(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 465 226**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61K 35/44 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2004 E 04723937 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1613335**

(54) Título: **Formación de vasos sanguíneos inducida por células precursoras mesenquimales perivasculares**

(30) Prioridad:

28.03.2003 AU 2003901668 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2014

(73) Titular/es:

MESOBLAST, INC. (100.0%)
275 Madison Avenue 4th Floor
New York NY 10016, US

(72) Inventor/es:

GRONTHOS, STAN y
ZANNETTINO, ANDREW

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

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

Formación de vasos sanguíneos inducida por células precursoras mesenquimales perivasculares

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona con células precursoras mesenquimales que portan un marcador perivascular y son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos, a una composición que comprende tales células precursoras y un método para inducir vasos sanguíneos. La invención también se refiere al tratamiento de afecciones cardiovasculares, en particular la isquemia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los trastornos vasculares constituyen un importante problema de salud, especialmente en los países occidentales. Los trastornos vasculares incluyen afecciones del corazón, enfermedad vascular periférica y afecciones vasculares cerebroespinales.

Una proporción importante de estas afecciones resultan de la falta de suministro de sangre a los respectivos tejidos que por lo tanto se privan crónicamente o de forma aguda de los niveles necesarios de oxígeno y nutrientes. Típicamente estas afecciones resultan isquemias donde ha habido obstrucción del vaso sanguíneo por la acumulación de, por ejemplo, placa o daño físico del vaso sanguíneo de tal manera que estos son bloqueados, o restringidos.

Las afecciones cardiacas son percibidas como la enfermedad vascular más prominente. Cerca de 11 millones de adultos en los Estados Unidos de América (1995) tuvieron enfermedades coronarias, que sin embargo está fuera de un total de aproximadamente 60 millones de adultos con enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, otras afecciones vasculares afectan a un mayor número de adultos.

Una afección cerebrovascular relativamente común puede manifestarse como un accidente cerebrovascular, donde una oclusión puede conducir a un ataque agudo. Una gradual disminución de la alimentación también puede conducir a la disminución de la capacidad del cerebro para funcionar y se ha postulado que tales condiciones pueden estar asociadas con la aparición de determinadas demencias.

La enfermedad vascular periférica se asocia con una serie de afecciones, por ejemplo, como una complicación de la diabetes, donde una insuficiencia típica de la microcirculación agota el suministro de oxígeno y nutrientes a las extremidades en particular los pies y las piernas.

Otro ejemplo de la reducción del suministro localizado puede ocurrir con el tratamiento de diversas heridas incluyendo quemaduras graves o heridas crónicas tales como úlceras de decúbito. Las heridas crónicas son difíciles de curar, en parte debido a un suministro insuficiente al lecho vascular de compuestos nutricionales y curativos.

La formación de cicatrices también puede exacerbarse debido a que el proceso de curación implica a menudo un tejido altamente fibrótico que se forma dentro de la formación mínima de los vasos sanguíneos. La formación de cicatrices es también una dificultad asociada con el logro de un suministro vascular adecuado en circunstancias en que una prótesis u otro implante se coloca quirúrgicamente en un tejido humano. Un suministro inadecuado de sangre a la interfaz entre el implante y el tejido que lo rodea puede llevar a complicaciones médicas y la necrosis. Esto es de mucha más relevancia cuando el implante está destinado a ser un depósito de liberación lenta a largo plazo de, por ejemplo, un producto farmacéutico

El tratamiento de las isquemias miocárdicas es probablemente el más avanzado de los tratamientos actuales de los trastornos vasculares. Los tratamientos presentes incluyen terapias farmacológicas, cirugía de derivación de la arteria coronaria y revascularización percutánea usando técnicas tales como la angioplastia con balón. La terapia farmacológica estándar aspira ya sea aumentar el suministro de sangre al músculo cardíaco o disminuir la demanda del músculo cardíaco de oxígeno y nutrientes . El suministro aumentado de sangre al miocardio por la relajación de músculo liso se logra administrando agentes tales como bloqueadores de los canales de calcio o nitroglicerina. La demanda disminuida de oxígeno y nutrientes del músculo cardíaco se logra ya sea por agentes que disminuyen la carga hemodinámica en el corazón, tales como vasodilatadores arteriales, o aquellos que disminuyen la respuesta contráctil del corazón a una carga hemodinámica dada, tales como antagonistas de los receptores β-adrenérgicos. El tratamiento quirúrgico de la cardiopatía isquémica se basa en la derivación de segmentos de arterias enfermas con injertos de derivación colocados estratégicamente. La neovascularización percutánea se basa en el uso de catéteres para reducir el estrechamiento en las arterias coronarias enfermas. Todas estas estrategias se usan para reducir el número de, o erradicar, los episodios

isquémicos, pero todas tienen varias limitaciones, y en particular el enfoque farmacéuticas pueden tener efectos secundarios graves.

Los informes preliminares describen el desarrollo de nuevos vasos en el corazón a través de la inyección directa de proteínas o péptidos angiogénicos. Varios miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (es decir factor de crecimiento de fibroblasto ácido, aFGF; factor de crecimiento de fibroblasto básico, bFGF; factor de crecimiento de fibroblastos-5, FGF-5 y otros) se han implicado en la regulación de la angiogénesis durante el crecimiento y desarrollo. La terapia génica fue sugerida por Hammond y otros en US 5792453 como un mecanismo de suministro de estos compuestos angiogénicos.

Otro enfoque sugerido para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos para el tratamiento de afecciones vasculares es la administración de células madre que pueden diferenciarse y dar lugar a células necesarias para formar tales vasos sanguíneos. Un problema asociado con este enfoque es que no está completamente claro que las células progenitoras son responsables de la formación del vaso sanguíneo, o si claramente se necesita más de un tipo de célula o si se necesitan otros promotores de la angiogénesis.

Un enfoque reportado descrito en la patente de los Estados Unidos núm. 5980887 (de Isner y otros) ha dado como resultado el aislamiento de una célula progenitora endotelial y el descubrimiento de que estas células tienen un papel en la formación de los vasos sanguíneos.

Se han realizado numerosos intentos de aislar y enriquecer las células precursoras mesenquimales debido al potencial que tiene estas células para uso medicinal. Pittinger *y otros*, (1999) mostraron la expansión de células clonogénicas de médula ósea y describen una preparación de células madre mesenquimales ampliadas. Un ejemplo más reciente de un método de este tipo que se proporciona para un rendimiento relativamente alto de la médula ósea se describe en la publicación WO01/04268 otorgada a Simmons y otros. Ninguna de estas células mesenquimales reportadas se indicaron como ser capaces de la regeneración de linajes de células vasculares capaces de conducir a la formación de vasos sanguíneos.

Hasta la fecha, sin embargo no ha habido ejemplos de células precursoras mesenquimales aisladas capaces de formar tejidos vasculares *in vivo.*

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz de una población de células para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la isquemia en un paciente, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece de células que expresan el marcador STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1 % de células precursoras mesenquimales (MPC) capaces de formar UFC-F (unidad formadora de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45, y glicoforina-A.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una población de células para usar en el tratamiento de la isquemia en un paciente, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece con células que expresan el marcador STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1 % de MPC capaces de formar una UFC-F (unidad formadora de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34 , CD45 , y glicoforina-A.

En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de una población de células para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular consistente de cardiopatía isquémica, enfermedad de la arteria coronaria, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, o angina en un sujeto, en donde la población de células es derivable a partir de células mononucleares de médula ósea y se enriquece de células que expresan el marcador STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1 % de MPC capaces de formar una UFC-F (unidad formadora de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45 y glicoforina-A.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una población de células para usar en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular consistente de cardiopatía isquémica, enfermedad de la arteria coronaria, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, o angina en un sujeto, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece de células que expresan el marcador STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1 % de MPC capaces de formar una UFC-F (unidad formadora de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45 y glicoforina-A.

La presente invención surge del descubrimiento que una población de células precursoras mesenquimales (MPC) está presente en un nicho perivascular. Esto ha llevado a la demostración de que existe una variedad mucho más amplia de

fuentes de tipo de tejido de las MPC que el tejido único, la médula ósea, referido en WO01/04268. La presente invención surge del descubrimiento adicional que una población de MPC enriquecida se puede diferenciar en dos poblaciones discriminadas por el marcador 3G5. Las MPC que son 3G5 positivas se consideran de interés particularmente para aplicaciones de neovascularización, aunque demostrablemente son capaces también de diferenciar en otros tipos de tejidos. Es un descubrimiento adicional de la presente invención que los niveles de las MPC presentes en poblaciones enriquecidas preferidas de esta invención son capaces de dar lugar a un número suficiente de células comprometidas para proporcionar un número de tipos de tejidos diferenciados. Se trata de un descubrimiento adicional de la presente invención que ciertos niveles de MPC son útiles en la introducción en un paciente para proporcionar un beneficio de vascularización medible. Se ha encontrado específicamente por lo tanto que un nivel de un estimado de aproximadamente 10^5 MPC son suficientes para proporcionar un beneficio medible de mejora cardíaca en un miocardio isquémico de rata. Esto proporciona después un dato a partir del que se puede hacer una evaluación aproximadamente de los números de MPC necesarios para proporcionar un efecto beneficioso. Se cree además que es la primera vez que un beneficio cardíaco se ha mostrado en la administración de una célula precursora mesenquimal al corazón.

Se describe además en la presente descripción un método para inducir la formación o reparación de vasos sanguíneos en un tejido objetivo de un paciente, el método que comprende las etapas de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una población enriquecida de células precursoras mesenquimales perivasculares (MPC) para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido objetivo.

En la presente descripción, se describe además un método para reparar el tejido dañado en un sujeto humano que necesita tal reparación, el método comprende:

(a) obtener una población enriquecida de MPC, y
(b) contactar una cantidad eficaz de la población enriquecida de MPC con el tejido dañado de dicho sujeto

En la presente descripción, se describe además un método para reparar el tejido dañado en un sujeto humano que necesita tal reparación, el método comprende:

(a) expandir las MPC enriquecidas de la reivindicación 41 en cultivo, y
(b) contactar una cantidad eficaz de las células expandidas con el tejido dañado de dicho sujeto.

En la presente descripción, se describe además un método para inducir la formación o reparar los vasos sanguíneos, el método comprende las etapas de proporcionar una población de células precursoras mesenquimales (MPC) perivasculares enriquecidas, contactar dichas células con un medio de crecimiento, y cultivar dichas células bajo condiciones para inducirlas a diferenciarse en nuevos vasos sanguíneos.

En la presente descripción, se describe además una composición para usar en la inducción de la formación de vasos del corazón que comprende una población de células precursoras mesenquimales (MPC) en un portador farmacéuticamente aceptable, dichas MPC portan un marcador perivascular y son un progenitor vascular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.

Propiedades de células aisladas por MACS STRO-1 $^+$ co-marcadas con anti-CD146 (CC9). (A) La región de clasificación, R1, representa la población doble positiva STRO-1^{BRT}/$CD146^+$. (B) La incidencia de las colonias de células clonogénicas (>50 células) basada en la expresión de STRO-1^{BRT}/$CD146^+$ se determinó por análisis de dilución limitante de 24 réplicas por concentración celular usando el análisis de distribución de Poisson a partir de 5 experimentos independientes. Características de la dispersión de luz frontal (tamaño) y perpendicular (granularidad) de BMMNCs (C), STRO-1^{int}/$CD146^-$ (D) y células STRO-1^{BRT}/$CD146^+$ (E). (F) Análisis RT-PCR de células de médula clasificadas STRO-1^{BRT}/$CD146^+$ por los transcriptos CBFA1 (carril 2), osteocalcina (carril 4) y GAPDH (carril 6). Las células de control (cultivos BMSSC crecidos en presencia de dexametasona) que expresan CBFA1 (carril l), osteocalcina (carril 3), y GAPDH (carril 5) también se muestran. Las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en un gel 1.5 % de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. (G) Expresión *in situ* de CD146 en las paredes de vasos sanguíneos (bv) (flecha) en secciones de médula ósea humana (bm) cerca de la superficie del hueso (b) 20X . Las secciones se tiñeron con hematoxilina. (H) Tinción doble de la inmunofluorescencia demostrando la reactividad del anticuerpo STRO-1 marcado con rojo Texas y el anticuerpo CC9 marcado con isotiocianato de fluoresceína, que reaccionan con las paredes de los vasos sanguíneos en las secciones congeladas de la médula ósea humana.

Figura 2.

Análisis immunofenotípico de DPSC *in vivo.* El gráfico de barras representa el número de colonias clonogénicas recuperadas de suspensiones celulares individuales de la pulpa dental después de la selección con perlas inmunomagnéticas basado en la reactividad a los anticuerpos que reconocen STRO-1, CD146, y 3G5 y anticuerpos control negativo coincidentes en isotipo. Los datos se expresan como el número de unidades formadoras de colonias obtenidas en las fracciones de perlas con células positivas como un porcentaje del número total de colonias en las células de la pulpa sin fraccionar promediadas a partir de tres experimentos separados. La significación estadística (*) se determinó usando la prueba t de Student (p 0.01) comparando el porcentaje total del número total de colonias para cada anticuerpo con el correspondiente control coincidente en isotipo.

Figura 3.

Reactividad de los marcadores perivasculares en la pulpa dental. (A) Inmunolocalización del antígeno STRO-1 en los vasos sanguíneos (flechas pequeñas) en la pulpa dental humana (p) y alrededor del perineurio (flecha grande) que rodea un grupo de nervios (nb) 20X. (B) Tinción doble de la inmunofluorescencia que demuestra la reactividad del anticuerpo ASTRO-1 marcado con rojo Texas a perineuro de pulpa dental (flecha) en combinación con un anticuerpo anti-neurofilamento marcado con isocianato de fluoresceína que tiñe el grupo de nervios interior (nb), 40X. (C) Inmunolocalización del antígeno CD146 a las paredes de los vasos sanguíneos en el tejido de pulpa dental humana 20X. (D) Tinción doble de la inmunofluorescencia que demuestra la reactividad del anticuerpo STRO-1 marcado con rojo Texas a un vaso sanguíneo y el anticuerpo CC9 marcado con isocianato de fluoresceína. (E) Tinción inmunohistoquímica del tejido de la pulpa con un anticuerpo anti-DSP policlonal en conejo (flecha) a la capa externa de odontoblasto (od). 20X. (F) Reactividad de 3G5 a un pericito único (flecha) en una pared de vaso sanguíneo (bv) 40X . Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina.

Figura 4.

Reactividad de 3G5 a BMSSC. (A) El histograma representativo describe un perfil típico de análisis FACS de doble color de todas las células mononucleares de la médula ósea (BMMNC) que expresan CD146 (PE) y 3G5 (FITC). (B) Los ensayos de eficacia de colonia se realizaron para todos los diferentes patrones de expresión observados (regiones "R" 1-6). Los datos se expresan como la incidencia media de las unidades formadoras de colonias para cada fracción de células promediadas a partir de tres experimentos separados.

Figura 5.

Potencial desarrollo de BMSSC y DPSC purificadas in vivo. Preparaciones Cytospin de células de la médula STRO-1 ^{BRT}/CD146^{+}aisladas por MACS/FACS (flecha) se tiñeron con un anticuerpo específico para α - actina de músculo liso (A) y Factor de von Willebrand (B) Las células de la pulpa CD146^{+} (flecha grande) aisladas por selección de perlas inmunomagnéticas (perlas magnéticas representadas por flechas pequeña), se tiñeron con un anticuerpo específico para α -actina de músculo liso (C) y Factor de von Willebrand. (D). (E) Formación ectópica de hueso (b) y médula hematopoyética/adipogénica (bm) por células expandidas *ex vivo* derivadas de BMSSC STRO-1^{BRT}/CD146^{+} trasplantadas con HA/FTC en ratones inmunodeprimidos durante tres meses (E). (F) Formación ectópica de dentina (d) y tejido fibroso de pulpa por células expandidas *ex vivo* derivadas a partir de CD146^{+}DPSC trasplantados con HA/FTC en ratones inmunodeprimidos durante tres meses. Las secciones se tiñeron con hematoxilina & eosina.

Figura 6

Expresión de CD34, CD45 y glicoforina-A en las células mononucleares de la médula ósea positivas a STRO-1. Histogramas representativos que describen perfiles típicos de análisis por citometría de flujo de dos colores de las células mononucleares de la médula ósea positivas a STRO-1 aisladas inicialmente por la clasificación magnética activada y coteñidas con anticuerpos dirigidos contra CD34 (a), CD45 (B) o Glicoforina-A (C). El anticuerpo STRO-1 se identificó usando un anti-IgM murino-isotiocianato de fluoresceína en carnero, mientras que CD34, CD45 y Glicoforina-A se identificaron usando un anti-IgG murina-ficoeritrina en carnero. La fracción STRO-1 que se expresa alto que contuvo la población MPC clonogénica se aisló por clasificación de células activadas por fluorescencia basado en las regiones R1 y R2.

Figura 7

Las MPC de médula ósea son STRO-1 bright, CD34 negativo, CD45 negativo y Glicoforina-A negativo. El gráfico representa los resultados de los ensayos in vitro de formación de colonias adherentes realizados para cada una de

las diferentes poblaciones clasificadas STRO-1 bright seleccionadas por su co-expresión o falta de cualquiera de los antígenos CD34, CD45 o Glicoforina-A, basados en las regiones R1 y R2 como se indicó en la Figura 6. Estos datos se expresan como la incidencia media de las unidades formadoras de colonias para cada fracción de células promediadas a partir de dos experimentos separados

Figura 8

Reactividad de los marcadores perivasculares en diferentes tejidos humanos. Tinción de la inmunofluorescencia de doble color que demuestra la reactividad de (A) STRO-1 y CD146, (B) STRO-1 y alfa-actina de músculo liso, y (C) 3G5 y CD146, en los vasos sanguíneos y tejido conectivo presentes en bazo, páncreas (Panel 1), cerebro, riñón (Panel 2), hígado, corazón (Panel 3) y piel (Panel 4) 20X . Los anticuerpos STRO-1 y 3G5 se identificaron usando un anti- IgM murina- rojo Texas en carnero, mientras que CD146 y alfa actina de músculo liso se identificaron usando un isotiocianato de fluoresceína anti-IgG murino en carnero. La co-localización se indica por áreas superpuestas de fluorescencia amarilla y naranja (flechas blancas).

Figura 9

Aislamiento por FACS de MPC derivadas de tejido adiposo. Histogramas representativos de citometría de flujo que describen la expresión de STRO-1, CD146 y 3G5 en preparaciones frescas de suspensiones celulares individuales derivadas de tejido adiposo periférico generadas después de la digestión colagenasa/dispasa como se describió anteriormente (Shi y Gronthos 2003). Los anticuerpos se identificaron usando ya sea un anti–IgM o IgG murino-ficoeritrina en carnero. Las poblaciones celulares se seleccionaron después por FACS, basado en su positividad (región R3) o negatividad (región R2) para cada marcador y después se sembraron en medio de crecimiento regular para evaluar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular.

Figura 10

Las MPC clonogénicas derivadas de tejido adiposo son positivas para STRO-1/3G5/CD146. El gráfico de barras representa el número de colonias clonogénicas recuperadas a partir de suspensiones celulares individuales de tejido adiposo periférico humano digerido enzimáticamente, después de la clasificación de células activadas por fluorescencia, basado en su reactividad a anticuerpos que reconocen STRO-1, CD146, y 3G5 (Figura 9), cultivadas después en medio de crecimiento estándar tal como se describió anteriormente para la médula ósea y el tejido de la pulpa dental (Shi y Gronthos 2003). Los datos se expresan como el número de unidades formadoras de colonias obtenidas por 10^5 células sembradas en las fracciones de células positivas y negativas promediadas a partir de dos experimentos separados.

Figura 11

Análisis inmunofenotípico de MPC derivadas de tejido adiposo. Histogramas representativos de citometría de flujo que describen la co-expresión de STRO-1 y CD146 (A) y 3G5 y CD146 en preparaciones frescas de suspensiones celulares individuales derivadas de tejido adiposo periférico se generaron después de la digestión con colagenasa/dispasa. Los anticuerpos STRO-1 y 3G5 se identificaron usando un anti-IgM murina-ficoeritrina en carnero mientras que CD146 se identificó usando un isotiocianato de fluoresceína anti-IgG murino en carnero.

Figura 12

Potencial de desarrollo de las MPC derivadas de adipocitos purificadas *in vitro*. Preparaciones de cultivos primarios de MPC derivadas de células adiposas STRO-1^+/CD146^+ se re-cultivaron, ya sea en condiciones de cultivo estándar (A), medio inductivo osteogénico (B), medio inductivo adipogénico (C) o condiciones condrogénicas (D) como se describió anteriormente Gronthos y otros 2003. A continuación de dos semanas de inducción de la múltiple diferenciación, la MPC derivada de adipocito demostró la capacidad para formar hueso (B; depósitos minerales positivos con alizarina), grasa (C; lípidos positivo con Aceite Rojo O) y cartílago (D: matriz de colágeno tipo II)

Figura 13

Aislamiento de MPC derivadas de la piel por FACS. Histogramas representativos de citometría de flujo que describen la expresión de STRO-1, CD146 y 3G5 en preparaciones frescas de suspensiones celulares individuales de piel de espesor total se generaron después de la digestión con colagenasa/dispasa. Los anticuerpos se identificaron usando ya sea un anti-IgM o IgG murina-ficoeritrina en carnero. Poblaciones celulares se seleccionaron después por FACS, basado en su positividad (región R3) o negatividad (región R2) para cada marcador y se sembraron después en

medio de crecimiento regular para evaluar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular.

Figura 14

Las MPC clonogénicas derivadas de la piel son positivas para STRO-1/3G5/CD146. El gráfico de barras representa el número de colonias adherentes recuperadas de suspensiones celulares individuales de la piel humana digeridas enzimáticamente, después de la clasificación de células activadas por fluorescencia, basado en su reactividad a anticuerpos que reconocen STRO-1, CD146, y 3G5 (Figura 6), cultivadas después en medio de crecimiento estándar tal como se describió anteriormente para la médula ósea y el tejido de la pulpa dental (Shi y Gronthos 2003). Los datos se expresan como el número de unidades formadoras de colonias obtenidas por 10^5 células sembradas en las fracciones de células positivas y negativas promediadas a partir de dos experimentos separados.

Figura 15

Supervivencia prominente in vivo de células cultivadas STRO1^{bright} adyacentes a vasos sanguíneos.

Figura 16

Arteriogénesis del tumor inducida por células cultivadas STRO1^{bright}.

