemplo 1

Compromiso hematopoyético de células del estroma derivadas de tejido adiposo

A. Se aíslan células del estroma de tejido adiposo humano de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. 09/240.029, presentada el 29 de enero, 1999, y usando las modificaciones del medio de crecimiento descritas antes. Brevemente, se aislaron preadipocitos humanos de tejido adiposo sacado por cirugía de liposucción de acuerdo con procedimientos descritos previamente por Rodbell y Hauner (Rodbell (1967) y (1974); Hauner, véase antes). Los preadipocitos de la fracción del estroma vascular se volvieron a suspender en medio de DMEM (alta concentración de glucosa) que contenía suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 5% y antibióticos y se pusieron en placa con 25.000 células/pocillo en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (150 μ l/pocillo). Después las células se pusieron en un incubador con C al 3,7% y CO₂ al 5% y se dejaron reposar toda la noche. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial. Las células se recogieron por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante.

Se ensaya en las células del estroma derivadas de tejido adiposo humano la diferenciación hematopoyética basándose en un ensayo de repoblación de médula ósea. Ratones SCID inmunodeficientes o beige/sin sistema inmune se irradian letalmente con 11 Gy de irradiación y con una dosis dividida y se mantienen con una dieta de agua acidificada y alimento esterilizado en autoclave. Se aíslan células hematopoyéticas de la médula ósea de los mismos animales en cantidades de aproximadamente 10⁷ células por trasplante. Se introducen células hematopoyéticas de origen murino (10⁷ células derivadas de médula ósea) o células del estroma de origen humano (10⁶ células derivadas de tejido adiposo) en los ratones 16 horas después de la irradiación letal por inyección por la vena de la cola o la vena retroorbital. Alternativamente, se mezclan las células del estroma humano con células hematopoyéticas murinas con una relación de aproximadamente 1:10 antes del trasplante a un animal huésped letalmente irradiado, para determinar un ensayo de repoblación competitivo. Se hace la transfusión a los animales con anestesia de oxiflurano. De 6 a 12 semanas después del trasplante se recoge sangre de los animales receptores y se somete a análisis por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos para los marcadores de células hematopoyéticas humanas, incluyendo pero no limitado a Thy (marcador de células T), B220 (marcador de células B), Mac 1 (marcador de macrófagos) y HLA (marcador humano H-2K). Se determina el porcentaje de células hematopoyéticas periféricas totales de origen humano frente a las de origen murino. En estudios similares, se recoge médula ósea y el bazo de los ratones receptores y se someten a ensayos clonogénicos *in vitro* para los linajes hematopoyéticos específicos. Estos estudios usan ensayos basados en colonias en metilcelulosa. Se analiza el compromiso de linaje específico en las células usando procedimientos inmunofluorescentes comparables.

B. Se aísla tejido adiposo humano de un paciente humano individual por liposucción y se aíslan células del estroma derivadas del tejido adiposo *in vitro* de acuerdo con los procedimientos descritos antes. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial en medio DMEM (alta concentración de glucosa) que contiene suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 5% y antibióticos, a 37°C. Las células se recogen por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante.

Las células se usan inmediatamente en pacientes con trastornos hematopoyéticos, por ejemplo después de una dosis alta de quimioterapia, o se crioconservan para el uso futuro en el caso de una necesidad médica aguda de ese paciente o un receptor histocompatible. Las células del estroma se infunden en el receptor como trasplante autólogo o alógeno, después de algún suceso tal como quimioterapia o irradiación que comprometa gravemente la función de la médula ósea y la competencia inmunitaria. Las células madre del estroma se marcan con un marcador fluorescente para permitir que el médico siga su destino después del trasplante. La prueba de la recuperación acelerada de la médula ósea se sigue basándose en la detección de células hematopoyéticas recién sintetizadas (células linfoides, células mieloides, células eritroides y plaquetas) en el torrente sanguíneo periférico basado en procedimientos de citometría de flujo.

Ejemplo 2

Compromiso astrogliar de células del estroma derivadas de tejido adiposo humano

A. Se aíslan células del estroma de tejido adiposo humano de acuerdo con los procedimientos descritos antes. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial en un medio compuesto de, pero no limitado a medio DMEM (alta concentración de glucosa) que contiene suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 5% y antibióticos, a 37°C. Las células se recogen por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante.