Figura 17

Arteriogénesis del tumor inducida por la progenie de células STRO1^{bright}.

Figura 18

Arteriogénesis cardíaca dependiente de la dosis por células cultivadas STRO1^{bright}.

Figura 19

Mejora en la inyección bimiocardial de la fracción de eyección ventricular izquierda (EF) de células cultivadas STRO1^{bright}.

Figura 20

Mejora en el acortamiento del área fraccional ventricular izquierda (FAS) por la inyección miocardial de células cultivadas STRO1^{bright}.

Figura 21

Mejora en la función cardíaca global por la inyección miocardial de células cultivadas STRO1^{bright}.

Figura 22.

MPC STRO1^{bri} expandidas *ex vivo* se pueden desarrollar dentro de las arteriolas *in vitro.* Las suspensiones celulares individuales de MPC STRO1^{bri} de médula ósea expandidas *ex* vivo que se prepararon por tratamiento con tripsina/EDTA se sembraron después en placas de 48 pocillos que contienen 200µl de matrigel. Las MPC STRO1^{bri} se sembraron a 20,000 células por pocillo en medio libre de suero (Gronthos y otros 2003), complementado con los factores de crecimiento PDGF, EGF, VEGF a 10ng/ml. Después de 24 horas de cultivo a 37 ℃ en 5% de CO_2, los pocillos se lavaron después se fijaron con 4 % de paraformaldehído. Los estudios de immunohistoquímica que se realizaron posteriormente demostraron que las estructuras similares al cordón expresan alfa-actina de músculo liso identificado con un anticuerpo anti-IgG murino con peroxidasa de rábano en carnero.

Figura 23 A. Patrón de expresión inmunofenotípica de MPC de médula ósea expandida ex vivo. Las suspensiones celulares individuales de MPC de médula ósea expandida ex vivo que se prepararon por tratamiento con tripsina/EDTA se incubaron después con anticuerpos que identifican marcadores asociados al linaje celular. Para aquellos anticuerpos que identifican los antígenos intracelulares, las preparaciones de células se fijaron con etanol frío al 70 % para permeabilizar la membrana celular antes de la tinción de los marcadores intracelulares Anticuerpos de control coincidentes en isotipo se trataron bajo condiciones idénticas. Se realizó el análisis de citometría de flujo usando un instrumento COULTER EPICS. Los gráficos de

puntos representan 5,000 eventos en modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador de células del linaje (línea gruesa) con referencia a los anticuerpos control negativo de isotipo coincidente (línea delgada) .

Figura 23 B. Perfil de expresión génica de MPC cultivada. Las suspensiones celulares individuales de MPC de médula ósea expandida ex vivo se prepararon por tratamiento con tripsina/EDTA y se preparó el ARN celular total. Usando el método de extracción RNAzo1B se aisló el ARN total y usó como un molde para la síntesis de ADNc, preparado usando un procedimiento estándar. La expresión de varios transcriptos se evaluó mediante amplificación por PCR, usando un protocolo estándar como se describió anteriormente (Gronthos y otros 2003). Los conjuntos de iniciadores usados en este estudio se muestran en la Tabla 2. A continuación de la amplificación, cada mezcla de reacción se analizó por electroforesis en gel 1.5 % de agarosa, y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. La expresión génica relativa para cada marcador de células se evaluó con referencia a la expresión del gen de mantenimiento, GAPDH, usando el software ImageQuan.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRADAS Y EJEMPLIFICADAS DE LA INVENCIÓN

Los usos y poblaciones de células para usar de acuerdo con la invención se pueden usar en un método para inducir la neovascularización por el uso de una composición de células precursoras. Esto tiene una variedad de aplicación .

Los usos y poblaciones de células para usar de acuerdo con la invención tienen por lo tanto aplicación al inducir la reparación de vasos sanguíneos o formación, por ejemplo, en el tratamiento de la isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia de las extremidades, cardiomiopatía isquémica e isquemia de miocardio, cuando se administran las células progenitoras endoteliales.

Una amplia variedad de tejidos se puede tratar y tales tejidos pueden incluir, por ejemplo, músculo, cerebro, riñón y pulmón. Enfermedades isquémicas incluyen, por ejemplo, isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia de las extremidades, cardiomiopatía isquémica e isquemia miocárdica.

El tratamiento de estas condiciones, puede incluir la etapa de aislar las células progenitoras mesenquimales de un tejido del paciente, y luego administrarlas nuevamente al paciente. El paciente también puede ser tratado con compuesto conocido para promover la formación o reparación de los vasos sanguíneos o para mejorar el crecimiento de células mesenquimales y/o la diferenciación vascular. Para este fin, las MPC puede administrarse al paciente por cualquier medio adecuado, incluyendo, por ejemplo, infusión intravenosa, inyección en bolo, y administración dirigida al sitio a través de un catéter.

Los usos y las poblaciones de células para usar de acuerdo con la invención pueden tener aplicabilidad además para el tratamiento de quemaduras y heridas, incluyendo úlceras crónicas tales como úlceras de decúbito, y ciertas ulceraciones. Para estas condiciones las MPC pueden aplicarse por vía tópica, tal vez suspendidas en una crema o junto con un agente adecuado para ayudar a la migración de las células en la subsuperficie. Alternativamente las MPC podrían sostenerse dentro de un vendaje quizás dentro de una matriz protectora que es soluble al contacto prolongado con la herida u otra superficie.

Los usos y las poblaciones de células para usar de acuerdo con la invención pueden tener aplicación además cuando un suministro de sangre reducido conduce a, por ejemplo, la calvicie. La composición de MPC puede inyectarse por vía subcutánea o por vía dérmica en la zona afectada.

Los injertos cultivados in vitro de tejido vascularizado también se contemplan por la invención en la que las MPC se cultivan en medios y en presencia de compuestos conocidos para promover la diferenciación en células vasculares, para producir un injerto que incluye células sin diferenciación, parcialmente diferenciadas y algunas diferenciadas.

En el caso de un implante, el cirujano puede aplicar una composición que contiene las MPC durante la implantación de una prótesis, para promover la vascularización en la interfase de la prótesis y el tejido circundante. Un proceso alternativo puede ser tener las MPC o un injerto parcialmente o totalmente diferenciado desarrollado en el implante. Estas pueden o no estar dentro de una matriz protectora. El beneficio de un injerto es que la vascularización, y por lo tanto el proceso de curación puede ser acelerado.

Los vasos sanguíneos son una posición ideal para suministrar un producto medicinal El descubrimiento de estas MPC y sus propiedades para formar nuevos vasos sanguíneos proporciona una oportunidad para suministrar a través de un período prolongado de productos medicinales.

Las MPC se pueden modificar para portar varios materiales genéticos. El material genético pueden ser aquel que codifica una variedad de proteínas que incluyen agentes anticancerosos, hormonas tales como por ejemplo insulina, factores de crecimiento enzimas citoquinas, y similares.

Como alternativa, las MPC se pueden modificar para expresar un promotor de la formación de vaso sanguíneo que puede ayudar en la inducción por MPC de la formación de vaso sanguíneo, y ayudar además con el mantenimiento de una buena vascularización del tejido en cuestión.

Para propósitos de tratamiento de una enfermedad cardíaca vascular las MPC se pueden entregar al miocardio por inyección intracoronaria directa (o vaso de injerto) usando métodos basados en catéter percutáneo estándar bajo guía fluoroscópica, en una cantidad suficiente para la terapia eficaz. Esto puede ser en el intervalo de entre 10^4 a 10^7 MPC. La inyección se debe efectuar profundamente en el lumen (aproximadamente 1 cm dentro del lumen arterial) de las arterias coronarias (o vaso de injerto), y preferentemente se realiza en ambas arterias coronarias. Al inyectar el material directamente en el lumen de la arteria coronaria por catéteres coronarios, es posible orientar las MPC más bien eficazmente y minimizar la pérdida durante la inyección. Cualquier variedad de catéter de perfusión coronaria se puede usar.

Para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica, una enfermedad caracterizada por el suministro insuficiente de sangre a las piernas una MPC se puede entregar por un catéter que se insertará en la porción proximal de la arteria femoral o arterias, efectuando de ese modo la migración de las MPC a los capilares de los músculos esqueléticos que reciben el flujo sanguíneo de las arterias femorales. Esto proporcionará un estímulo angiogénico que resultará en la neovascularización y o reparación de vasos sanguíneos en el músculo esquelético de las piernas.

Las composiciones o productos de la invención para usar con la enfermedad vascular coronaria o periférica se pueden convenientemente proporcionar en la forma de formulaciones adecuadas para la administración intracoronaria. Un formato de administración adecuado se puede determinar mejor por un practicante médico para cada paciente individualmente. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados y su formulación se describen en los tratados estándar de formulaciones, por ejemplo, Remington's Pharmaceuticals Sciences de E. W. Martin. Las Composiciones pueden formularse en solución a pH neutro, por ejemplo, aproximadamente de pH 6.5 a aproximadamente pH 8.5, con mayor preferencia de aproximadamente pH 7 a 8, con un excipiente para llevar la solución a aproximadamente isotonicidad, por ejemplo, 4.5% manitol o 0.9% cloruro sódico, pH tamponado con soluciones tampón conocidas en la técnica, tal como fosfato sódico, que son vistas generalmente como seguras. La isotonicidad deseada puede lograrse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol, polioles (tales como manitol y sorbitol), u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro sódico es particularmente preferido para los tampones que contienen iones de sodio. Si se desea, las soluciones de las composiciones anteriores se pueden preparar además para mejorar la vida útil y la estabilidad. Las composiciones terapéuticamente útiles de la invención se preparan mezclando los ingredientes siguiendo procedimientos generalmente aceptados. Por ejemplo, los componentes seleccionados se pueden mezclar para producir una mezcla concentrada que se puede ajustar después a la concentración final y viscosidad por la adición de agua y/o un tampón para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

Para el uso por el médico, las composiciones se proporcionaran en forma de dosificación que contiene una cantidad de composición de MPC que será eficaz para inducir la angiogénesis en una o múltiples dosis en un nivel seleccionado. Como se reconocerá por aquellos en el campo, una cantidad eficaz de agente terapéutico variará con muchos factores que incluyen la edad y peso del paciente, la condición física del paciente, y el nivel de la angiogénesis a obtener, y otros factores.

La dosis eficaz de los medicamentos o las células de esta invención estará típicamente en el intervalo de al menos aproximadamente 10^4 MPC, preferentemente aproximadamente 10^6MPC, y con mayor preferencia aproximadamente 10^7 MPC. Como se señaló, la dosis exacta a administrar se determina por el médico a cargo, pero está preferentemente en 1 ml de solución salina regulada con fosfato.

El modo de administración actualmente preferido en el caso de la enfermedad del corazón es por inyección intracoronaria a una o ambas arterias coronarias (o a uno o más injertos de vena safena o arteria mamaria interna) usando un catéter coronario adecuado. El modo de administración actualmente preferido en el caso de la enfermedad vascular periférica es por inyección en la porción proximal de la arteria femoral o las arterias usando un catéter arterial adecuado.

Preferentemente, las MPC se coadministran con un compuesto promotor de vaso sanguíneo. Estos podrían incluir factores de crecimiento de fibroblastos ácido y básico, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformador α y β, factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de necrosis tumoral α, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento similar a la insulina, eritropoyetina, factor de estimulación de colonias, macrófagos-CSF, GM-CSF y oxido nítrico sintasa.

Para mejorar además la angiogénesis una célula progenitora endotelial modificada se puede usar para expresar un mitógeno celular endotelial. Además, un mitógeno celular perivascular o un ácido nucleico que codifica un mitógeno celular perivascular se puede además administrar.

Las MPC se pueden inyectar además por vía intramuscular adyacente al sitio del vaso sanguíneo dañado.

La composición puede incluir una aplicación tópica para las heridas y por lo tanto se puede incorporar en cremas, lociones y similares.

Las MPC se pueden entregar en una composición que toma la forma de una preparación inyectable que contiene el portador farmacéuticamente aceptable tal como solución salina, por ejemplo, según sea necesario. La preparación puede requerir la esterilización y puede incluir estabilizador para mantener una distribución uniforme de las células. La dosis final de las MPC está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10^4-10^7 células.

La presente invención se relaciona con células precursoras mesenquimales, particularmente aquellas que pueden estar presentes en el compartimento perivascular de tejido vascularizado. Tales células mesenquimales se pueden identificar por la presencia del marcador de superficie 3G5, y quizás además o por separado por otros marcadores tempranos de desarrollo tales como CD146 (MUC18), VCAM-1 y STRO1.

Las células precursoras son células tempranas que están sustancialmente en una etapa de pre-expansión de desarrollo. Estas son células que aún tienen que diferenciarse a células totalmente comprometidas, sin embargo, no necesitan ser células madre en un sentido estricto, ya que son necesariamente capaces de diferenciarse en todos los tipos de células. Las células precursoras parcialmente diferenciadas tienen un beneficio en que tienen un mayor potencial proliferativo que las células madre.

Las células precursoras presentes están un poco diferenciadas en ese sentido se comprometen a tejido mesenquimal, en lugar de, por ejemplo, a tejidos hematopoyéticos. Es evidente a partir de los datos producidos que faltan los marcadores asociados con las células hematopoyéticas de las MPC que se han aislado tales como CD34, y, además, su potencial de diferenciación no se extiende a las líneas hematopoyéticas. Además no necesitan necesariamente tener el potencial para diferenciarse en todo tipo de célula mesenquimal, más bien, pueden ser capaces de diferenciarse en uno, dos, tres o más de células tipos.

Se prevé que estas células precursoras cosechadas de los tejidos en cuestión pueden ser útiles para regenerar tejido para los tipos de células de las que se han originado. Por lo tanto las células precursoras aisladas de corazón se pueden reintroducir para regenerar el tejido del corazón, sin embargo, su necesidad potencial no es tan limitada, las células precursoras aisladas a partir de un tipo de tejido pueden ser útiles para regenerar tejido en otro tipo de tejido. El microambiente en el que una célula indiferenciada se encuentra es conocido por ejercer una influencia en la ruta de diferenciación y por lo tanto la necesidad de reintroducción no es necesariamente específica de tejido.

Los datos presentados muestran que las MPC se han cosechado y reintroducido después para producir hueso y médula ósea y dentina y pulpa, respectivamente, adicionalmente arteriolas, estructuras similar a cordón, se han producido después de la expansión ex vivo de las MPC aisladas.

Se prevé que una amplia variedad de células se pueden producir basado en la expresión génica de marcadores característicos para ciertos tipos de células. Se prevé que por lo tanto bajo condiciones de cultivo adecuadas, la variedad de tipos de células que se pueden generar a partir de las MPC perivasculares de la presente invención incluyen pero sin limitarse a lo siguiente, células de osteoblasto, odontoblasto, que producen dentina, condrocito, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma de médula, osteoclasto y estroma hematopoyético de apoyo, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, vascular, epitelial, glial, neuronal, astrocito o oligodendrocito.

Uno de los beneficios del descubrimiento que las MPC se pueden aislar a partir de células perivasculares es que esta expande en gran medida la variedad de fuente de tejidos de la que se pueden aislar o enriquecer las MPC, y no más hay una restricción eficaz sobre la fuente de MPC a la médula ósea . Los tejidos a partir de los que estas MPC se han aislado en las ejemplificaciones descritas en la presente descripción son la médula ósea humana, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel. Adicionalmente la tinción in situ y estudios histológicos han identificado que las MPC están presentes en el compartimento perivascular de bazo, páncreas, cerebro, riñón , hígado y corazón. Dado esta amplia y diversa variedad de tipos de tejidos donde las MPC perivasculares están presentes, se propone que MPC estará además presente a partir de una variedad aún más amplia de tejido que pueden incluir, tejido adiposo, diente, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón, y músculo esquelético.

Estas células precursoras descritas en la presente descripción se distinguen de otras MPC conocidas en que son positivas para 3G5 o quizás que portan otros marcadores perivasculares. Se pueden aislar por enriquecimiento de un marcador de superficie temprano de desarrollo presente en las células perivasculares, particularmente, la presencia de uno o más de CD146 (MUC18), VCAM-1 y alternativamente o adicionalmente expresión de alto nivel del marcador reconocido por el anticuerpo monoclonal STRO-1. Como alternativa o adicionalmente el enriquecimiento se puede llevar a cabo usando 3G5.

Los marcadores asociados con células perivasculares también pueden estar presentes en las MPC, por ejemplo alfa actina de músculo liso (αSMA).

Otros marcadores temprano de desarrollo asociados con MPC también pueden estar presentes. Estos pueden incluir pero sin limitarse necesariamente al grupo que consiste de THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD61, beta integrina 5, 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, STRO1bri, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R (STRO-2). La expresión positiva de uno o más de estos marcadores se puede usar en métodos de enriquecimiento para las MPC a partir del tejido de origen.

Las MPC de la presente invención se pueden caracterizar además por la ausencia de marcadores presentes en el tejido diferenciado, y el enriquecimiento se puede basar en la ausencia de tales marcadores.

Del mismo modo, se prefiere que las poblaciones de células enriquecidas no sean de origen hematopoyético y por lo tanto se prefiere que estas células no estén presentes. Los marcadores característicamente identificados como no presentes incluyen pero sin limitarse a CD34, CD45 y glicoforina A. Otros marcadores adicionales para este propósito pueden incluir CD20 y CD19 (marcadores de linfocitos B), CD117 (oncoproteína c-kit) presente en las células madre hemopoyéticas y angioblastos, CD14 (macrófagos), CD3 y CD4 (células T).

Se puede preferir usar las MPC perivasculares relativamente quiescentes, directamente enriquecidas o aisladas. Como alternativa se ha descubierto que la expansión de la población enriquecida se puede llevar a cabo y tener el efecto beneficioso de lo que resulta en un número mucho mayor de células. El efecto de la expansión de la mezcla directamente enriquecida de células es, sin embargo, que ocurrirá alguna diferenciación de las MPC iniciales. La expansión durante un período de 5 semanas puede resultar en un aumento de ^{3} veces. Otros períodos pueden ser elegidos para ampliar la población de entre 10^2 a 10^5 veces. Este potencial se puede dirigir cultivándolos en medio que contiene citoquinas y otros factores que dirigen la diferenciación a un tipo de tejido particular, por ejemplo PDGF y VEGF que forman cordones alfa del músculo liso. Estos se pueden entonces introducir en un tejido con, por ejemplo, un insulto para ayudar con la reparación . Como alternativa, se puede desear después de la expansión volver a seleccionar las células sobre la base de un marcador temprano de desarrollo, eso puede ser STRO-1^{bri} para aumentar la proporción de las MPC en la población

Se ha encontrado que una población esencialmente pura de las MPC no es necesaria para proporcionar la formación de células diferenciadas para formar estructuras de tejido deseadas. La población enriquecida puede tener niveles de MPC de más de aproximadamente 0.001, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 o 1 % o superior como una proporción del número total de células en la población enriquecida. Este orden de enriquecimiento se puede lograr por el uso de un único marcador para la selección de la población enriquecida de MPC. Esta es particularmente de esa manera donde el tejido de origen tiene un nivel inherentemente alto de MPC perivasculares. Se ha encontrado que considerablemente más 3G5 pos MPC están presentes en cierto tejido, por ejemplo pulpa dental, que en la médula ósea Por lo tanto en la médula ósea las MPC positivas a 3G5 constituyen aproximadamente el 15 % de MPC basado en células formadoras de colonias $STR1^{bri}$, mientras en la pulpa dental que se encuentran constituyen 65 % y más de 90% en los tejidos grasos y piel. La expansión de la población y re-enriquecimiento después usando un único marcador coung resulta en niveles superiores de MPC, quizás los niveles más de aproximadamente 0.1, 0.5, 1, 2, 5 o 10 %.

Mientras se considera conveniente que una proporción sustancial y preferentemente una mayoría de células precursoras son MPC perivasculares, no se considera esencial para ciertas formas de la invención para las MPC perivasculares que sean la única forma de células precursoras. Otras formas de precursores pueden también estar presentes sin interferir indebidamente con la capacidad de las MPC perivasculares a someterse a la diferenciación deseada. Otras formas de ese tipo pueden incluir precursores hematopoyéticos o las MPC no perivasculares, quizás que sean negativas para 3G5.

Ciertas formas de la presente invención proporcionan MPC perivasculares sustancialmente libres de células endoteliales. En este contexto sustancialmente libre se puede considerar que sea menos de aproximadamente 5, 2, 1, o 0.1 % de células endoteliales. Como alternativa, el contexto puede ser la evaluación que la población enriquecida es el Factor von Willebrand negativo.

Se entenderá que el reconocimiento de las células que portan los marcadores de superficie celular que forman la base de la separación se puede efectuar por un número de diferentes métodos, sin embargo, todos estos métodos se basan en la unión de un agente de unión al marcador que se trata seguido por una separación de aquellos que exhiben unión, siendo ya sea unión de alto nivel, o bajo nivel de unión o sin unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpo, siendo preferentemente anticuerpos monoclonales o basado en anticuerpos monoclonales debido a la especificidad de estos últimos agentes. Los anticuerpos se pueden usar para ambas etapas, sin embargo otros agentes se pueden usar además, por lo tanto los ligandos para estos marcadores se pueden emplear además para enriquecer de células portadoras de ellos, o que carecen de ellos.

Los anticuerpos se pueden unir a un soporte sólido para permitir una separación en bruto. Las técnicas de separación deben maximizar la retención de la viabilidad de la fracción que se recoge. Varias técnicas de diferente eficacia se pueden emplear para obtener relativamente separaciones de crudo La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, citotoxicidad asociada, facilidad y rapidez de ejecución, y necesidad de equipamiento sofisticado y/o habilidad técnica. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitarse a, separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad y "panning" con anticuerpo unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan la separación precisa incluyen, pero sin limitarse a FACS.

Es en el contexto de estos métodos que una célula puede ser ya sea negativa o positiva. Las células positivas pueden ser de expresión baja (lo) o un hi (brigth) dependiendo del grado para el cual el marcador está presente sobre la superficie celular, los términos relacionados con la intensidad de fluorescencia u otro color usado en el proceso de clasificación por color de las células. La distinción de lo y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población celular particular que se clasifica.

El método de enriquecimiento de las MPC perivasculares puede incluir la etapa de realizar una primera mezcla de células parcialmente enriquecida enriqueciendo para la expresión de uno de los primeros marcadores, y después la etapa de enriquecer para la expresión del segundo de los marcadores de la mezcla de células parcialmente enriquecida.

Se prefiere que el método comprenda una primera etapa que sea una etapa de clasificación en fase sólida, basado en el reconocimiento de uno o más de los marcadores. La etapa de clasificación en fase sólida de la modalidad ilustrada utiliza MACS que reconoce la expresión el alto nivel de STRO-1. Esto da después una mezcla enriquecida con un mayor número de células que si se usó una clasificación de alta precisión como una primera etapa. Si, por ejemplo, se usó por primera vez el FACS, muchas de las células precursoras se rechazan debido a su asociación con otras células. Una segunda etapa de clasificación puede después seguir usando un método de separación preciso. Esta segunda etapa de clasificación puede implicar el uso de dos o más marcadores. Por lo tanto, en la modalidad ilustrada se usa FACS de dos colores para reconocer la expresión de alto nivel del antígeno reconocido por STRO-1 así como la expresión de CD146. Las ventanas usadas para la clasificación en la segunda etapa se pueden ajustar de manera más ventajosa porque la población de partida está ya parcialmente enriquecida

El método de enriquecimiento de las MPC perivasculares también puede incluir la cosecha de una fuente de células madre antes de la primera etapa de enriquecimiento usando técnicas conocidas. Por lo tanto el tejido se eliminará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido fuente se separarán después en una llamada suspensión celular individual. Esta separación se puede lograr por medios físicos y o enzimáticos .

La fuente preferida de tales MPC perivasculares es humana, sin embargo, se espera que la invención sea aplicable también a los animales, y éstos pueden incluir animales agrícolas tales como vacas, ovejas, cerdos y similares, animales domésticos tales como perros, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, hámster y conejos o animales que se pueden usar para el deporte, como los caballos.

Se describe también en la presente descripción un método de generación de tejido en un mamífero que comprende la etapa de enriquecer una población de células precursoras como en el uso del primer aspecto de la invención, e introducir la población enriquecida en el mamífero, y permitir a la población enriquecida generar el tejido en el mamífero.

Otro uso potencial de las células enriquecidas de la presente invención es como un medio de terapia génica, por la introducción de ácidos nucleicos exógenos para la expresión de sustancias terapéuticas en los tipos de tejidos en cuestión.

En el contexto de la presente invención el término célula aislada puede significar que las MPC perivasculares comprenden al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 95 % del total de células de la población en la cual están presentes.

EJEMPLO 1 Aislamiento y expansión de células precursoras

Nichos de células de médula identificados en un número de diferentes tejidos adultos que incluyen piel, folículos pilosos, médula ósea, intestino, cerebro, páncreas y, más recientemente, pulpa dental, a menudo son sitios altamente vascularizados. [1] El mantenimiento y regulación de las poblaciones de células madre normalmente quiescentes está estrechamente controlado por el microambiente local de acuerdo a los requisitos del tejido huésped [2,3] Tanto los tejidos conectivos de apoyo de la médula ósea como la pulpa dental contienen poblaciones de células madre del estroma con potenciales de proliferación altos capaces de regenerar sus respectivos microambientes con notable fidelidad, que incluyen las estructuras mineralizadas circundantes de hueso y dentina. [4,5] En el organismo después del parto, existe estroma de la médula ósea como un tejido altamente vascularizado, tejido suelto que apoya y regula la hematopoyesis. [6-8]A la vez cuando muchos tejidos han perdido o disminuido su capacidad para regenerarse, la médula ósea adulta conserva una capacidad de renovación continua del tejido parenquimatoso hematopoyético y es responsable de la remodelación de las superficies óseas adyacentes [9,10] En contraste, la cámara interna de la pulpa de los dientes está compuesta de un tejido fibroso compacto, no hematopoyético, infiltrado por una red microvascular, que se sepulta por dentina mineralizada. [11-13] A continuación de la maduración del diente, la pulpa dental se convierte en relativamente estática, actuando sólo en una capacidad reparadora en respuesta a una matriz de dentina comprometida causado por insultos tales como caries o traumatismos mecánicos .

Los precursores de osteoblastos funcionales (BMSSC: células madre del estroma de la médula ósea) y odontoblastos (DPSC: células madre de la pulpa dental), ambas formas de MPC identificadas por su tejido de origen, se identificaron inicialmente por su capacidad para formar grupos de células clonogénicas in vitro, una función común entre diferentes poblaciones de células madre.[4,14-18] La progenie de BMSSC y DPSC expandidas *ex vivo* comparte un perfil de expresión génica similar para una variedad de reguladores transcripcionales, proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento/receptores, moléculas de adhesión celular, y algunos, pero no todos los marcadores de linaje característicos de los fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso y osteoblastos.[4,19] Sin embargo, estudios previos han documentado que las colonias BMSSC individuales demuestran diferencias marcadas en sus velocidades de proliferación *in vitro* y potenciales de desarrollo *in vivo*.[5,14,20] Similar a estos descubrimientos, recientemente hemos observado niveles comparables de heterogeneidad en el crecimiento y capacidad de desarrollo de las diferentes colonias DPSC.[21] Juntos, estos estudios infieren un arreglo jerárquico de células precursoras del estroma que residen en la médula ósea y pulpa dental, encabezado por una población pequeña de células madre pluri-potenciales de proliferación que dan lugar a poblaciones celulares progenitoras comprometidas bi- y uni-potenciales. [22]

A pesar de nuestro amplio conocimiento sobre las propiedades de BMSSC y DPSC cultivadas, todavía no sabemos si sus características *in vitro* son un retrato preciso de sus verdaderos patrones de expresión génica y potenciales de desarrollo *in situ.* Adicionalmente, no se conoce formalmente si todas las células formadoras de colonias en cada tejido se derivan de una mezcla de células madre pluri-potentes o si surgen de progenitores comprometidos pertenecientes a distintos linajes. Existe también una falta de información con respecto a la localización anatómica precisa de BMSSC y DPSC en sus respectivos tejidos. Esto se atribuye principalmente a la poca frecuencia de las células madre y la ausencia de marcadores específicos que identifican diferentes etapas de desarrollo durante la osteogénesis y odontogénesis, particularmente para subpoblaciones primitivas. Se ha planteado la hipótesis de que previamente un posible nicho de precursores de osteoblastos y odontoblastos puede ser las redes de microvasculatura de la médula ósea y pulpa dental, respectivamente. [23,24]

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de tejido

Las células mononucleares de la médula ósea derivadas de la cresta ilíaca (BMMNC), se obtuvieron de voluntarios adultos humanos normales bajo las directrices establecidas por el Comité de Ética Humana del Hospital Royal Adelaide. Los terceros molares impactados de humanos normales se recogieron de adultos jóvenes de la Investigación Clínica Dental de la Universidad de Adelaide bajo las directrices aprobadas establecidas por el Comité de Ética Humana de la Universidad de Adelaide, respectivamente. Descartada la piel de espesor total y el tejido adiposo periférico se obtuvieron a partir de procedimientos de cirugía plástica de rutina del Laboratorio de Ingeniería Celular de la Piel, bajo las directrices establecidas por el Comité de Ética Humana del Hospital Royal Adelaide. El tejido de la pulpa se separó de la corona y raíz como se describió anteriormente [4] Suspensiones celulares individuales de pulpa dental, piel y tejido adiposo se prepararon por digestión enzimática en una solución 3 mg/ml de colagenasa de tipo I (Worthington Biochem , Freehold , NJ) y 4 mg/ml de dispasa (Boehringer Mannheim , GmbH , Alemania) durante una a tres horas a 37℃. Las suspensiones celu lares individuales se obtuvieron pasando las células a través de un filtro de 70 µm (Falcon, BD Labware, Franklin Lakes, NJ). Las preparaciones celulares (0.01 a 1 x 10^5 pocillo) de médula ósea, pulpa dental, piel y tejido adiposo se usaron después para ya sea, inmunoselección, extracción de ARN, o cultivo directo en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) como se describe más abajo.

Otras muestras de tejido humano (cerebro, hígado, corazón, riñón, pulmón, bazo, timo, ganglios linfáticos, páncreas, piel) se obtuvieron de las autopsias llevadas a cabo en el Hospital Royal Adelaide durante los exámenes patológicos de rutina bajo directrices aprobadas establecidas por el Comité de Ética Humana del Hospital Royal Adelaide. Las muestras pequeñas de aproximadamente 0.5 cm^2 de cada tipo de tejido se colocaron en criomoldes Tek de tejido 25 mm x 20 mm x 5 mm (Laboratorios Miles, Naperville, IL) y embebieron con medio compuesto O.C.T (Laboratorios Miles) por inmersión en un vaso de vidrio pyrex con 150 ml a 200 ml de pentano (BDH Chemicals, Poole, Inglaterra) pre-enfriado por suspensión de un vaso de vidrio en un baño de nitrógeno líquido. El isopentano se ha enfriado cuando el fondo del vaso es de color blanco. Las secciones congeladas inmediatamente se almacenaron a -80℃. Las secciones congeladas de tejido nervios o y muscular se obtuvieron del Departamento de Histopatología del I.M.V.S, Australia del Sur y secciones de prepucio se obtuvieron del Departamento del I.M.V.S., Inmunología, Australia del Sur. Las secciones del fijado en formalina, extremidad fetal humana embebida en parafina (52 días) se proporcionaron amablemente por el Dr. T. J. Khong del Departamento Histopatología, del Hospital de Niños y Mujeres, Adelaide, Australia del Sur.

Ensayo de eficacia de colonia y cultivo

Suspensiones celulares individuales se sembraron a bajas densidades de sembrado (entre 1,000 y 10,000 células por pocillo triplicados en placas de seis pocillos) para evaluar la eficacia de formación de colonias de diferentes fracciones de células inmunoseleccionadas. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificación alfa suplementado con 20% suero fetal de ternera, 2mM L-glutamina, 100 µM L-ascorbato-2-fosfato, 100 U/ml penicilina y 10 µg/ml estreptomicina a 37℃ en 5% CO_2. En el día 14 los cultivos se fijaron con 4% de formalina, y después se tiñeron con 0.1% azul de toluidina. Agregados de igual a o mayor que cincuenta células se clasificaron como colonias clonogénicas equivalentes a unidades formadoras de colonias-fibroblásticas (UFC-F).

Clasificación de células activadas por magnestismo (MACS)

Este procedimiento es una modificación de aquel descrito en otro documento.[25] En resumen, aproximadamente 1 x 10^8 BMMNC se incubaron con sobrenadante STRO-1 bri (anti-humano murino) BMSSCs, IgM)[29] (1/2) durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS/5% de FBS y se resuspendieron en una dilución 1/50 de anti-IgM ratón en carnero biotinilada (µ-cadena específica; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) durante 45 minutos en hielo. Después de lavar, las células se incubaron con microglóbulos de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, F.R.G.) durante 15 minutos en hielo, se separaron después en una columna magnética Mini MACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

Células aisladas con STRO-bri por MACS se incubaron con un conjugado de estreptavidina-FITC (1/50; CALTAG Laboratories) durante 20 minutos en hielo se lavaron después con PBS/5% FBS. La clasificación de células activadas por fluorescencia de único-color (FACS) se realizó usando un citómetro de flujo FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, Sunnyvale,CA). El análisis por FACS-doble color se logró incubando las BMMNCs STRO-1^{bri} aisladas por MACS con niveles saturantes (1:1) de sobrenadante del anticuerpo CC9 (anti-CD146/MUC-18/Mel-CAM humano en ratón, IgG_{2a}, Dr. Stan Gronthos) durante una hora en hielo. Después de lavar con PBS/5% FBS, las células se incubaron con un segundo marcador de anticuerpo conjugado anti- IgG_2a(γ-cadena específica) de ratón en carnero con ficoeritrina (PE) (1/50, CALTAG Laboratories) durante 20 minutos en hielo. Las células se clasificaron después usando la unidad de deposición celular automatizada (ACDU) de un citómetro de flujo FACStar^{PLUS}. Ensayo de dilución limitante: sembrado 1, 2, 3 4, 5, & 10 células por pocillo, 24 réplicas, cultivadas en medio carente de suero por 10 días como previamente descrito[26]. Igualmente, BMMNCs sin fraccionar preparadas frescas se incubaron con anticuerpos CC9 (IgG_{2a}) y 3G5 (IgM) o anticuerpos control negativo coincidentes en isotipo durante una hora en hielo. Después de lavar con PBS/5% FBS, las células se incubaron con un segundo marcador de anticuerpos conjugados anti-IgG_{2a}(γ-cadena específica) e IgM (1/50; CALTAG Laboratories) de ratón en carnero con ficoeritrina (PE) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con PBS/%5 FBS antes de que se analizaran usando un citómetro de flujo FACStar^{PLUS}. La reactividad positiva para cada anticuerpo se definió como el nivel de fluorescencia mayor que 99% de los anticuerpos controles coincidentes en isotipo.

Análisis citométrico de flujo

Suspensiones celulares individuales de MPC médula ósea expandida ex vivo se prepararon con tratamiento tripsina/EDTA se incubaron después con sobrenadante de STR-1 puro o anticuerpos que identifican marcadores asociados a diferentes líneas celulares (10 µg/ml) durante una hora en hielo. Las células se lavaron después con PBS/5% FBS incubadas después ya sea con un anti-IgM murino en carnero-ficoeritrina (1/50, SouthernBiotechnologies), o anti-IgG de conejo o murino en carnero-ficoeritrina (Caltag Laboratories). Para los anticuerpos que identifican los antígenos intracelulares, las preparaciones de células permeabilizaron la membrana celular antes de la tinción de los marcadores intracelulares. Los anticuerpos controles coincidentes en isotipo se trataron bajo condiciones idénticas. Los análisis por citometría de flujo se realizaron usando un instrumento COULTER EPICS. Los gráficos de puntos representan 5,000 eventos en modo de lista que indican el

nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador celular de linaje con referencia a los anticuerpos control negativo coincidentes en isotipo.

Inmunhistoquímica

Secciones de tejidos humanos (µm) se desparafinaron en xileno y rehidrataron a través de etanol graduado en PBS. Secciones de tejido congeladas (µm) y preparaciones de citospina se fijaron con acetona fría a -20ºC durante 15 minutos y luego se lavaron en PBS. Las muestras se trataron posteriormente con PBS que contiene 1.5 % de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos, después de lavadas se bloquearon con 5% de suero de carnero no inmune durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Anticuerpos usados: Controles de ratón (IgG_1 & IgG_{2a}) (Caltag, Burlingame, CA); control de conejo (Ig), 1A4 (anti-α actina de músculo liso, IgG_1), 2F11 (anti-neurofilamento, IgG_1), F8/86 (anti-Factor von Willebrand murino, IgG_1) (Dako, Carpinteria, CA); STRO-1; CC9 (anti-CD146); LF-151 (anti-dentinsialoproteina humana en conejo; Dr. L. Fisher, NIDCR/NIH, MD). Diluciones de trabajos: suero de conejo (1/500), sobrenadantes del monoclonal (1/2) y anticuerpos purificados(10 µg/ml). La tinción simple se realizó incubando las muestras con el anticuerpo secundario adecuado, anti-IgM, IgG_1, IgG_{2a} de ratón en carnero biotinilada o anti-conejo en carnero biotinilada durante una hora a temperatura ambiente (Caltag Laboratories). El complejo avidina-peroxidasa y sustrato se añadieron después, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (estuche estándar Vectastain ABC, Vector Laboratories). Las muestras se contrastaron con hematoxilina y montaron en medio acuoso. El marcaje de doble fluorescencia se logró añadiendo los anticuerpos secundarios, anti-IgM de ratón en carnero-Rojo Texas y anti-IgG-FITC (CALTAG Laboratories),durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las muestras se montaron en medio de montaje de fluorescencia VECTASHIELD.

Selección de perlas inmunomagnéticas

Suspensiones celulares individuales de tejido de pulpa dental se incubaron con anticuerpos reactivos a STRO-1 (1/2), CD146 (1/2), o 3G5 (1/2) durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS/1%BSA incubaron después ya sea con anti-IgG de ratón en oveja-conjugado o anti-IgM de ratón en rata-conjugado con Dynaperlas magnéticas (4 perlas por célula: Dynal, Oslo, Noruega) durante 40 minutos en un mezclador rotatorio a 4ºC. Las células que se unen a las perlas se eliminaron usando el concentrador de partículas magnéticas MPC-1 (Dynal) siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes.

Ensayo de Matrigel-Arteriola

Suspensiones celulares individuales de MPC STRO-1^{bright} de médula ósea expandida ex vivo se prepararon con tratamiento tripsina/EDTA sembraron después en placas de 48-pocillos que contienen 200µl de matrigel. Las MPC STRO-1^{bright} se sembraron en 20,000 células por pocillo en medio libre de suero (Gronthos y otros 2003) suplementado con los factores de crecimiento PDGF, EGF, VEGF en 10ng/ml. Después de 24 horas de cultivo a 37ºC en 5% CO_2, los pocillos se lavaron después se fijaron con 4% de paraformaldehído. Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron posteriormente para alfa-actina de músculo liso identificada con un anticuerpo anti-IgG murino en carnero con peroxidasa de rábano picante/estuche Vectatinción como se describió anteriormente.

Diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de MPC in vitro

Suspensiones celulares individuales de MPC derivada de adiposo expandido ex vivo se cultivaron en αMEM suplementado con 10% de FCS, 100 µM de L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona 10^{-7} M y 3 mM de fosfato inorgánico mostrado anteriormente para inducir MPC de médula ósea que forma in vitro una matriz ósea mineralizada (Gronthos y otros, 2003). Los depósitos minerales se identificaron mediante tinción de von Kossa positiva. La adipogénesis se indujo en presencia de 0.5 mM de metillisobutilmetilxantina, 0.5 µM de hidrocortisona, y 60 µM de indometacina como se describió anteriormente (Gronthos y otros 2003). Se usó la tinción con aceite rojo O para identificar las células de grasa cargadas de lípidos. La diferenciación condrogénica se evaluó en cultivos de agregados tratados con 10 ng/ml de TGF-β3 como según descrito (Pittenger y otros, 1999)

Estudios de trasplante In vivo

Aproximadamente $5.0x10^6$ *ex vivo* las células ampliadas derivadas ya sea de BMSSC STRO-1^{bri}/$CD146^+$ o DPSC $CD146^+$ se mezclaron con 40 mg de cerámica en polvo de hidroxiapatito/fosfato tricálcico (HA/FTC) (Zimmer Inc, Warsaw, IN) y después subcutáneamente trasplantadas en la superficie dorsal de 5 ratones beige inmunocomprometidos de 10-semanas de edad (NIH-bg-nu-xid, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) como se describió anteriormente.[(4)]Estos procedimientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones de un protocolo animal aprobado (NIDCR #00-113).

Reacción en cadena de la polimerasa -transcripción inversa.

El ARN total se preparó a partir de BMMNCs clasificadas por STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$, y controles celulares (cultivos primarios de BMSSC crecidos en presencia de 10^{-7} M dexametasona durante tres semanas) usando ARN STAT-60 (TEL-TEST Inc. Friendswood TX). La síntesis de primera-cadena de ADNc se realizó con un estuche de síntesis de primera-cadena de ADNc (GIBCO BRL, Life Technologies) usando un cebador oligo-dT. Primero la cadena de ADNc (2 µl) se añadió a 46 µl de una mezcla de reacción maestra PCR 1X (Roche Diagnostics, Gmbh Mannheim Alemania) y 10 pMol de cada conjunto de iniciador específico humano: CBFA1 (632bp, y tres variantes alternativas de empalme más pequeñas)[27]sentido 5'-CTATGGAGAGGACGCCACGCCTGG-3' [sec. con núm. de ident. 1], antisentido, 5'-CATAGCCATCGTAGCCTTGTCCT-3' [sec. con núm. de ident. 2]; osteocalcina (310bp)[4] sentido, 5'-CATGAGAGCCCTCACA-3' [sec. con núm. de ident. 3], antisentido, 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3' [sec. con núm. de ident. 4]; GAPDH (800bp)[4] sentido, 5'-AGCCGCATCTTCTTTTGCGTC-3' [sec. con núm. de ident. 5]; antisentido 5'-TCATATTTGGCAGGTTTTTCT-3' [sec. con núm. de ident. 6]. Las reacciones se incubaron en un ciclador térmico PCR Express Hybaid (Hybaid, Franklin, MA) a 95℃ por 2 minutos por 1 ciclo y después 94℃/(30 seg), 60℃/(30 seg), 72℃/(45 seg) por 35 ciclos, con una extensión final de 7 minutos a 72℃. A continuación de la amplificación, cada reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, y visualizó con tinción de bromuro de etidio.

RESULTADOS

BMSSC y DPSC expresan antígenos asociados vasculares STRO-1 y CD146 in vivo.

Demostramos anteriormente la eficacia de la clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), para aislar y enriquecer a todas las colonias clonogénicas detectables a partir de aspirados de médula ósea humana, basado en su alta expresión de antígeno STRO-1[25,26] Para caracterizar mejor las BMSSC incubamos las células aisladas por STRO-1^{bri} MACS con otro anticuerpo monoclonal, CC9,[28] que reconoce el antígeno de superficie celular CD146, conocido también como MUC-18, Mel-CAM y Sendo-1, que está presente en las células endoteliales y de músculo liso. Estos estudios determinaron que CC9, unió selectivamente la fracción que expresa STRO-1 bright (STRO-1^{BRT}) de la población STRO-1^{+} total mediante análisis de FACS-doble color (Figura 1A). Los ensayos de eficacia de clonación usando las estadísticas de distribución de Poisson, rindieron un aumento marcado de la incidencia de BMSSC (1 colonia por 5 STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$células sembradas) y lograron un enriquecimiento de 2 x 10^{3} veces la población de colonia clonogénica cuando comparada con la médula sin fraccionar (Figura 1B). Ninguna formación de colonia se pudo detectar en la fracción celular STRO-1^{BRT}/$CD146^{-}$ (datos no mostrados).

Las propiedades de dispersión de la luz de las células de médula STRO-1 ^{BRT}/$CD146^{+}$ fueron típicamente más largas y granulares que las células eritroides nucleadas y linfocitos-B que comprenden el volumen de la población STRO-1^{+}[29](Figura 1C-E). Las preparaciones de citospina de las células clasificadas por STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$ resultaron ser negativas en los marcadores asociados a eritroide (glicoforina-A) y leucocito (CD45) (datos no mostrados). La confirmación de que BMSSC representaron una población precursora osteogénica temprana se obtuvo mediante el análisis de RT-PCR de células altamente purificadas STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$aisladas por MACS/FACS, que fallaron para detectar los marcadores osteogénicos tempranos y tardíos, CBFA1 y osteocalcina, respectivamente (Figura 1F). Sin embargo, la progenie de BMSSC clasificadas por STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$ se encontraron que expresan tanto CBFA1 como osteocalcina, seguida la expansión *ex vivo*. Los estudios de inmunolocalización demostraron que el antígeno CD 146 se expresó predominantemente en las paredes de los vasos sanguíneos de las secciones de la médula ósea humana (Figura 1G). La localización tanto de STRO-1 como CD146 se limitó a grandes vasos sanguíneos en secciones congeladas de trépano médula ósea humana (Figura 1H).