Las células se transplantan al sistema nervioso central de ratones o ratas inmunodeficientes. Se anestesian ratones beige/sin sistema inmune o SCID o ratas sin sistema inmune en una cámara sellada usando halotano al 3% en oxígeno; la anestesia se mantiene por inyección intramuscular de 6 mg/kg de xilozina y 60 mg/kg de ketamina. Los animales

ES 2 300 320 T3

se transfieren a un aparato esterotáxico en un campo limpio. Se hace una incisión de 2 por 5 mm en el pericráneo 2 mm lateral al bregma. Se hace un agujero de Burr en el hueso 3 mm lateral al bregma con un taladro dental. Se inyectan aproximadamente 10 μ l de suspensión celular (10.000 células por μ l) lentamente a lo largo de un periodo de 30 minutos en el cuerpo estriado a una profundidad de 4-5 mm desde la superficie del cerebro. La herida se cierra por sutura y se hace el seguimiento de los animales durante un periodo de hasta 10 semanas. Se lleva a cabo la eutanasia de los animales por perfusión intercárdica después de anestesia profunda con xilozina y ketamina, usando PBS enfriado con hielo, paraformaldehído tamponado al 3% y después sacarosa al 10%. Se examina en los cerebros por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, la presencia de marcadores de genes humanos (fragmento Alu) y la expresión de marcadores específicos de linaje celular. La constatación de la supervivencia, diferenciación y migración de células humanas se determina por este procedimiento. Se pueden tener en consideración las modificaciones que usan marcaje de células con colorantes fluorescentes o ingeniería genética de las células antes de implantarlas con agentes víricos.

B. Se aíslan las células del estroma de tejido adiposo humano de un paciente individual para el trasplante autólogo o alógeno a un receptor histocompatible de acuerdo con los procedimientos descritos antes. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial, en un medio compuesto de, pero no limitado a medio DMEM (alta concentración de glucosa) que contiene suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 5% y antibióticos, a 37°C. Las células se recogen por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante.

Las células del estroma se introducirán en el sistema nervioso central de un paciente después de un trastorno o enfermedad del sistema nervioso central potencialmente mortal y/o debilitante, tal como un accidente cerebrovascular (infarto cerebral), enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Las células se infunden en el cuerpo estriado de la zona afectada del cerebro usando un procedimiento neuroquirúrgico. Cuando es posible se usan procedimientos mínimamente invasivos, guiados por radiología. Después de la cirugía se hace el seguimiento de la función cognitiva y metabólica del sistema nervioso central para documentar las mejoras secundarias al trasplante. Se usan células tratadas por ingeniería genética con genes que codifican enzimas destinadas a mejorar la función del SNC, tal como enzimas metabólicas de dopamina en el caso de la enfermedad de Parkinson, según sea adecuado para los trastornos particulares.

Ejemplo 3

Compromiso neuronal de células del estroma derivadas de tejido adiposo humano

Reparación y recuperación funcional mejoradas en una lesión traumática del sistema nervioso

Se aíslan células del estroma de tejido adiposo humano de un paciente individual para el trasplante autólogo o alógeno a un receptor histocompatible de acuerdo con los procedimientos descritos antes. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial, en un medio compuesto de, pero no limitado a medio DMEM (alta concentración de glucosa) con glutamina 1 mM pero sin piruvato, que contiene suero bovino fetal al 10%, suero de ternero recién nacido al 10%, reservas de nucleósidos, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, 1000 unidades/ml de factor inhibidor de leucemia y antibióticos, a 37°C.