Los protocolos de inmunoselección se usaron posteriormente para determinar si las DPSC humanas expresaron también STRO-1 y CD 146 *in situ*. El uso ya sea del análisis por MACS o FACS para aislar las DPSC fue restrictivo debido a la rareza de estas células (1 célula formadora de colonia por 2 x 10^{3} células sembradas) compuesto por el número limitado de células de la pulpa (aproximadamente 10^{5} células por muestra de pulpa) obtenido siguiendo el procedimiento. Para evitar esto, combinamos diversos tejidos de la pulpa obtenidos a partir de 3 a 4 terceros molares diferentes por experimento y empleamos la selección por perlas inmunomagnéticas en suspensiones de células individuales de tejido de la pulpa, basado en su expresión ya sea de los antígenos STRO-1 o CD146. La fracción STRO-1^{+} representó aproximadamente 6% de la población total de células de la pulpa. Los estudios comparativos demostraron que las tasas de crecimiento de las colonias individuales estuvieron inmutables en presencia de perlas magnéticas (datos no mostrados). Los ensayos de eficacia de colonias indicaron que la mayoría de las células formadoras de colonias derivadas de la pulpa dental (82%) se representaron en la menor fracción celular STRO-1^{+} igual que las BMSSC (Figura 2). La incidencia media de las DPSC en la fracción STRO-1 positiva (329 células formadoras de colonias por 10^{5} células sembradas ± 56 SE, n=3) fue seis veces mayor que las células de la pulpa sin fraccionar (55 células formadoras de colonias por 10^{5} células sembradas ± 14 SE, n=3). Usando una estrategia similar, se seleccionaron diferentes fracciones de células de la pulpa dental humana basado en su reactividad con el anticuerpo, CC9. Los ensayos de eficacia de colonias mostraron que una alta proporción (96%) de las

colonias clonogénicas derivadas de la pulpa dental estuvieron presentes además en la población $CD146^+$, usando la selección por perla inmunomagnética Dynal (Figura 2). La incidencia media de colonias por clonación en la fracción $CD146^+$ (296 células formadoras de colonias por 10^5 células sembradas ± 37 SE, n=3) fue siete veces mayor que células de la pulpa sin fraccionar (42 células formadoras de colonias por 10^5 células sembradas ± 9 SE, n=3).

Los estudios de inmunolocalización mostraron que la expresión de STRO-1 se limitó a las paredes de los vasos sanguíneos y el perineurio circundante a los haces nerviosos, pero no estuvo presente en la capa de odontoblastos maduros o tejido fibroso, en secciones congeladas de tejido de la pulpa dental humana (Figura 3A-B). Además, la co-localización de CD 146 con STRO-1 se detectó en las paredes celulares de los vasos sanguíneos externos, sin ninguna reactividad para el tejido fibroso circundante, capa de odontoblastos, y el perineurio del nervio (Figura 3C-D). Es importante destacar la expresión del marcador de diferenciación específico de los odontoblastos humanos, la dentinsialoproteína (DSP), se limitó a la capa externa de la pulpa que contiene los odontoblastos maduros (Figura 3E) y estuvo ausente en el tejido fibroso, haces nerviosos y vasos sanguíneos.

Expresión diferencial del marcador perivascular 3G5 en BMSSC y DPSC.

En el presente estudio, el análisis por citometría de flujo reveló que el antígeno de superficie celular, 3G5, fue altamente expresado en una gran proporción (54%) de las células hematopoyéticas de la médula (Figura 4A). Esta observación eliminó a 3G5 como un marcador candidato para aislar poblaciones purificadas de BMSSC directamente a partir de aspirados de médula humana. Adicionalmente, el análisis doble-FACS basado en la expresión de 3G5 y STRO-1 no fue posible ya que ambos anticuerpos compartían el mismo isotipo. Sin embargo, los ensayos de eficacia de colonia *in vitro* para diferentes subfracciones 3G5/CD146 clasificadas por FACS demostraron que sólo una proporción menor (14%) de colonias clonogénicas de médula ósea expresaron el antígeno de 3G5 en niveles bajos (Figura 4B). Por el contrario, una mayor proporción (63%) de DPSC clonogénicos (192 células formadoras de colonias por 10^5 células sembradas ± 18.4 SE n=3) estuvieron presentes en la fracción celular $3G5^+$ seguida la selección por perlas inmunomagnéticas (Figura 2). 3G5 demostró reactividad específica a los pericitos en las secciones congeladas de tejido de la pulpa dental humana (Figura 3F).

A continuación analizaron la expresión de los marcadores más específicos de células endoteliales (Factor von Willebrand) y las células musculares lisas/pericitos (α-actina de músculo liso) en las preparaciones de citospina usando BMSSC STRO-1^{BRT}/$CD146^+$ recién aisladas y DPSC que expresan $CD146^+$. Una gran proporción de BMSSC purificadas (67%), resultaron ser positivas para la α-actina de músculo liso (Figura 5A), pero carecieron de la expresión del Factor von Willebrand (Figura 5B). Del mismo modo, la mayoría de DPSC aisladas (85%) resultaron también expresar la α-actina de músculo liso, pero no el Factor de von Willebrand (Figura 5C, 5D). Las poblaciones purificadas de BMSSC STRO-1^{BRT}/$CD146^+$ y DPSC $CD146^+$ se expandieron posteriormente *in vitro* trasplantaron después en ratones inmunodeficientes para evaluar sus potenciales de desarrollo *in vivo*. La progenie de las BMSSC y DPSC cultivadas mostró distintas capacidades, capaz de regenerar la médula ósea y microambientes dental/pulpa, respectivamente (Figura 5E, F), y parece idéntica al potencial de desarrollo de las BMSSC y DPSC derivadas de múltiples colonias no seleccionadas (4).

DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona evidencia directa de que dos poblaciones de células madre mesenquimales, distintas en su ontogenia y potenciales de desarrollo, ambas están asociadas con la microvasculatura de sus respectivos tejidos.

Empleamos diferentes protocolos inmunoselección para demostrar que las BMSSC y DPSC pueden ser eficientemente recuperadas de aspirados de médula ósea y tejido de la pulpa digerido por enzima respectivamente, basados principalmente en su alta expresión del antígeno STRO-1. Este antígeno de superficie celular está presente en los precursores de varios tipos de células del estroma incluyendo, fibroblastos de médula, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, y células de músculo liso aisladas de la médula ósea fetal y de adulto humano.[29,32-34] Estudios previos involucraron a STRO-1 como un marcador de las poblaciones pre-osteogénicas, donde su expresión se pierde progresivamente después de la proliferación y diferenciación celular in vitro en osteoblastos maduros.[27,35,36] El antígeno STRO-1 resultó también estar presente en las paredes celulares externas de la médula ósea humana y vasos sanguíneos de la pulpa dental, de acuerdo con los estudios previos que localizaron a STRO-1 en los vasos sanguíneos grandes, pero no en capilares, de diferentes tejidos adultos tales como cerebro, intestino, corazón, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, músculo, timo.[6] Por lo tanto, STRO-1 parece ser un marcador temprano de diferentes poblaciones de células madre mesenquimales y deduce un posible nicho perivascular para las poblaciones de células madre *in situ.*

Para determinar si BMSSC y DPSC se asociaron directamente con los vasos sanguíneos se utilizó otro anticuerpo (CC9),[28] que reconoce el miembro de la superfamilia de inmunoglobulina, CD146 (MUC-18/Mel-CAM), conocido por estar presente en el músculo liso, endotelio, miofibroblastos y células de Schwann *in situ*, así como siendo un marcador para algunos neoplasmas humanos.[37] Es notable que, CD146 no se expresa por las células madre hematopoyéticas de la

médula ósea, ni sus progenitores. Aunque no se conoce la función precisa de CD146, se ha asociado con varios procesos celulares, incluyendo la adhesión celular, reorganización del citoesqueleto, forma celular, migración y proliferación a través de la señalización de la transmembrana.

Para diseccionar la población de BMSSC, las células de médula que expresan STRO-1^{BRT} se distinguieron además de células hematopoyéticas STRO-1^{+} (eritrocitos nucleados principalmente con glicoporina-A^{+}) basados en su expresión de CD146, usando análisis de doble-FACS. BMSSC humanas STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$ purificadas mostraron propiedades de dispersión de la luz características de las células granulares grandes. Nuestro estudio apoya los hallazgos de Van Vlasselaer y colegas (1994)[38] quien aisló las BMSSC parcialmente purificadas a partir de médula ósea murino después del tratamiento con 5-fluoracil (5-FU), e identificó esta población que tienen características de alta dispersión frontal y perpendicular de la luz. Curiosamente, las BMSSC murino resistente 5-FU recién aisladas resultaron además ser positivas para dos marcadores perivasculares Sab-1 y Sab-2.[38] Por el contrario, los estudios más recientes demostraron que cuando se cultivan las BMSSC *in vitro,* las poblaciones más primitivas muestran propiedades de baja dispersión perpendicular y frontal de la luz [39] y por lo tanto no pueden reflejar la verdadera morfología de BMSSC *in situ.* En el presente estudio, las BMSSC humanas clasificadas por STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$ perdieron la expresión de CBFA1 y osteocalcina que identifican poblaciones osteogénicas comprometidas de manera temprana y tardía , respectivamente,[40,41] indicando que las BMSSC presentan un fenotipo pre-osteogénico en los aspirados de médula ósea humana. Encontramos que una alta proporción de BMSSC STRO-1^{BRT}/$CD146^{+}$aisladas recientemente expresaron α -actina de músculo liso, pero no el marcador endotelial específico Factor von Willebrand, que proporciona evidencia directa de que esta población precursora primitiva muestra un fenotipo perivascular característico.

El presente estudio también demostró la eficacia del uso de la selección de perlas magnéticas para aislar y enriquecer las DPSC directamente del tejido de la pulpa dental humana basado en su expresión ya sea de STRO-1 o CD 146. La inmunolocalización de CD 146 pareció ser específica a la microvasculatura dentro de la pulpa dental. La co-localización tanto de STRO-1 como CD146 en las paredes exteriores de vaso sanguíneo grande en el tejido de pulpa dental, dió a entender que la mayoría de las DPSC surgen a partir de la microvasculatura. Sin embargo, ya que el anticuerpo de STRO-1 reacciona además con el perineurio en la pulpa dental y haces nerviosos periféricos (observaciones no publicadas), se requiere la investigación adicional para determinar el papel de este antígeno en el desarrollo de la célula neuronal.

Análogo a BMSSC las DPSC $CD146^{+}$ recién aisladas resultaron expresar α-actina de músculo liso, pero no el factor de von Willebrand Las DPSC demostraron además ser una población pre-odontogénica inmadura tanto por su localización distal de la superficie formadora de la dentina como por su pérdida de expresión de la sialoproteína de la dentina odontoblasto-específica humana (DSP), que se limita a la capa externa de la pulpa que contiene los odontoblastos diferenciados. Describimos anteriormente que *ex vivo* las DPSC humanas ampliadas no expresan la molécula precursora, dentinsialofosfoproteina (DSPP), *in vitro* cuando se cultivan bajo condiciones no inductoras.[4] Estudios similares mostraron que el ARNm de DSPP fue altamente expresado en el tejido odontoblasto/pulpa recién aislado, pero no se detectó en las células de la papila dental cultivadas que se derivan a partir de los incisivos de ratones.[43,44] Esto sólo ocurre cuando se inducen las DPSC, ya sea *in vitro*,[45] o por trasplante *in vivo* para formar una matriz ordenada de dentina que expresa DSPP.[4]

Estudios *in vitro* de BMSSC y DPSC expandidas *ex vivo* apoyan la idea de que sus progenies eran morfológicamente similares a las células perivasculares cultivadas que tienen una morfología fibroblástica bipolar, estelar o plana, en lugar de una apariencia tipo endotelial poligonal. Además, demostramos anteriormente que la progenie de las colonias derivadas de BMSSC y DPSC) exhiben tinción heterogénea tanto para CD146 como α-actina de músculo liso, pero carecen de la expresión de los marcadores endoteliales CD34 y el Factor de von Willebrand, *in vitro.*[4]

Las observaciones de que dos poblaciones de células madre mesenquimales diferentes, tales como BMSSC y DPSC se albergan en nichos perivasculares pueden tener implicaciones adicionales en la identificación de poblaciones de células madre en otros tejidos adultos. Hallazgos recientes identificaron células madre mesenquimales humanas multipotentes de "reserva" en tejidos conectivos del músculo esquelético, y dermis derivadas a partir de muestras fetales y adultos humanos.[56] Sin embargo, la ubicación exacta, potencial de desarrollo y ontogenia de estas células madre es todavía grandemente desconocido. En el presente estudio, la identificación de nichos de células madre mesenquimales de la médula ósea y pulpa de la dentina puede ayudar a dilucidar las) condiciones fundamentales necesarias para mantener y expandir selectivamente las poblaciones multi-potenciales primitivas *in vitro*, para dirigir sus potenciales de desarrollo *in vivo.*

EJEMPLO 2

MPC médula ósea adulta humana son distintas de las células precursoras del estroma, células madre hematopoyéticas y angioblastos por su alta expresión del antígeno STRO-1 y la pérdida de expresión de CD34

La médula ósea posnatal parece ser un concentrador de tipos de células madre residenciales y precursoras responsables de la formación de las células de la sangre (células madre hematopoyéticas), desarrollo endotelial (angioblastos), y diferenciación del tejido conectivo/estroma (células madre del estroma células precursoras del estroma/células madre del estroma de médula ósea/células madre mesenquimales). Un trabajo reciente de nuestro grupo (Gronthos y otros 2003; Shi y Gronthos 2003) tiene, por primera vez, células precursoras humanas mesenquimales de la médula ósea multipotenciales (MPC) purificadas y caracterizadas basado en su alta expresión del antígeno STRO-1 y por su co-expresión de los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, VCAM-1 (CD106) y MUC-18 (CD146). Los primeros estudios por Simmons y Torok-Storb (1991a y b), mostraron que las células precursoras del estroma STRO-1^+ derivadas de la médula ósea, con la capacidad de formar colonias adherentes in vitro, expresan también el marcador de células madre hematopoyéticas, CD34, aunque a niveles inferiores. Estos estudios usaron la lisis celular mediada por el anticuerpo-complemento CD34 para eliminar una alta proporción de células formadoras de colonias adherentes en los aspirados de médula (Simmons y Torok-Storb 1991b). Es importante señalar que mientras que el anticuerpo STRO-1 se generó después de la inmunización de los ratones con células de médula ósea CD34 $^+$ humanas, esto puede originarse por el hecho de que el antígeno STRO-1 se expresa también de niveles moderados a bajos en los glóbulos rojos nucleados $CD34^+$/Glicoforina-A^+ y linfocitos B $CD34^+$/$CD20^+$. Ofrecemos ahora evidencias directas, usando tecnología sofisticada de clasificación de células activadas por fluorescencia en la que MPC de médula ósea humana adulta multipotencial expresan altos niveles de STRO-1, pero carecen de expresión de la célula precursora del estroma, la célula madre hematopoyética y el marcador angioblástico (CD34), el antígeno de leucocitos (CD45), y el marcador de glóbulos rojos nucleados (Glicoforina-A) (Figura 6A-C). Estos datos demuestran que las MPC derivada de la médula ósea humana adulta son una nueva población de células madre, distinta de las células precursoras del estroma más maduras, células madre hematopoyéticas y angioblasto (Figura 7).

A menos que se indique lo contrario los materiales y métodos de este ejemplo son los mismos que los del Ejemplo 1.

Figura 6. Expresión de CD34, CD45 y glicoforina-A en células mononucleares de la médula ósea STRO-1 positivas. Histogramas representativos describen los perfiles de análisis de citometría de flujo de dos-colores típicos de las células mononucleares de la médula ósea STRO-1 positivas inicialmente aisladas por clasificación activada por magnetismo y co-teñidas con anticuerpos dirigidos contra CD34 (a), CD45 (B) o Glicoforina-a (C). El anticuerpo STRO-1 se identificó usando un anticuerpo anti-IgM murino en carnero-isotiocianato de fluoresceína mientras que CD34, CD45 y glicoforina-A se identificaron utilizando un anticuerpo de anti-IgG murino en carnero-ficoeritrina. La población MPC clonogénica que contenía la alta expresión de la fracción STRO-1 se aisló mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia basado en las regiones R1 y R2.

Figura 7. MPC de médula ósea son STRO-1 bright, CD34 negativas, CD45 negativas y Glicoforina-A negativa. El gráfico representa los resultados de los ensayos in vitro de formación de colonias adherentes realizados para cada una de las diferentes poblaciones clasificadas STRO-1 bright seleccionadas por su co-expresión o carencia ya sea de los antígenos CD34, CD45 o Glicoforina-A, basado en regiones R1 y R2 como se indica en la Figura 6. Estos datos se expresan como la incidencia media de las unidades formadoras de colonia para cada fracción celular promediada a partir de dos experimentos por separado.

EJEMPLO 3 *Identificación de MPC multipotencial en diferentes tejidos humanos*

Aunque es ampliamente desconocida la existencia y ubicación precisa de MPC en diferentes tejidos, recientemente demostramos que MPC parece residir en un nicho perivascular en la médula ósea humana y tejidos de la pulpa dental (Shi y Gronthos 2003). Estas observaciones se basaron en una combinación de métodos inmunohistoquímicos y de inmunoselección para identificar y aislar diferentes poblaciones de MPC basado en su expresión del marcador de célula madre mesenquimal, STRO-1, los marcadores de músculo liso y pericitos, CD146, alfa-actina de músculo liso y el marcador específico de pericito, 3G5. Extendimos ahora estos estudios demostrando la co-localización de STRO-1/CD146, actina de músculo STRO-1/alfa-actina de músculo liso y antígenos 3G5/CD146 en una amplia variedad de tejidos, incluyendo corazón, hígado, riñón, piel, bazo, páncreas, ganglios linfáticos (Figura 8).

Para confirmar nuestros primeros hallazgos de que MPC se pueden derivar a partir del tejido de la médula no-ósea, tal como pulpa dental, se usó la clasificación de células activadas por fluorescencia para aislar diferentes poblaciones de MPC a partir de tejido adiposo periférico humano adulto. Suspensiones celulares individuales se obtuvieron después de la digestión del tejido adiposo con colagenasa y dispasa como se describió anteriormente (Shi y Gronthos 2003). Las células derivadas del tejido adiposo se incubaron después con anticuerpos reactivos contra STRO-1, CD146 y 3G5. Las poblaciones celulares se seleccionaron después por FACS, basado en su positividad (región R3) o negatividad (región R2) para cada marcador y después se sembraron en medio de cultivo regular (Shi y Gronthos 2003) para evaluar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular (Figura 9). Después de 12 días de cultivo, las colonias (agregados de células de 50 o más) se clasificaron y mostraron como el número de colonias por 10^5 células sembradas por

cada fracción celular. Nuestros datos demostraron que MPC se puede derivar de tejidos adiposos basado en su expresión de los antígenos STRO-1/3G5/CD146 (Figura 10). El análisis de citometría de flujo de doble color confirmó que sólo una proporción menor de células derivadas del tejido adiposo co-expresan STRO-1/CD146 y 3G5/CD146 (Figura 11). Estos resultados son consistentes con nuestras observaciones anteriores de que MPC puede aislarse tanto de la médula ósea como del tejido de la pulpa dental basado en el mismo conjunto de marcadores perivasculares (Shi y Gronthos 2003). Además, proporcionamos pruebas que demuestran que las MPC derivadas de tejido adiposo aislados por la selección de CD146 tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tejidos tales como óseo, graso y cartílago (Figura 12), como se describió anteriormente (Gronthos y otros 2003).

Hallazgos recientes que examinan la existencia de MPC en tejidos no relacionados tal como la piel también se examinó para fortalecer más aun nuestra hipótesis. Suspensiones celulares individuales se obtuvieron después de la digestión de la piel humana de grosor completo con colagenasa y dispasa como se describió anteriormente para el tejido adiposo humano. Las células derivadas de la piel se incubaron con anticuerpos reactivos contra STRO-1, CD146 y 3G5 identificado usando ya sea un anti-IgM o IgG murino en carnero-ficoeritrina. Las poblaciones celulares se seleccionaron después por FACS, basado en su positividad (región R3) o negatividad (región R2) para cada marcador y después se sembraron en medio de crecimiento normal (Shi y Gronthos 2003) para evaluar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular (Figura 13). Después de 12 días de cultivo, las colonias (agregados de células de 50 o más) se clasificaron y mostraron como el número de colonias por 10^5 células sembradas por cada fracción celular. Los datos demostraron que MPC se puede derivar también de la piel basado en su expresión de antígenos STRO-1/3G5/CD146 (Figura 10). Estos datos en conjunto sugieren que MPC multipotencial se puede identificar y aislar prácticamente en todos los tejidos vascularizados derivados del tejido humano posnatal basado en un fenotipo común.

A menos que se indique lo contrario los materiales y métodos de este ejemplo son los mismos que los del Ejemplo 1.

Figura 8. Reactividad de los marcadores perivasculares en diferentes tejidos humanos. La tinción de inmunofluorescencia de doble color que demuestra la reactividad de (A) STRO-1 y CD146, (B) STRO-1 y alfa-actina de músculo liso, y (C) 3G5 y CD146, en vasos sanguíneos y tejido conectivo presentes en el bazo, páncreas (Panel I), cerebro, riñón (Panel II), hígado, corazón (Panel III) y piel (Panel IV) 20X. Los anticuerpos STRO-1 y 3G5 se identificaron usando un anti-IgM murino en carnero-Rojo Texas, mientras que CD146 y alfa-actina de músculo liso se identificaron con un anti-IgM o IgG murino en carnero-isotiocianato de fluoresceína. La co-localización se indica por el solapamiento de áreas de fluorescencia amarilla y naranja (flechas blancas).