Las células se recogen por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante. Después las células se cultivan en placa sobre sustrato plástico de cultivo tisular recubierto con solución de gelatina estéril al 0,1%. Las células se recogen durante la etapa de crecimiento rápido por digestión con tripsina al 25% y EDTA 1 mM y trituración antes de la diferenciación/implante. Las células se recogen en forma de una suspensión, con las células individuales y las masas de células juntas. Las células se ponen en partes alícuotas en discos bacteriológicos (cultivo no tisular) de 100 mm de diámetro en un volumen de 10 ml de medio que consiste en DMEM (alta concentración de glucosa) con glutamina 1 mM pero sin piruvato, que contiene suero bovino fetal al 10%, suero de ternero recién nacido al 10% y reservas de nucleósidos (medio de control). Los cultivos celulares se mantienen durante 2 días, y durante este tiempo se forman agregados de células; en este momento el medio se sustituye por el medio de control original. Después de 2 días adicionales en cultivo (día 4 después del pase), las células se alimentan con medio de control complementado con ácido retinoico todo trans en concentraciones entre 10^{-9} M y 10^{-6} M, más preferiblemente 5×10^{-7} M. Las células se mantienen en el medio complementado con ácido retinoico todo trans el día 6. El día 8 después del pase, las células están listas para la evaluación y uso en el tratamiento de un modelo de lesión traumática espinal o del sistema nervioso periférico.

La evaluación *in vitro* de las células se lleva a cabo pasando las células del disco de cultivo bacteriológico a discos de cultivo tisular estándar para proporcionar un sustrato para la unión. Se deja que las células se adhieran al plástico y se evalúan basándose en su morfología, de acuerdo con un perfil de diferenciación neuronal, y en la expresión de proteínas neuronales asociadas, incluyendo pero sin limitar a beta-tubulina de clase III, la subunidad M de neurofilamentos, tirosina-hidroxilasa, subunidades del receptor de glutamato de las clases GluR1-4 y GluR6, proteína ácida fibrilar glial, proteína básica de mielina y factor cerebral 1 (Bain y col. (1995) Develop. Biol. 168:342-357).

La evaluación *in vivo* de las células se lleva a cabo por trasplante de agregados de células a la siringa que se forma alrededor de una lesión de la médula espinal torácica experimentalmente inducida en ratas (McDonald y col. (1999)

ES 2 300 320 T3

Nature Med. 5(12):1410-1412). El modelo de lesión de médula espinal torácica (vértebras torácicas 9-10) se crea en ratas Long-Evans usando una varilla de 10 gramos de 2,5 mm de diámetro que baja 25 mm. El noveno día después de la lesión, se transplantan agregados de células del estroma derivadas de tejido adiposo (aproximadamente 10^{-6} células) por inyección usando un sistema de inyección microestereotáxico en la siringa de la lesión de la médula espinal torácica. Se inyectan controles de funcionamiento simulado con un volumen equivalente de medio solo (sin células). Empezando el día del trasplante, las ratas reciben ciclosporina diariamente (10 mg/kg) para prevenir el rechazo. Se evalúa la función motora de las extremidades posteriores basándose en la escala de clasificación locomotora de Basso-Beattie-Bresnahan en las ratas, a lo largo de un periodo de 6 semanas después del trasplante, para permitir la comparación funcional de la recuperación entre las células del estroma transplantadas y los controles de funcionamiento simulado. En la finalización del estudio (6 semanas), los animales se sacrifican y se examina histológicamente en los tejidos la constatación de la detección de células del estroma adiposo humano, basándose en la detección *in situ* del ADN *Alu* humano. La diferenciación celular se determina por detección de anticuerpos de marcadores específicos de oligodendrocitos tales como, pero no exclusivamente, producto del gen de la poliposis familiar cólica APC CC-1, marcadores específicos de astrocitos tales como, pero no exclusivamente, proteína ácida fibrilar glial, GFAP y neuronales tales como, pero no exclusivamente, proteína nuclear específica de neurona, NeuN. La localización conjunta del ADN *Alu* y marcadores específicos de diferenciación se considera una prueba de la diferenciación de células del estroma.

Se ensaya en las células del estroma derivadas de tejido adiposo humano la diferenciación neuronal basándose en ensayos *in vitro*. Las células del estroma derivadas de tejido adiposo humano se cultivan en concentraciones de 8.000 células/cm² durante 24 horas en DMEM complementado con suero bovino fetal al 20% y antibióticos. Las células después se tratan con antioxidantes tales como BHA en concentraciones 20 μ M a 200 μ M en DMEM con suero bovino fetal al 0%, durante periodos de 5 horas a 5 días. Las células se fijan y se examina la expresión de la diferenciación neuronal por (a) criterios morfológicos; (b) criterios inmunohistoquímicos, inmunofluorescentes o de la citometría de flujo; (c) criterios de inmunotransferencia; y/o (d) reacción en cadena de la polimerasa o análisis de transferencia northern de ARNm seleccionados. Se evalúa en las células la expresión de un subconjunto de los siguientes marcadores neuronales: NeuN, NF-M, NSE, nestina y *trkA* usando anticuerpos o reactivos oligonucleótidos. Los criterios morfológicos de diferenciación incluyen la formación de un cuerpo celular multipolar contraído con extensiones celulares membranosas de tipo proyecciones que llevan a extensiones terminales de tipo cono de crecimiento y filopodios, la capacidad de dichas células para generar y mantener un potencial de acción acorde con la transmisión neuronal de señal, y la capacidad de expresar receptores y sistemas de absorción para neurotransmisores conocidos, tales como el glutamato.

Ejemplo 4

Compromiso de hepatocitos de células del estroma derivadas de tejido adiposo humano

A. Se aíslan células del estroma de tejido adiposo humano de acuerdo con los procedimientos descritos en “*Methods and Composition for the Differentiation of Human Preadipocytes into Adipocytes*” solicitud de patente de EE.UU. número de serie 09/240.029, presentada el 29 de enero, 1999, y usando las modificaciones listadas antes. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial, en un medio compuesto de, pero no limitado a medio DMEM (alta concentración de glucosa) que contiene suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 5% y antibióticos, a 37°C. Las células se recogerán por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante.

Las células del estroma derivadas de tejido adiposo se transplantan a ratones sin sistema inmune inmunodeficientes que portan un transgén para el gen de fusión de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa-proteína urinaria principal de ratón [Weglarz TC, Degen JL, Sandgren EP 2000 *Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver: kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. Am. J. Pathol.* 157: 1963-1974]. Estos animales presentan una degeneración progresiva del hígado. Las células del estroma se introducen en el modelo animal por trasplante en el bazo, por vía intraperitoneal y/o infusión intravenosa. Los animales representativos del control o de los grupos experimentales se sacrifican a intervalos en el transcurso de 4 meses. La constatación de la regeneración del hígado se evaluará basándose en análisis histológicos y biológicos moleculares del tejido hepático. Los procedimientos inmunohistoquímicos y biológicos moleculares (tinción de *Alu*) documentarán la presencia de células humanas en el hígado regenerado.

B. Se aislarán células del estroma de tejido adiposo humano de un paciente individual para el trasplante autólogo o alógeno a un receptor histocompatible de acuerdo con los procedimientos descritos en “*Methods and Composition for the Differentiation of Human Preadipocytes into Adipocytes*” solicitud de patente de EE.UU. número de serie 09/240.029, presentada el 29 de enero, 1999, y usando las modificaciones listadas antes. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta 5 días después del cultivo en placa inicial en un medio compuesto de, pero no limitado a medio DMEM (alta concentración de glucosa) que contiene suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 5% y antibióticos, a 37°C. Las células se recogerán por digestión con tripsina/EDTA antes de la diferenciación/implante.

Las células del estroma se introducirán en el bazo, la circulación y/o el peritoneo de un paciente que padece enfermedades hepáticas degenerativas de cualquier origen, secundarias a infección vírica, ingestión de toxinas o errores metabólicos congénitos. Cuando sea posible, se usarán procedimientos mínimamente invasivos, guiados por radiología, para implantar las células. Se usarán células preparadas por ingeniería genética con genes que codifican enzimas diseñadas para mejorar la función hepática, según sea adecuado para los trastornos particulares.

ES 2 300 320 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento *in vitro* para diferenciar una célula del estroma aislada derivada de tejido adiposo en una célula que tiene las propiedades de una célula neuronal, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula del estroma con un antioxidante, induciendo así la diferenciación de dicha célula del estroma en una célula neuronal *in vitro*.

10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha célula del estroma aislada derivada de tejido adiposo es una célula humana.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho antioxidante se selecciona del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol e hidroxianisol butilado.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65