Figura 9. Aislamiento de MPC derivada de tejido adiposo por FACS. Los histogramas representativos de citometría de flujo que representan la expresión de STRO-1, CD146 y 3G5 en las preparaciones frescas de suspensiones de células individuales derivadas de tejido adiposo periférico generados después de la digestión con colagenasa/dispasa como se describió anteriormente (Shi y Gronthos 2003). Los anticuerpos se identificaron usando ya sea un anti-IgM o IgG murino en carnero-ficoeritrina. Las poblaciones celulares se seleccionaron después por FACS, basado en su positividad (región R3) o negatividad (región R2) para cada marcador y después se sembraron en medio de crecimiento regular para evaluar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular.

Figura 10. Las MPC clonogénicas derivadas de tejido adiposo son positivas para STRO-1/3G5/CD146. El gráfico de barras representa el número de colonias clonogénicas recuperadas a partir de suspensiones de células individuales de tejido adiposo periférico humano enzimáticamente digerido, después de la clasificación de células activadas por fluorescencia, basado en su reactividad con los anticuerpos que reconocen STRO-1, CD146, y 3G5 (Figura 9), después de cultivadas en medio de crecimiento estándar como se describió anteriormente para la médula ósea y el tejido de la pulpa dental (Shi y Gronthos 2003). Los datos se expresan como el número de unidades formadoras de colonias obtenidas por 10^5 células sembradas en las fracciones de células positivas y negativas promediadas a partir de dos experimentos por separado.

Figura 11. Análisis inmunofenotípico de MPC derivadas de tejido adiposo. Los histogramas representativos de citometría de flujo que representan la expresión de STRO-1 y CD146 (A) y 3G5 y CD 146 en las preparaciones frescas de suspensiones de células individuales derivadas de tejido adiposo periférico generados después de la digestión con colagenasa/dispasa. Los anticuerpos STRO-1 y 3G5 se identificaron usando un anti-IgM murino en carnero-ficoeritrina, mientras que CD146 se identificó usando un anti-IgG murino en carnero-isotiocianato de fluoresceína. Aproximadamente 60% y 50% de las células CD146 positivas co-expresan STRO-1 y 3G5, respectivamente. Estos datos sugieren que el 10% o más de las células CD164 positivas co-expresan STRO-1 y 3G5.

Figura 12. Potencial de desarrollo de MPC purificada derivada de los adipocitos *in vitro.* Las preparaciones de cultivos primarios de MPC derivados a partir decélulas adiposas STRO-1^+/CD146^+ se cultivaron nuevamente, ya sea en condiciones de cultivo estándar (A), medio de inducción osteogénica (B), medio de inducción adipogénico (C) o condiciones condrogénicas (D) como se describió anteriormente Gronthos y otros 2003. Después de dos semanas de inducción de la

multi-diferenciación, MPC derivada de los adipocitos demostró la capacidad para formar hueso (B; depósitos minerales positivos de alizarina), grasa (C; aceite Rojo O lípido positivo) y cartílago (D: matriz de colágeno tipo II).

Figura 13. Aislamiento de MPC derivada de la piel por FACS. Los histogramas representativos de citometría de flujo que representan la expresión de STRO-1, CD146 y 3G5 en las preparaciones frescas de suspensiones de células individuales derivadas de la piel espesor completo generados después de la digestión con colagenasa/dispasa. Los anticuerpos se identificaron usando ya sea un anti-IgM o IgG murino en carnero-ficoeritrina. Las poblaciones celulares se seleccionaron después por FACS, basado en su positividad (región R3) o negatividad (región R2) para cada marcador y después se sembraron en medio de crecimiento regular para evaluar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular.

Figura 14. MPC clonogénicas derivadas de tejido adiposo son positivas para STRO-1bri/3G5/CD146. El gráfico de barras representa el número de colonias clonogénicas recuperadas a partir de suspensiones de células individuales de piel humana enzimáticamente digerida, después de la clasificación de células activadas por fluorescencia, basado en su reactividad con los anticuerpos que reconocen STRO-1, CD146, y 3G5, después de cultivadas en medio de crecimiento estándar como se describió anteriormente para la médula ósea y el tejido de la pulpa dental (Shi y Gronthos 2003). Los datos se expresan como el número de unidades formadoras de colonias obtenidas por 10^5 células sembradas en las fracciones de células positivas y negativas promediadas a partir de dos experimentos por separado.

Ejemplo 4 *Células stro^{bright} inducen la neovascularización (angiogénesis y arteriogénesis) y resultan en la mejoría funcional del tejido isquémico del miocardio.*

Figura 15. Injerto y supervivencia de las células humanas Stro^{bright} inyectadas en tumores de rata. Ratas desnudas atímicos se irradiaron con 250 Gy durante 5 minutos para eliminar la función asesina natural residual, después, se inyectaron por vía subcutánea en el flanco con 1 x 10^6 células de glioblastoma de rata. Dos semanas después de la implantación, los tumores de glioblastoma se inyectaron directamente, ya sea con 500,000 células Stro^{bright}, 500,000 células Stro^{dim} o solución salina, y los animales se sacrificaron 7 días después. En 2/3 de tejidos tumorales que recibieron células Stro^{bright}, la tinción por el método de inmunoperoxidasa usando un anticuerpo monoclonal con reactividad específica contra mitocondria humana, pero no de rata, demostró numerosas células humanas alrededor del sitio de la inyección, indicando el injerto y la supervivencia a medio plazo. Células humanas no se detectaron en cualquiera de los tres tejidos que reciben las células Stro^{dim}, lo que sugiere que las células Stro^{brigh} pueden tener una supervivencia o ventaja replicativa en este sistema de modelo *in vivo* (ver panel A). Las células Stro^{bright} estuvieron predominantemente en agrupamientos cercanos a capilares pequeños y arteriolas (flechas pequeñas) (panel B). Adicionalmente, se observaron diversas células humanas incorporarse en las estructuras vasculares (flecha grande) (panel C). Estos datos indican que las células humanas Stro^{bright} pueden inducir tanto neovascularización de vasos endógenos (rata) como pueden llegar a incorporarse en los nuevos vasos de origen humano.

Figura 16. Inducción de la neovascularización del tumor (angiogénesis y arteriogénesis) por las células Stro^{bright} humanas. En secciones consecutivas del tejido tumoral teñido con el método de inmunoperoxidasa usando anticuerpos monoclonales dirigidos, respectivamente, contra el Factor de von Willebrand (vWF) y alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA), los animales inyectados con las células Stro^{bright} demostraron números significativamente mayores de capilares y arteriolas (definido, respectivamente, por la tinción de vWF sola y expresión combinada de vWF y alfa-SMA) que los animales inyectados con solución salina.

Figura 17. Células Stro^{bright} son más potentes inductores de la neovascularización (angiogénesis y arteriogénesis) que las células Stro^{dim}. La cuantificación de los números arteriolares (definidos como las estructuras vasculares con el diámetro del lumen > 50 micrométros y expresión periférica de alfa-SMA) demostró que los animales inyectados con células Stro^{bright} tuvieron casi ocho veces mayor número de arteriolas que los controles tratados con solución salina en el sitio de la inyección (40 ± 5 vs 6 ± 2 arteriolas/campo de gran aumento, $p<0.01$), mientras que ninguna diferencia se pudo detectar distal al sitio de la inyección. Los animales inyectados con la progenie de Stro^{dim} demostró un aumento modesto, de dos veces en el número de arteriolas en el sitio de la inyección en relación con los controles tratados con solución salina (13 ± 3 vs 6 ± 2 arteriolas/campo de gran aumento, $p<0.01$), indicando que la progenie de Stro^{bright} contuvo las células pro-arteriogénicas más potentes después del cultivo *in vitro*.

Figura 18. Efecto dosis-dependiente de las células Stro^{bright} en la neovascularización del miocardio. Para examinar si la inducción de la angiogénesis y arteriogénesis podría extenderse a otros tejidos, y se asoció con significación biológica, la progenie cultivada de células seleccionadas-Stro se inyectaron por inyección intramiocárdica directa en las regiones peri-infarto de los corazones isquémicos en ratas desnudas que se sometieron a la ligadura de la arteria coronaria (LAD) izquierda descendente anterior (LAD) dos días antes. Animales inyectados con células 1 x 10^6 Stro^{bright} demostraron números de arteriolas tres veces mayores en la región peri-infarto que los animales inyectados con solución salina (12 ± 2 vs 4 ± 1 arteriolas/campo de gran aumento, $p<0.01$). Por el contrario, los animales inyectados con sólo 0.2 x 10^6 células

Stro^{bright}, suministrados en un total de 1 x 10^6 de la progenie cultivada sin fraccionar de células Stro-seleccionadas, indujeron sólo el 50% de los mayores números de arteriolas en la región peri-infarto que la solución salina (6 ± 1 vs 4 ± 1 arteriolas/campo de gran aumento, $p<0.05$), lo que indica que las células Stro^{bright} tienen un efecto dependiente de la dosis en la inducción arteriolar de la cardiopatía isquémica.

Figuras 19, 20 y 21. Resultados de la neovascularización del miocardio dependiente de Stro^{bright} en la mejoría global de los parámetros de la función del miocardio. A continuación examinamos los efectos de la neovascularización del miocardio dependiente de Stro^{bright} sobre los parámetros globales de la función cardíaca . Como se muestra en la figura 19, la inyección de aproximadamente 0.1 - 0.2 x 10^6 y 1 x 10^6 células de Stro^{bright} resultaron en la mejoría dependiente de la dosis en la fracción de eyección (EF) a las 2 y 6 semanas, como medido por la ecocardiografía realizada y analizada por un técnico a ciegas. Los animales que recibieron 1 x 10^6 células de Stro^{bright} demostraron mejoría media de la EF a las 2 y 6 semanas de 50% y 75%, respectivamente, en relación con los valores iniciales de dos días de ligadura post-LAD. A diferencia extrema, los animales tratados con solución salina mostraron sólo el 5% de mejoría media en EF por 6 semanas ($p<0.01$), y los animales tratados con células mononucleares de médula ósea frescas carentes de Stro no demostraron ninguna diferencia en comparación con los que recibieron solución salina. La inyección de 1 x 10^6 células Stro^{bright} resultó en una mejoría dramática similar en área de acortamiento fraccional (FAS) (mejoría media de 70 % y 90% a las 2 y 6 semanas, respectivamente, figura 20). Las células mononucleares de médula ósea carentes-Stro no tuvieron ningún efecto de nuevo, mientras que se observó modesta mejoría después de la inyección de aproximadamente 01. - 0.2 x 10^6células Stro^{bright}. Por último, como se muestra en la figura 21, la inyección de 1 x 10^6 células de Stro^{bright} resultaron en la mejoría significativa en la distensibilidad ventricular izquierda en comparación con los controles tratados con solución salina. Los animales que recibieron las células de Stro^{bright} demostraron reducción por encima del 50 % tanto en la presión diastólica como la presión diastólica final media del ventrículo izquierdo (cada $p<0.01$) y la mejoría dos veces por encima en dp/dt ($p<0.01$). En conjunto, estos resultados indican que la neovascularización (angiogénesis y arteriogénesis) de miocardio de rata isquémica inducida por la inyección de 1 x 10^6 células de Stro^{bright} humanas resultaron en una mejoría significativa tanto de los parámetros globales sistólicos como diastólicos de la función cardíaca.

EJEMPLO 5 *Análisis inmunofenotípico ex vivo de células precursoras mesenquimales de médula ósea humana ampliadas*

Informamos anteriormente que las células precursoras mesenquimales multipotenciales (MPC) pueden purificarse a partir de células mononucleares de médula ósea humana adulta basado en el fenotipo STRO-1^{bright}/VCAM-1 (CD106)$^+$ o STRO-1^{bright}/MUC-18 (CD146)$^+$ (Gronthos y otros 2003; Shi y Gronthos 2003). La población MPC puede propagarse rápidamente in vitro bajo condiciones de cultivo definidas (Gronthos y otros 2003). Presentamos datos actuales que caracterizan ex vivo la progenie de MPC ampliada basado en los marcadores asociados con diferentes linajes de células, tanto en el nivel de ARNm como de proteína, usando la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) y análisis por citometría de flujo, respectivamente.

En la primera serie de experimentos, se empleó el análisis semi-cuantitativo de RT-PCR para examinar el perfil de expresión génica de varios genes de linaje asociado presentes en las poblaciones de MPC cultivadas (Figura 23). La expresión génica relativa para cada marcador de células se evaluó con referencia a la expresión del gen de mantenimiento, GAPDH, usando el software ImageQuant (Figura 23B). Adicionalmente, se usó el análisis por citometría de flujo de único-color para examinar el perfil de expresión de proteínas ex vivo de las MPC ampliadas basado en su expresión de marcadores de células linaje-asociados (Figura 23A). Un resumen del fenotipo general basado en la expresión génica y de proteína de MPC cultivada se presenta en la Tabla 1. La comparación directa del perfil de expresión génica de MPC descrito en la presente patente demostró diferencias evidentes entre esta población celular y las células madre mesenquimales (MSC) descritas anteriormente por Pittenger y otros 1999, (Tabla 1).

A menos que se indique lo contrario los materiales y los métodos de este ejemplo son los mismas que los del Ejemplo 1.

Figura 23 A. Patrón de expresión inmunofenotípica ex vivo de MPC de médula ósea ampliada. Suspensiones de células individuales de MPC de médula ósea ampliada se prepararon ex vivo mediante el tratamiento con tripsina/EDTA después se incubaron con anticuerpos que identifican marcadores asociados al linaje celular. Para aquellos anticuerpos que identifican antígenos intracelulares, las preparaciones de células se fijaron con etanol frío al 70% para permeabilizar la membrana celular antes de la tinción para los marcadores intracelulares. Los anticuerpos control coincidente en isotipo se trataron bajo condiciones idénticas. El análisis por citometría de flujo se realizó usando un instrumento COULTER EPICS. Los gráficos de puntos representan 5,000 eventos en modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador celular de linaje con referencia a los anticuerpos control negativo coincidentes en isotipo (línea delgada).

Figura 23 B. Perfil de expresión génica de MPC cultivada. Suspensiones celulares individuales de MPC de médula ósea ampliada ex vivo se prepararon con tratamiento tripsina/EDTA y se preparó el ARN celular total. Usando el método de extracción ARNzoIB, el ARN total se aisló y usó como un molde para la síntesis de ADNc, preparado usando un

procedimiento estándar. La expresión de varios transcriptos se evaluó mediante amplificación por PCR, usando un protocolo estándar como se describió anteriormente (Gronthos y otros 2003). Los conjuntos cebadores usados en este estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, cada mezcla de reacción se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1.5%, y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. La expresión génica relativa para cada marcador celular se evaluó con respecto a la expresión del gen de mantenimiento, GAPDH, usando el software ImageQuant.

Figura 22 . *Ex vivo* MPC STRO-1^{bri} ampliadas pueden desarrollarse en las arteriolas *in vitro.* Suspensiones celulares individuales *ex vivo* de MPC de médula ósea STRO-1^{bri} ampliadas se prepararon con tratamiento tripsina/EDTA después se sembraron en placas de 48 pocillos que contenían 200µl de matrigel. Las MPC STRO-1^{bri} se sembraron a 20,000 células por pocillo en medio libre de suero (Gronthos y otros 2003) suplementado con los factores de crecimiento PDGF, EGF, VEGF a 10ng/ml. Después de 24 horas del cultivo a 37℃ en 5% CO_2, los pocillos se lavaron, después se fijaron con paraformaldehído al 4%. Los estudios inmunohistoquímicos que se realizaron a continuación demostraron que la alfa-actina de músculo liso expresa estructuras similares a un cordón identificado con un anticuerpo anti-IgG murino en carnero-peroxidasa de rábano picante.

Tabla 1. Comparación entre células precursoras mesenquimatosas humanas (MCP) cultivadas y células madre mesenquimales humanas (MSC) cultivadas después de la ampliación ex vivo. Se encontró que los antígenos están presentes en la superficie celular, intracelular o en la matriz extra celular. MPC expresan marcadores de tejidos con origen de desarrollo diferente, es decir ECT-ectodermo, MES- mesodermo y END - endodermo.

ANTÍGENO	**MSC**	**MPC**	**Tipo de célula diferenciada**
STRO-1	-ve	+ve	
Colágeno II	-ve	+ve	Condrocito (MES)
Colágeno IV	-ve	+ve	Fibroblasto (MES)
Laminina	-ve	+ve	Fibroblasto (MES)
Sialoproteina ósea (BSP)	-ve	+ve	Osteoblasto (MES)
Osteocalcina (OCN)	-ve	+ve	Osteoblasto (MES)
Nestina	ND	+ve	Neural (ECT)
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	ND	+ve	Neural (ECT)
CBFA1	-ve	+ve	Osteoblasto (MES)
Osterix (OSX)	ND	+ve	Osteoblasto (MES)
Osteocalcina (OCN)	-ve	+ve	Osteoblasto (MES)
Sox9	ND	+ve	Condrocito (MES)
Colágeno X (COL X)	+ve	+ve	Condrocito (MES)
Leptina	ND	+ve	Adiposo (MES)
GATA-4	ND	+ve	Cardiomiocito (MES)
Transferrina (TFN)	ND	+ve	Hepatocito (END)
Monooxigenasa que contiene flavina (FCM)	ND	+ve	Hepatocito (END)

Tabla 2. Iniciadores y condiciones RT-PCR para la amplificación específica de ARNm humano

Gen objetivo	**Secuencias iniciadoras Sentido/ Antisentido (5'-3')**	**Tamaño del producto**
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG/ [sec. con núm. de ident. 7]	417
	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC [sec. con núm. de ident. 8]	
Leptina	ATGCATTGGGAACCCTGTGC/ [sec. con núm. de ident. 9]	492
	GCACCCAGGGCTGAGGTCCA [sec. con núm. de ident. 10]	

Gen objetivo	Secuencias iniciadoras Sentido/ Antisentido (5'-3')	Tamaño del producto
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA/ [sec. con núm. de ident. 11]	632
	TGGGAGGTAGGTGTGGTAGTG [sec. con núm. de ident. 12]	
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC/ [sec. con núm. de ident. 13]	289
	CGTAGAAGCGCCGATAGGC [sec. con núm. de ident. 14]	
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT/ [sec. con núm. de ident. 15]	370
	TCATCGCTCAGGAGGTCCTT [sec. con núm. de ident. 16]	
Nestina	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA/ [sec. con núm. de ident. 17]	460
	CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT [sec. con núm. de ident. 18]	
GATA-4	GACTTCTCAGAAGGCAGAG/ [sec. con núm. de ident. 19]	800
	CTATCCTCCAAGTCCCAGAG [sec. con núm. de ident. 20]	
PDGFβ-R	AATGTCTCCAGCACCTTCGT/ [sec. con núm. de ident. 21]	650
	AGCGGATGTGGTAAGGCATA [sec. con núm. de ident. 22]	
Osterix	GGCACAAAGAAGCCGTACTC/ [sec. con núm. de ident. 23]	247
	CACTGGGCAGACAGTCAGAA [sec. con núm. de ident. 24]	
COL X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA/ [sec. con núm. de ident. 25]	387
	TTTTCCCACTCCAGGAGGGC [sec. con núm. de ident. 26]	
SOX9	CTC TGC CTG TTT GGA CTT TGT/ [sec. con núm. de ident. 27]	598
	CCT TTG CTT GCC TTT TAC CTC [sec. con núm. de ident. 28]	
Ang-1	CCAGTCAGAGGCAGTACATGCTA AGAATTGAGTTA/ [sec. con núm. de ident. 29]	300
	GTTTTCCATGGTTTTGTCCCGCAGTA [sec. con núm. de ident. 30]	

Referencias

1.Spradling y otros, (2001). Nature 414(6859):98-104.

2.Bianco y Robey (2001) Nature 414(6859):118-121.

3.Fuchs y Segre (2000) Cell 100(1):143-55.

4.Gronthos y otros, (2000) ProcNatl Acad Sci Estados Unidos 97(25):13625-30.

5.Kuznetsov y otros, (1997). J Bone Miner Res 12(9):1335-47.

6.Bianco y otros, (2001) Stem Cells 19(3):180-92.

7.Lichtman (1981) Exp Hematol 9(4):391-410.

8.Weiss (1976) Anatomical Record 186:161-84.

9.Weiss y Sakai H (1984) Am J Anat 170(3):447-63.

10.Dexter y Shadduck (1980) J Cell Physiol 102(3):279-86.

11.Orchardson y Cadden (2001) Dent Update 28(4):200-6, 208-9.

12.Peters y Balling (1999) Trends Genet 15(2):59-65.

13.Thesleff y Aberg (1999) Bone 25(1):123-5.

14.Friedenstein y otros, (1974) Transplantation 17(4):331-40.

15.Castro-Malaspina y otros, (1980) Blood 56(2):289-301.

16.Weissman (2000) Cell 100(1):157-68.

17.Uchida y otros, (2000) Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 97(26):14720-5.

18.Kuznetsov y otros, (2001) J Cell Biol 153(5):1133-40.

19.Shi y otros, (2001) Bone 29(6):532-39.

20.Pittenger y otros, (1999) Science 284(5411):143-7.

21.Gronthos y otros, (2002) J Dent Res 81(8):531-5.

22.Owen y Friedenstein (1988) Ciba Found Symp 136(29):42-60.

23.Doherty y otros, (1998) J Bone Miner Res 13(5):828-38.

24.Bianco y Cossu (1999). Exp Cell Res 251(2):257-63.

25.Gronthos y otros, (1998) Isolation, purification and in vitro manipulation of human bone marrow stromal células precursoras. En: Beresford JN y Owen ME (ed) Marrow stromal cell culture. Cambridge University Press, Cambridge, UK, págs. 26-42.

26.Gronthos y Simmons (1995) Blood 85(4):929-40.

27.Gronthos y otros, (1999) J Bone Miner Res 14(1):47-56.

28.Filshie y otros, (1998) Leukemia 12(3):414-21.

29.Simmons y Torok-Storb (1991). Blood 78(1):55-62.

30.Canfield y Schor (1998) Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Beresford JN y Owen ME (ed) Marrow stromal cell culture. Cambridge University Press, Cambridge, UK, págs. 128-148.

31.Riminucci y Bianco (1998) The bone marrow stroma in vivo: ontogeny, structure, cellular composition and changes in disease. En: Beresford JN y Owen ME (ed) Marrow stromal cell culture. Cambridge University Press, UK, Cambridge, UK, págs. 10-25.

32.Gronthos y otros, (1994) Blood 84(12):4164-73.

33.Oyajobi y otros, (1999) J Bone Miner Res 14(3):351-61.

34.Dennis y otros, (2002). Cells Tissues Organs 170(2-3):73-82.

35.Stewart y otros, (1999) J Bone Miner Res 14(8):1345-56.

36.Ahdjoudj y otros, (2001) J Cell Biochem 31(1):23-38.

37.Shih (1999) J Pathol 189(1):4-11.

38.Van Vlasselaer y otros, (1994) Blood 84(3):753-63.

39.Prockop y otros,(2001). Cytotherapy 3(5):393-6.

40.Ducy y otros, (1997) Cell 89(5):747-54.

41.Komori y otros, (1997) Cell 89(5):755-64.

42.Woodbury y otros, (2000) J Neurosci Res 61(4):364-70.

43.Dey y otros, (2001) Arch Oral Biol 46(3):249-60.

44.Ueno y otros, (2001) Matrix Biol 20(5-6):347-55.

45.Couble y otros, (2000) Calcif Tissue Int 66(2):129-38.

46.Nehls y Drenckhahn (1993) Histochemistry 99(1):1-12.

47.Schor y otros, (1995) Clin Orthop 313:81-91.

48.Pugach y otros, (1999) Arkh Patol 61(4):18-21.

49.Nehls y otros, (1992) Cell Tissue Res 270(3):469-74.

50.Brighton y otros, (1992) Clin Orthop 275:287-99.

51.Nayak y otros, (1988) J Exp Med 167(3):1003-15.

52.Andreeva y otros, (1998) Tissue Cell 30(1):127-35.

53.Cattoretti y otros, (1993) Blood 81(7):1726-38.

54.Charbord y otros, (2000) J Hematother Stem Cell Res 9(6):935-43.

55.Dennis y Charbord (2002) Stem Cells 20(3):205-14.

56.Young y otros, (2001) Anat Rec 263(4):350-60.

Gronthos y otros, (2003). Journal of Cell Science 116: 1827-1835.
Pittenger y otros, (1999). Science 284, 143-7.
Simmons y Torok-Storb (1991a). Blood 78(1):55-62.
Simmons y Torok-Storb (1991b). Blood 78:2848.
Shi y Gronthos. (2003). Journal of Bone and Mineral Research, 18(4): 696-704.

Listado de secuencias

<110> Medvet Science Pty Ltd
Angioblast Systems Incorporated

<120> Formación de vasos sanguíneos inducida por células precursoras mesenquimales perivasculares

<160> 30

<210> 1
<211> 24
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 1
ctatggagag gacgccacgc ctgg 24

<210> 2
<211> 23
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 2
catagccatc gtagccttgt cct 23

<210> 3
<211> 16
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 3
catgagagcc ctcaca 16

<210> 4
<211> 17
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 4
agagcgacac cctagac 17
<210> 5

<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 5
agccgcatct tcttttgcgt c 21

<210> 6
<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 6
tcatatttgg caggtttttc t 21

<210> 7
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 7
cactgacacg ttggcagtgg 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN.

<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 8
catggagaag gctggggctc 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 9
atgcattggg aaccctgtgc 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 10
gcacccaggg ctgaggtcca 20

<210> 11
<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 11
gtggacgagg caagagtttc a 21

<210> 12
<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 12
tggcaggtag gtgtggtagt g 21

<210> 13
<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 13
atgagagccc tcacactcct c 21

<210> 14
<211> 19
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 14
cgtagaagcg ccgataggc 19

<210> 15
<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 15
ctgttgccag agatggaggt t 21

<210> 16
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 16
tcatcgctca ggaggtcctt 20

<210> 17
<211> 24
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 17
ggcagcgttg gaacagaggt tgga 24

<210> 18
<211> 24
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 18
ctctaaactg gagtggtcag ggct 24

<210> 19
<211> 19
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 19
gacttctcag aaggcagag 19

<210> 20
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 20
ctatcctcca agtcccagag 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 21
aatgtctcca gcaccttcgt 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 22
agcggatgtg gtaaggcata 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 23
ggcacaaaga agccgtactc 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 24
cactgggcag acagtcagaa 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 25
agccagggtt gccaggacca 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 26
ttttcccact ccaggagggc 20
<210> 27

<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 27
ctctgcctgt ttggactttg t 21

<210> 28
<211> 21
<212> ADN.

<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 28
cctttgcttg cctttacct c 21

<210> 29
<211> 35
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 29
ccagtcagag gcagtacatg ctaagaattg agtta 35

<210> 30
<211> 26
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<223> Iniciador

<400> 30
gttttccatg gttttgtccc gcagta 26

REIVINDICACIONES

1. El uso de una cantidad eficaz de una población de células para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la isquemia en un paciente, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece con células que expresan el marcador STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1% de células precursoras mesenquimales (MPC) capaces de formar UFC-F (unidades formadoras de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45, y glicoforina-A.

2. Una población de células para usar en el tratamiento de la isquemia en un paciente, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece con células que expresan el marcador STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1% de MPC capaces de formar una UFC-F (unidades formadoras de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45, y glicoforina-A.

3. El uso de la reivindicación 1 o la población de células para usar en el tratamiento de conformidad con la reivindicación 2 en donde las células inducen la formación o reparación de vasos sanguíneos en un tejido objetivo de un paciente.

4. El uso o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 3 en donde la reparación de vasos sanguíneos resulta en arteriogénesis.

5. El uso o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 3 en donde la reparación de vasos sanguíneos resulta en el revestimiento de la vasculatura con células que expresan la actina alfa de músculo liso.

6. El uso de la reivindicación 1 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la población comprende al menos 1% de MPC capaces de formar una colonia clonogénica.

7. El uso de la reivindicación 1 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la población comprende al menos 0.1 % de MPC STRO-1bright.

8. El uso de la reivindicación 1 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la población comprende al menos 1 % de MPC STRO-1bright.

9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 en donde la población de células es además positiva para el marcador 3G5.

10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 en donde la población de células co-expresa además el marcador VCAM-1.

11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 en donde la población de células se expande antes de la administración.

12. El uso de la reivindicación 11 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la población expandida comprende al menos 1% de MPC capaces de formar una colonia clonogénica.

13. El uso de la reivindicación 11 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la población expandida comprende al menos 1% de MPC STRO-1 bright.

14. El uso de la reivindicación 11 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la población expandida comprende al menos 10% de MPC STRO-1bright.

15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en donde la población de células se expande en el intervalo de entre 10^2 a 10^4 veces.

16. El uso de la reivindicación 1 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicho paciente necesita del tratamiento para una afección seleccionada del grupo que consiste de isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia de las extremidades, isquemia del miocardio y cardiomiopatía isquémica.

17. El uso de la reivindicación 3 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el tejido objetivo papel es el miocardio.

18. El uso de la reivindicación 17 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 17 en donde dicho sujeto padece de una enfermedad cardiovascular que consiste en enfermedad isquémica del corazón, enfermedad de la arteria coronaria, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, o angina.

19. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 18 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18 en donde la población de células agrupan en nuevas estructuras de los vasos sanguíneos.

20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 19 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19 en donde la población de células induce la formación de nuevas estructuras de los vasos sanguíneos.

21. El uso de la reivindicación 17 o la reivindicación 18 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18 en donde la población de células induce la formación de nuevos cardiomiocitos.

22. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 21 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 21 en donde las células son autólogas.

23. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 22 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 22 en donde las células son de una fuente alogénica.

24. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 23 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 23 en donde la preparación de células comprende una suspensión celular.

25. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 22 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 22 en donde la preparación de células comprende una suspensión celular individual.

26. El uso de una población de células en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular que consiste en enfermedad isquémica del corazón, enfermedad de la arteria coronaria, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, o angina de pecho en un sujeto, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece de células que expresan el marcador de STRO-1, en donde dicha población comprende al menos 0.1% de MPC capaces de formar una UFC-F (unidad formadora de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45, y glicoforina-A.

27. Una población de células para usar en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular que consiste en enfermedad isquémica del corazón, enfermedad de la arteria coronaria, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, o angina de pecho en un sujeto, en donde la población de células es derivable de células mononucleares de médula ósea y se enriquece de células que expresan el marcador de STRO-1 en

donde dicha población comprende al menos 0.1% de MPC capaces de formar una UFC-F (unidad formadora de colonias-fibroblasto), y en donde dichas MPC son negativas para los marcadores CD34, CD45, y glicoforina-A.

28. El uso de la reivindicación 26 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 27 en donde la población comprende al menos 1% de MPC capaz de formar una colonia clonogénica.

29. El uso de la reivindicación 26 o 28 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 27 o 28 en donde la población comprende al menos 0.1% de MPC STRO-1bright.

30. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26, 28 o 29 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 en donde la población comprende al menos 1% de MPC STRO-1 bright.

31. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 30 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30 en donde la población de células es además positiva para el marcador 3G5.

32. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 31 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31 en donde la población de células además co-expresa el marcador VCAM-1.

33. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 32 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32 en donde la población de células se expande antes de la administración.

34. El uso de la reivindicación 33 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 33 en donde la población expandida comprende al menos 1% de MPC capaces de formar una colonia clonogénica.

35. El uso de la reivindicación 34 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 34 en donde la población expandida comprende al menos 1% de MPC STRO-1 bright.

36. El uso de la reivindicación 35 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 35 en donde la población expandida comprende al menos 10% MPC STRO-1bright.

37. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 36 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36 en donde la población de células se agrupa en nuevas estructuras de los vasos sanguíneos.

38. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 37 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 37 en donde la población de células induce la formación de nuevas estructuras de los vasos sanguíneos.

39. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 37 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 37 en donde la población de células se diferencia y agrupa en cardiomiocitos.

40. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 36 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36 en donde la población de células induce la formación de cardiomiocitos.

41. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 40 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 40 en donde las células son autólogas.

42. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 40 o la población de células para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 40 en donde las células son de una fuente alogénica.

43. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 42 o la población de células de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 42 en donde la preparación de células comprende una suspensión celular.

44. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 43 o la población de células de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 43 en donde la preparación de células comprende una única suspensión celular.

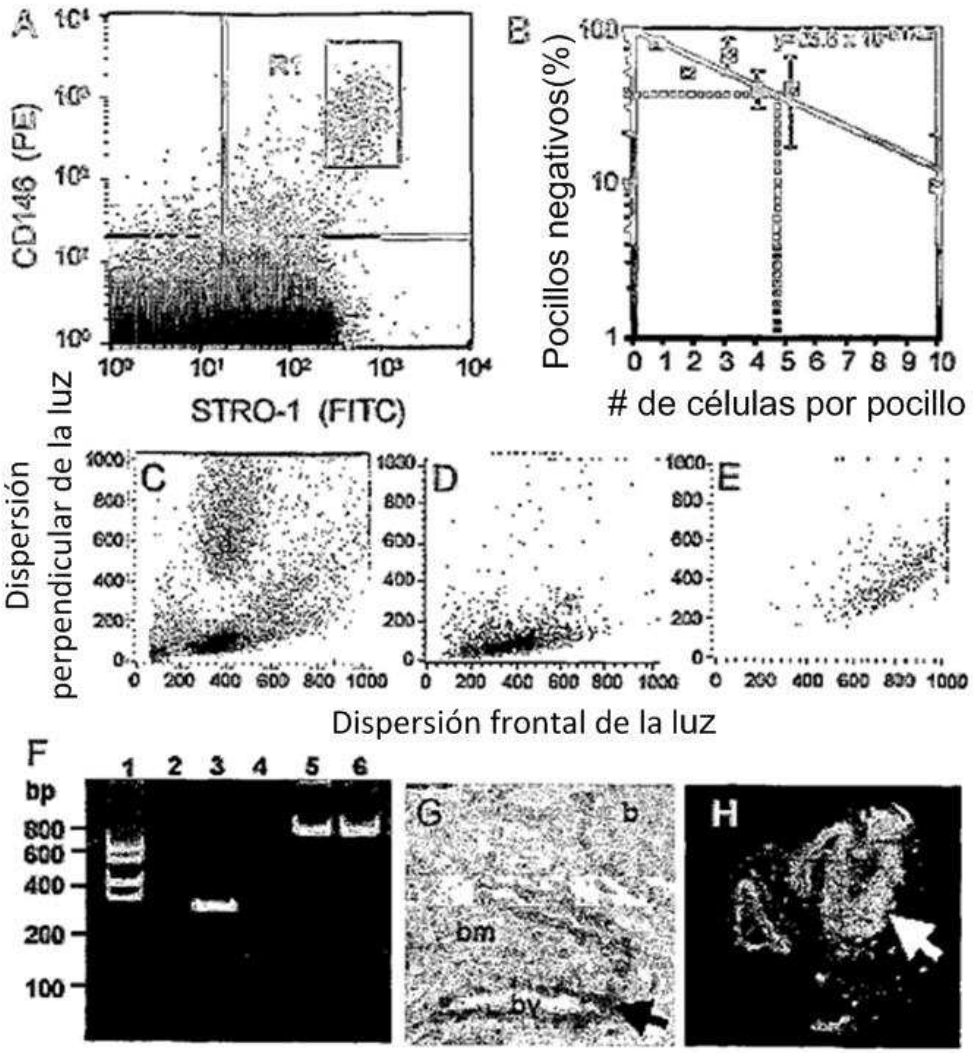

A
CD146 (PE)
STRO-1 (FITC)
R1
B
Pocillos negativos(%)
de células por pocillo
C
D
E
Dispersión perpendicular de la luz
Dispersión frontal de la luz
F
bp
800
600
400
200
100
1 2 3 4 5 6
G
b
bm
bv
H

Figura 1

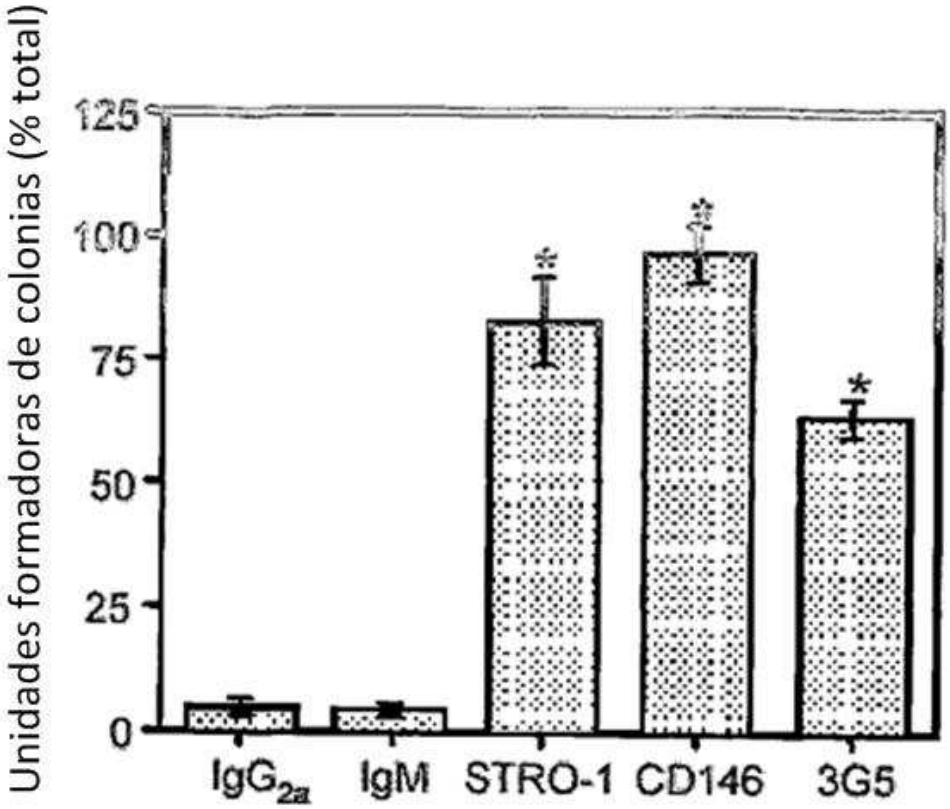

Unidades formadoras de colonias (% total)
125
100
75
50
25
0
IgG2a
IgM
STRO-1
CD146
3G5
*
*
*

Figura 2

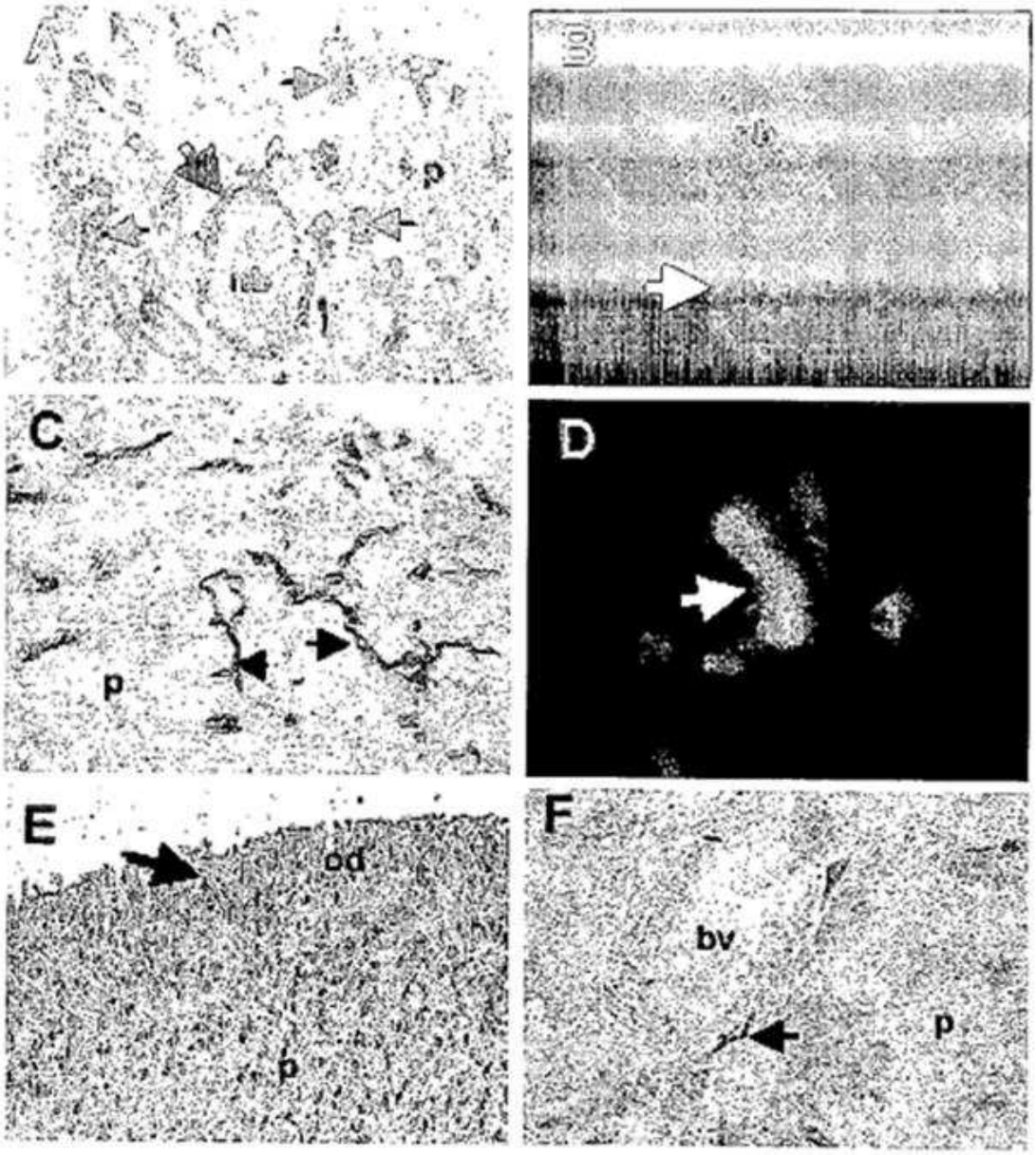
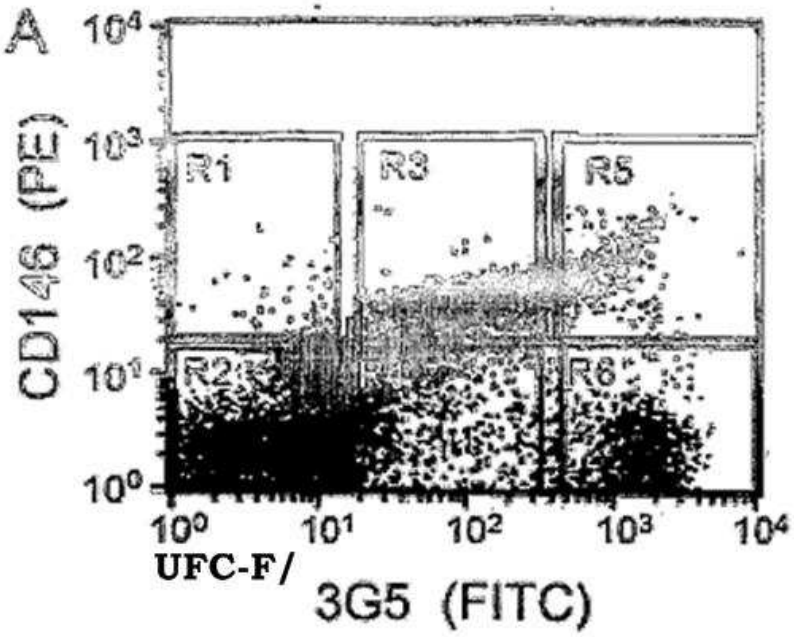


Figura 3

A



B

Fracción celular	#UFC-F/ 10^5 Células
BMMNC	13 ± 2.6
R1: 3G5$^-$/CD146$^+$	360 ± 45.0
R2: 3G5$^-$/CD146$^-$	0
R3: 3G5$^+$/CD146$^+$	58 ± 11.2
R4: 3G5$^+$/CD146$^-$	0
R5: 3G5^{++}/CD146$^+$	1 ± 1.0
R6: 3G5^{++}/CD146$^-$	0

Figura 4

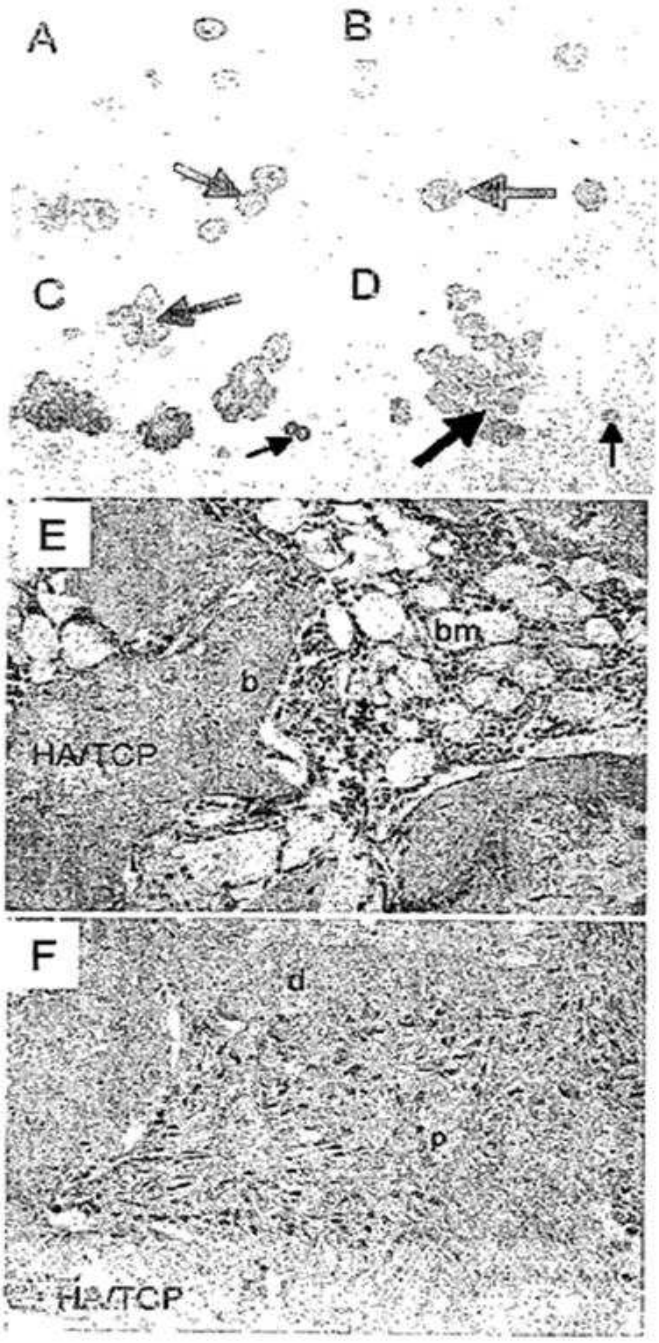


Figura 5

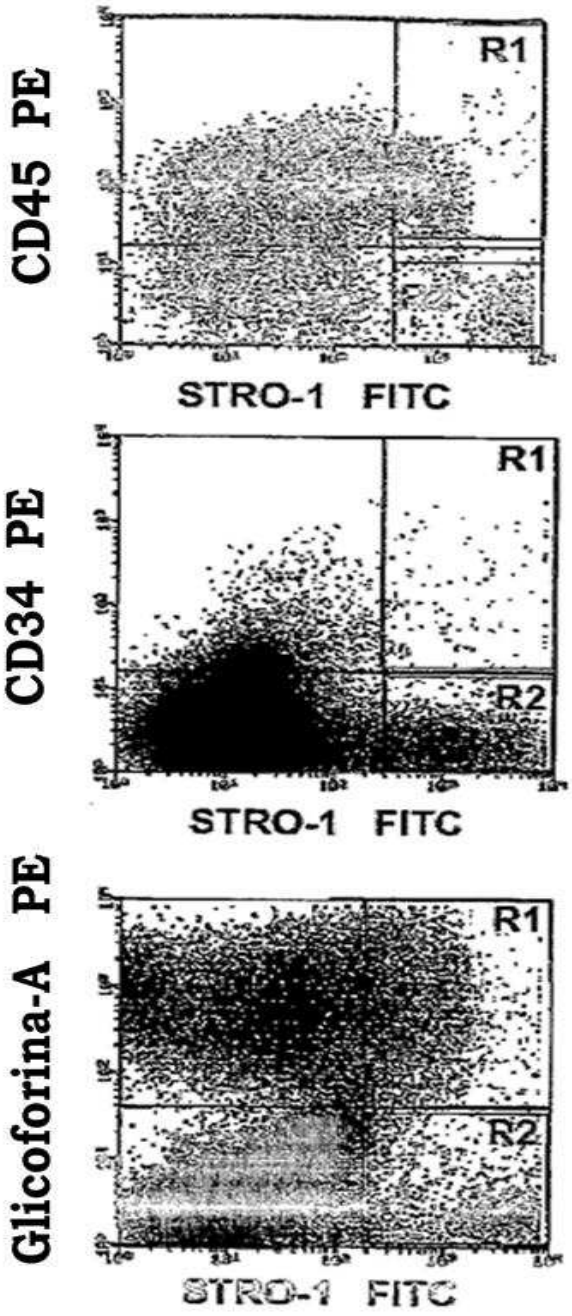

CD45 PE
R1
STRO-1 FITC
CD34 PE
R1
R2
STRO-1 FITC
Glicoforina-A PE
R1
R2
STRO-1 FITC

Figura 6

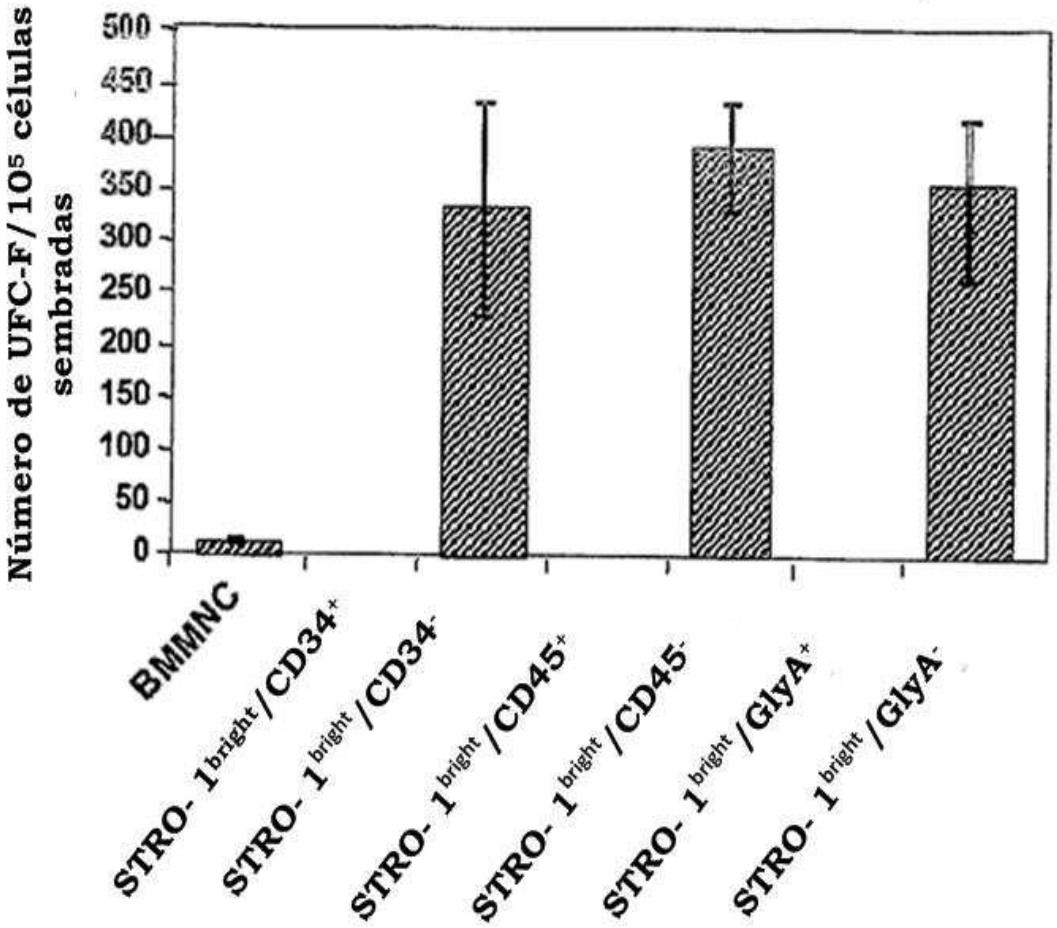

Número de UFC-F/10⁵ células sembradas
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
BMMNC
STRO- 1bright/CD34+
STRO- 1bright/CD34-
STRO- 1bright/CD45+
STRO- 1bright/CD45-
STRO- 1bright/GlyA+
STRO- 1bright/GlyA-

Figura 7

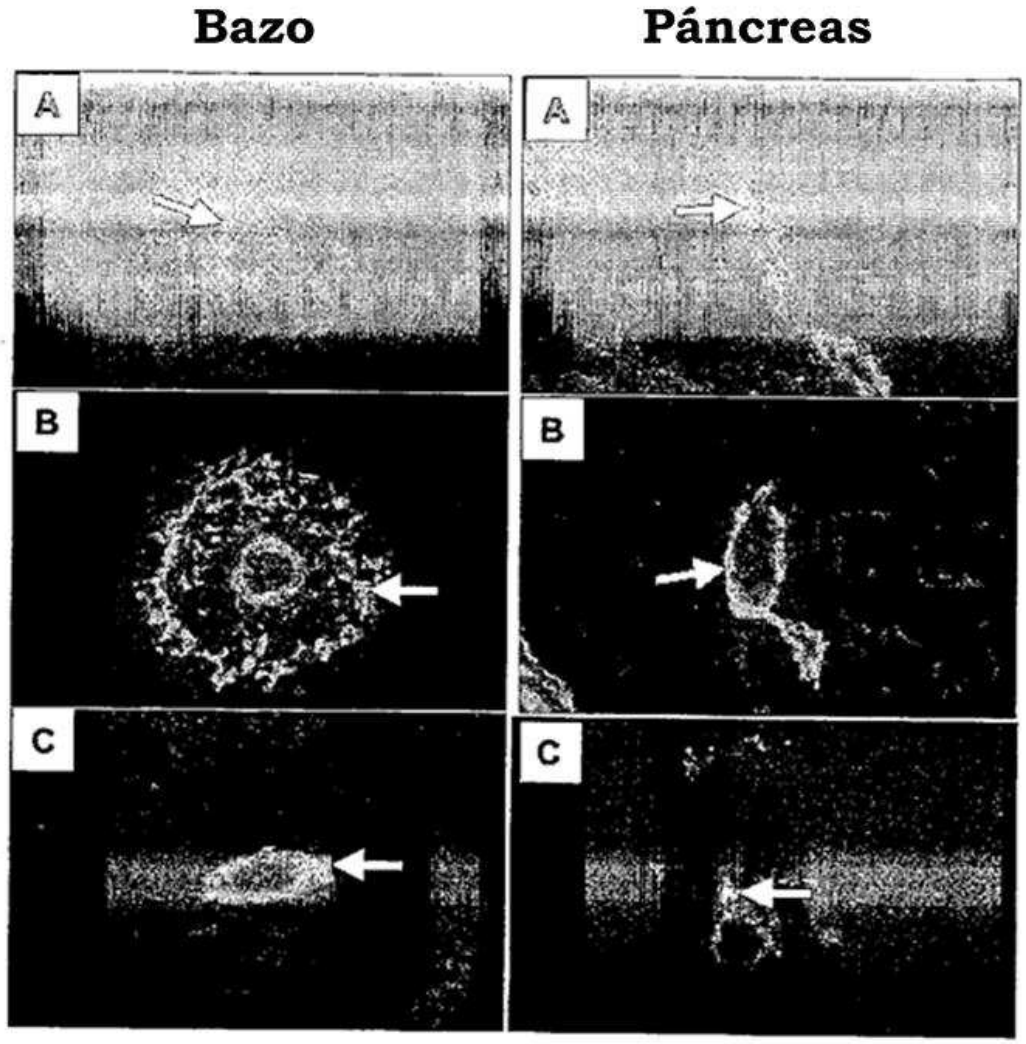


Figura 8 Panel 1

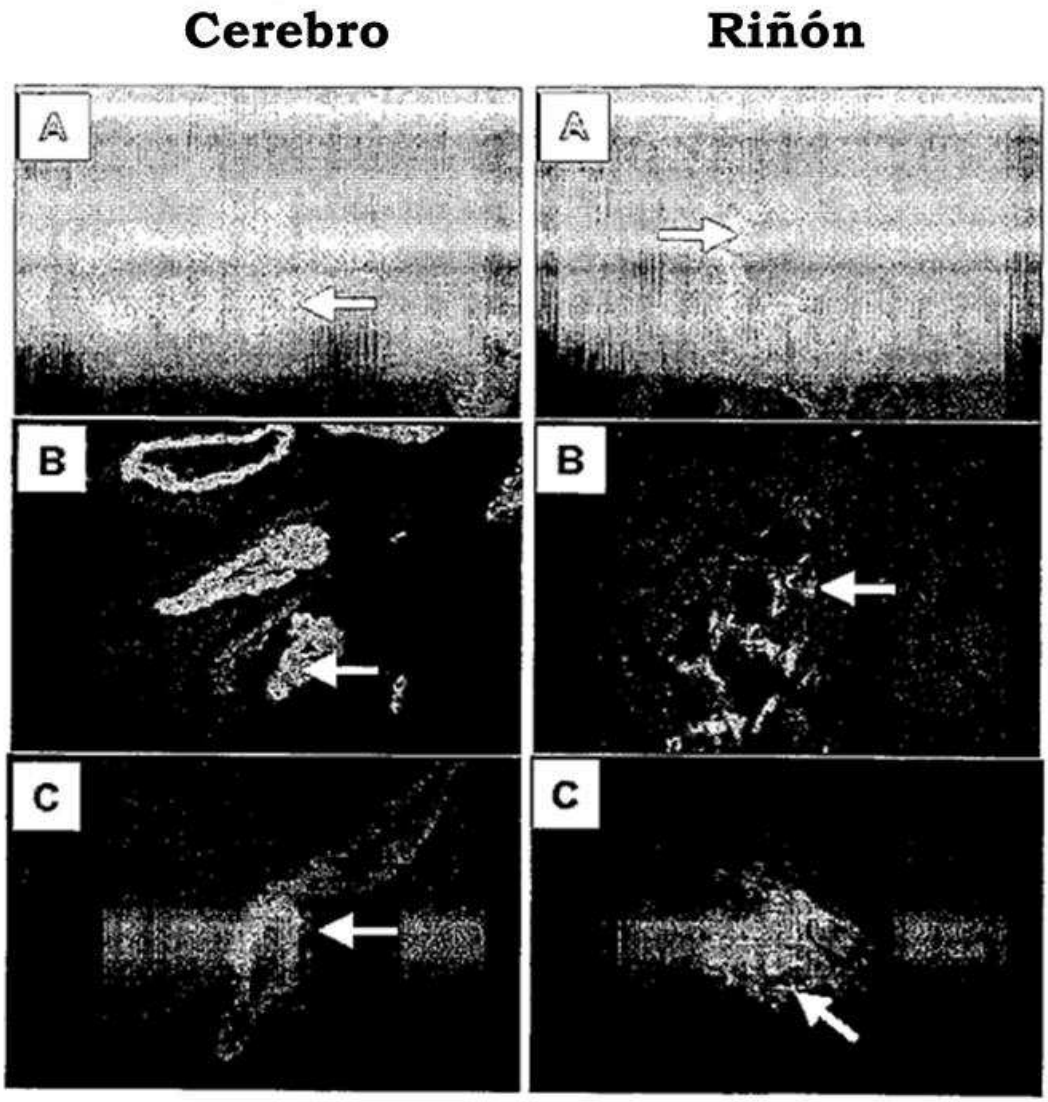


Figura 8 Panel 2

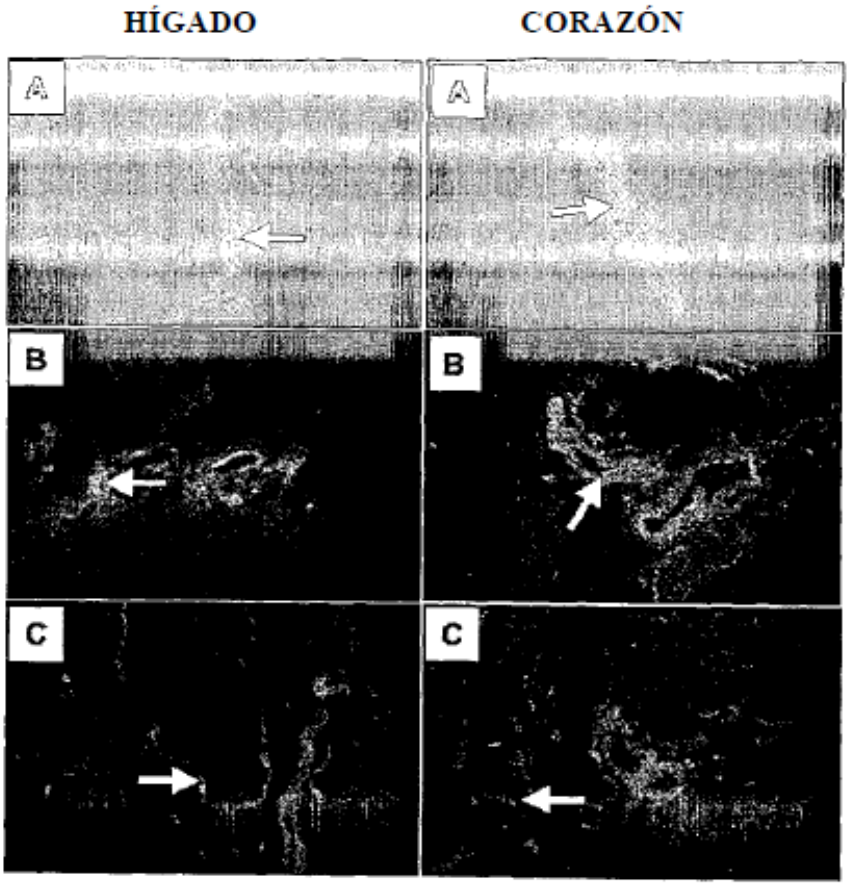


FIGURA 8 PANEL 3

PIEL

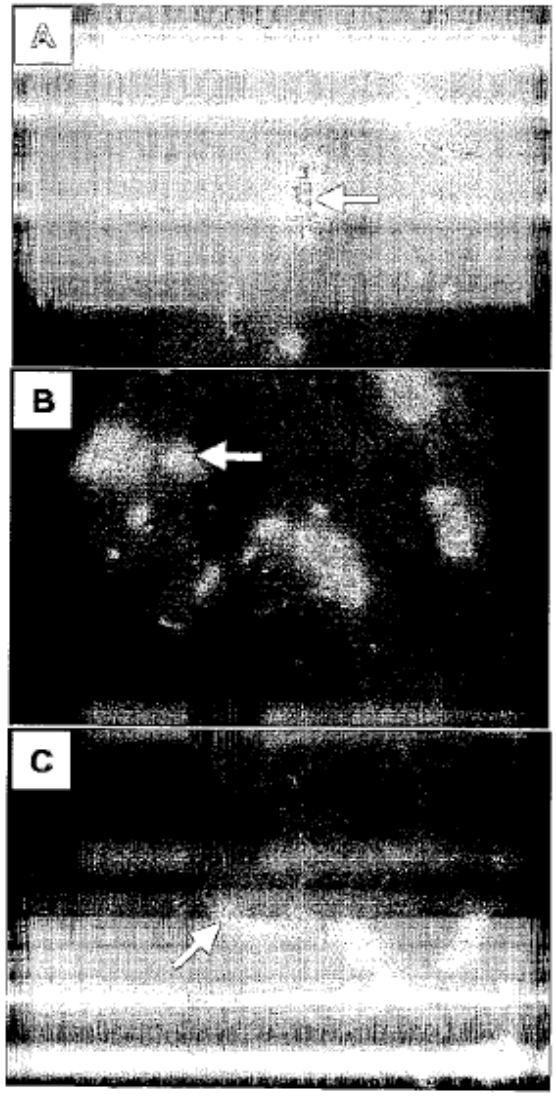


FIGURA 8 PANEL 4

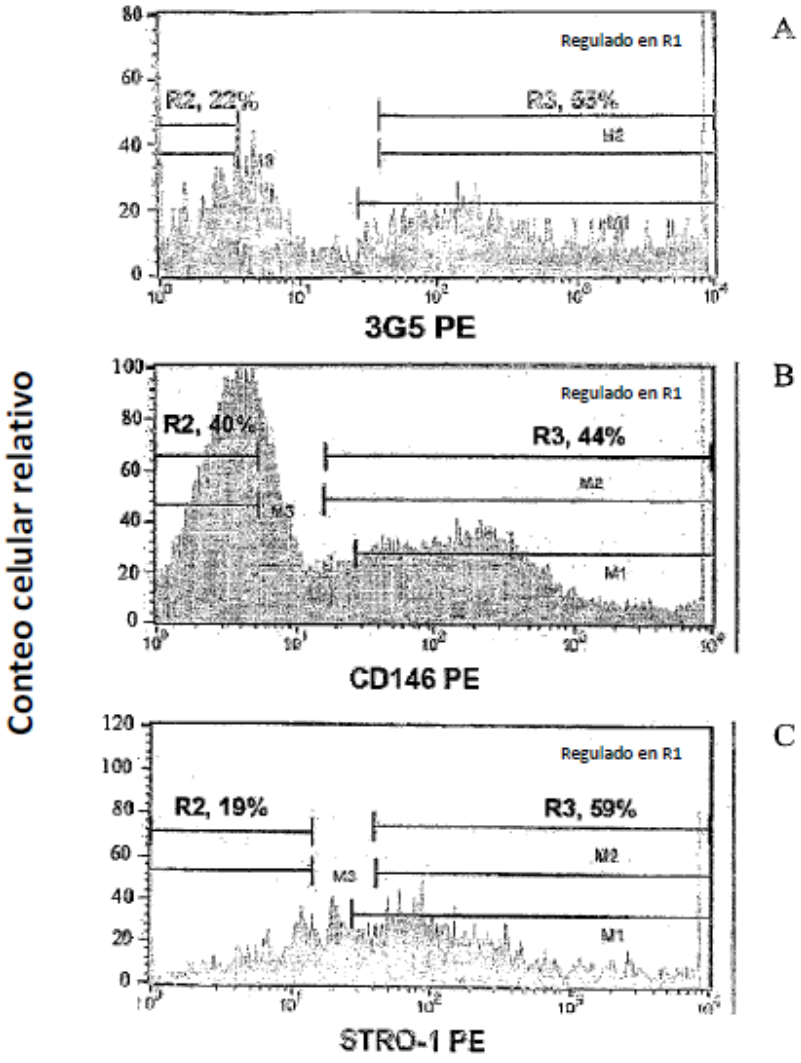

A
Regulado en R1
R2, 22%
R3, 33%
M2
M3
M1
3G5 PE
B
Regulado en R1
R2, 40%
R3, 44%
M2
M3
M1
CD146 PE
C
Regulado en R1
R2, 19%
R3, 59%
M2
M3
M1
STRO-1 PE
Conteo celular relativo

FIGURA 9

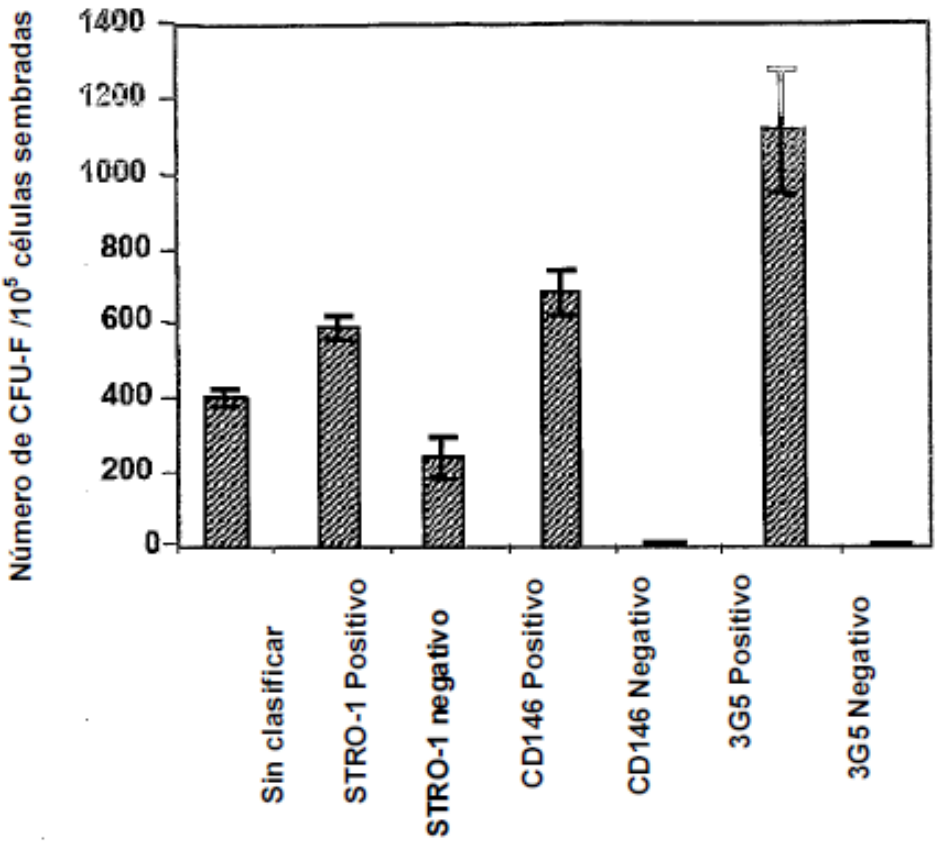

Número de CFU-F /10^5 células sembradas
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Sin clasificar
STRO-1 Positivo
STRO-1 negativo
CD146 Positivo
CD146 Negativo
3G5 Positivo
3G5 Negativo

FIGURA 10

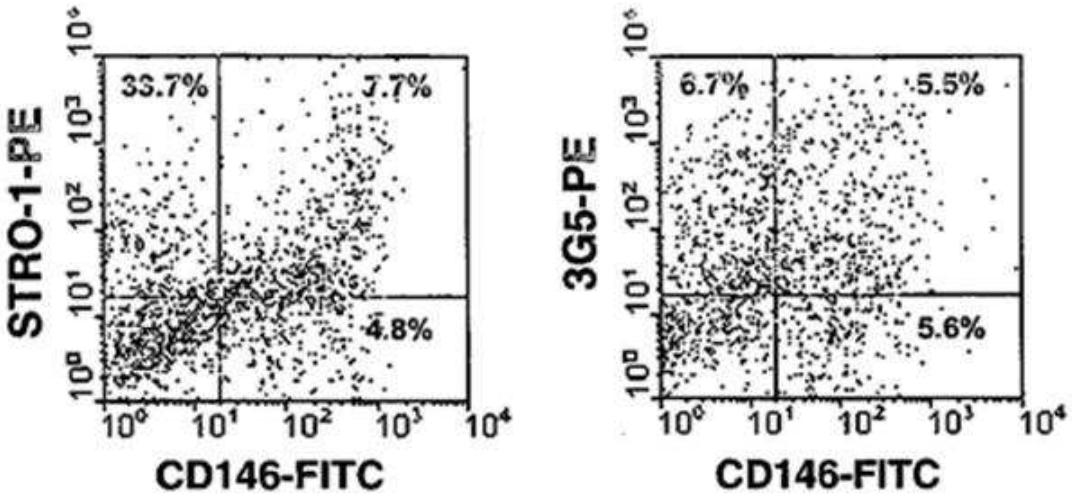


Figura 11

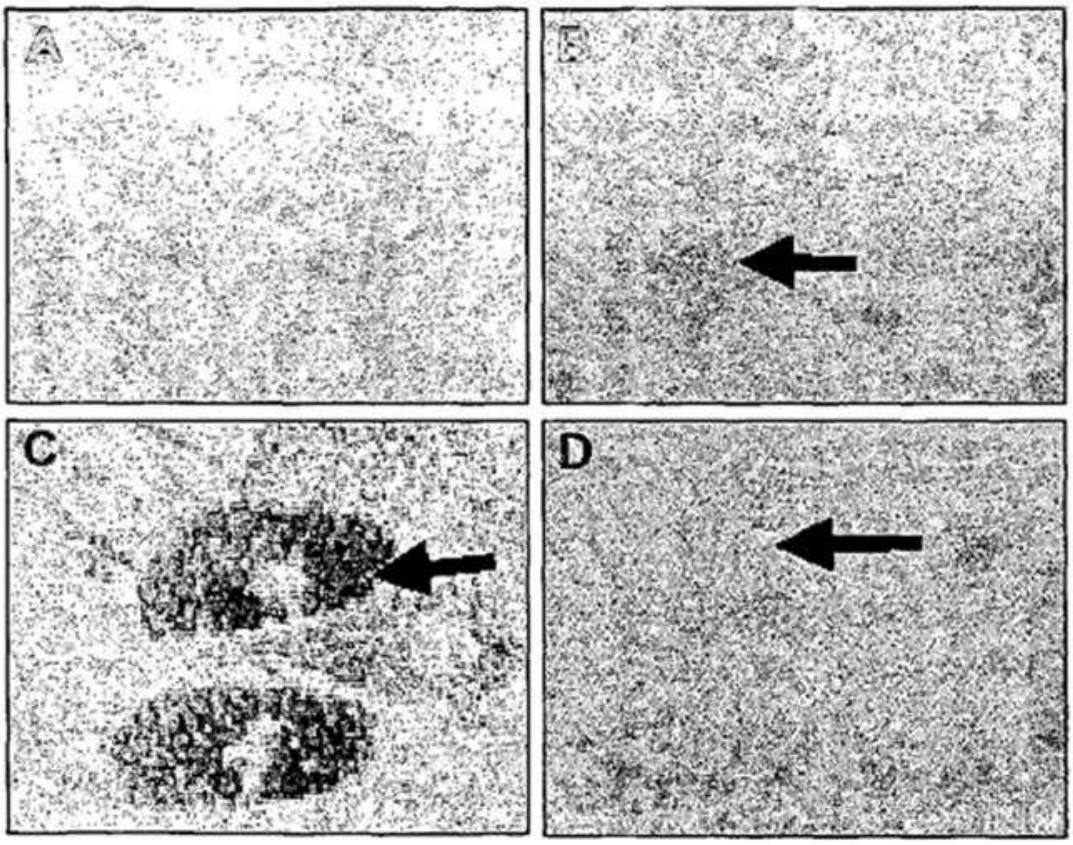


Figura 12

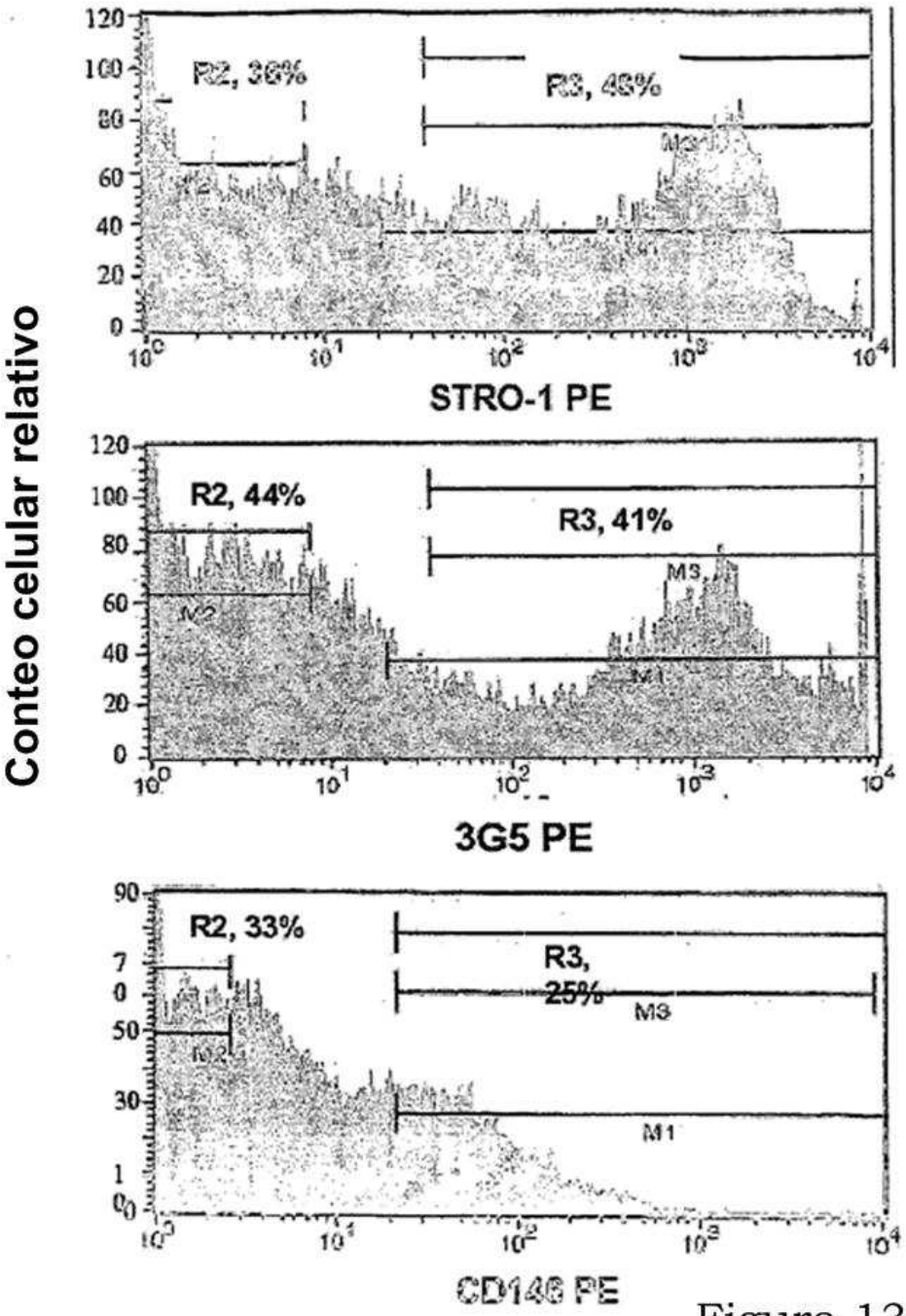

Conteo celular relativo
R2, 36%
R3, 46%
M3
M2
STRO-1 PE
R2, 44%
R3, 41%
M3
M2
M1
3G5 PE
R2, 33%
R3,
25%
M3
M2
M1
CD146 PE

Figura 13

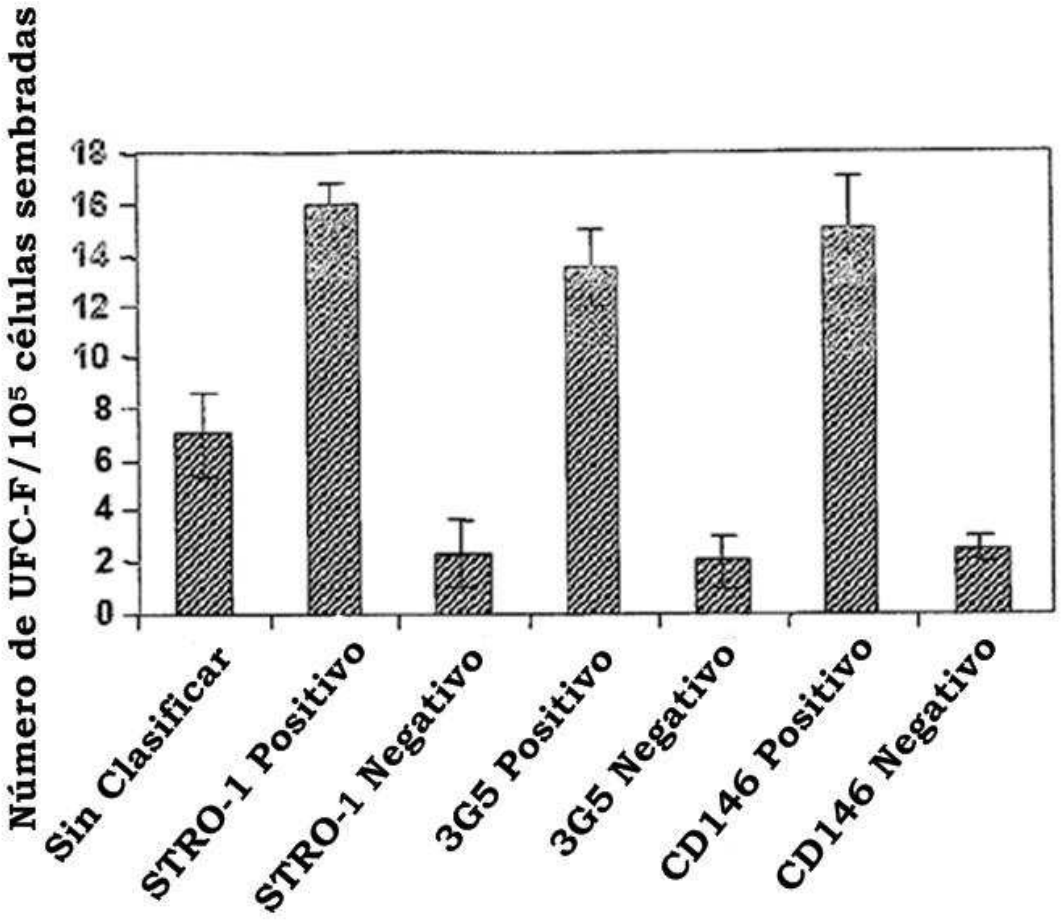

Número de UFC-F/10⁵ células sembradas
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Sin Clasificar
STRO-1 Positivo
STRO-1 Negativo
3G5 Positivo
3G5 Negativo
CD146 Positivo
CD146 Negativo

Figura 14

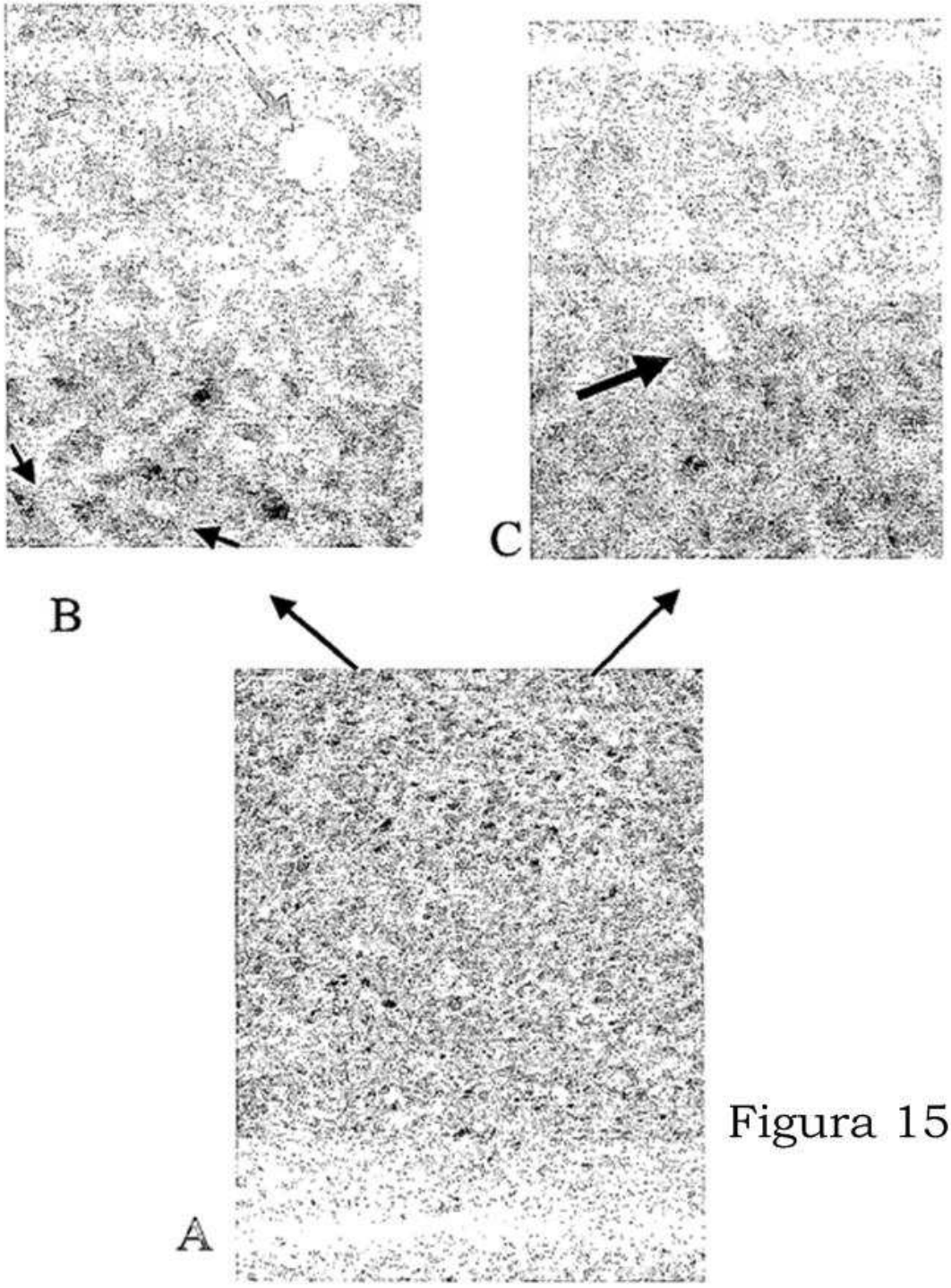


Figura 15

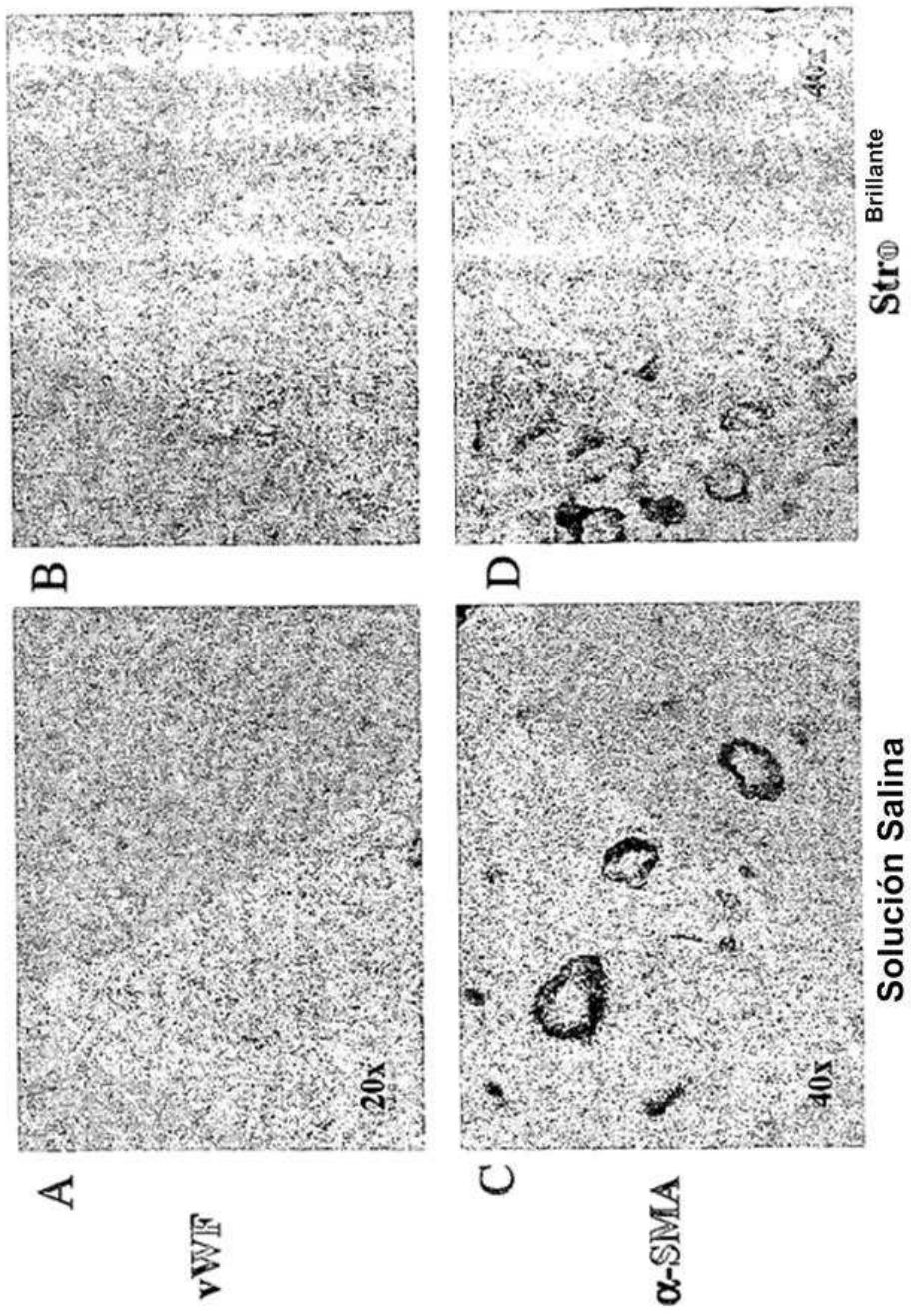


Figura 16

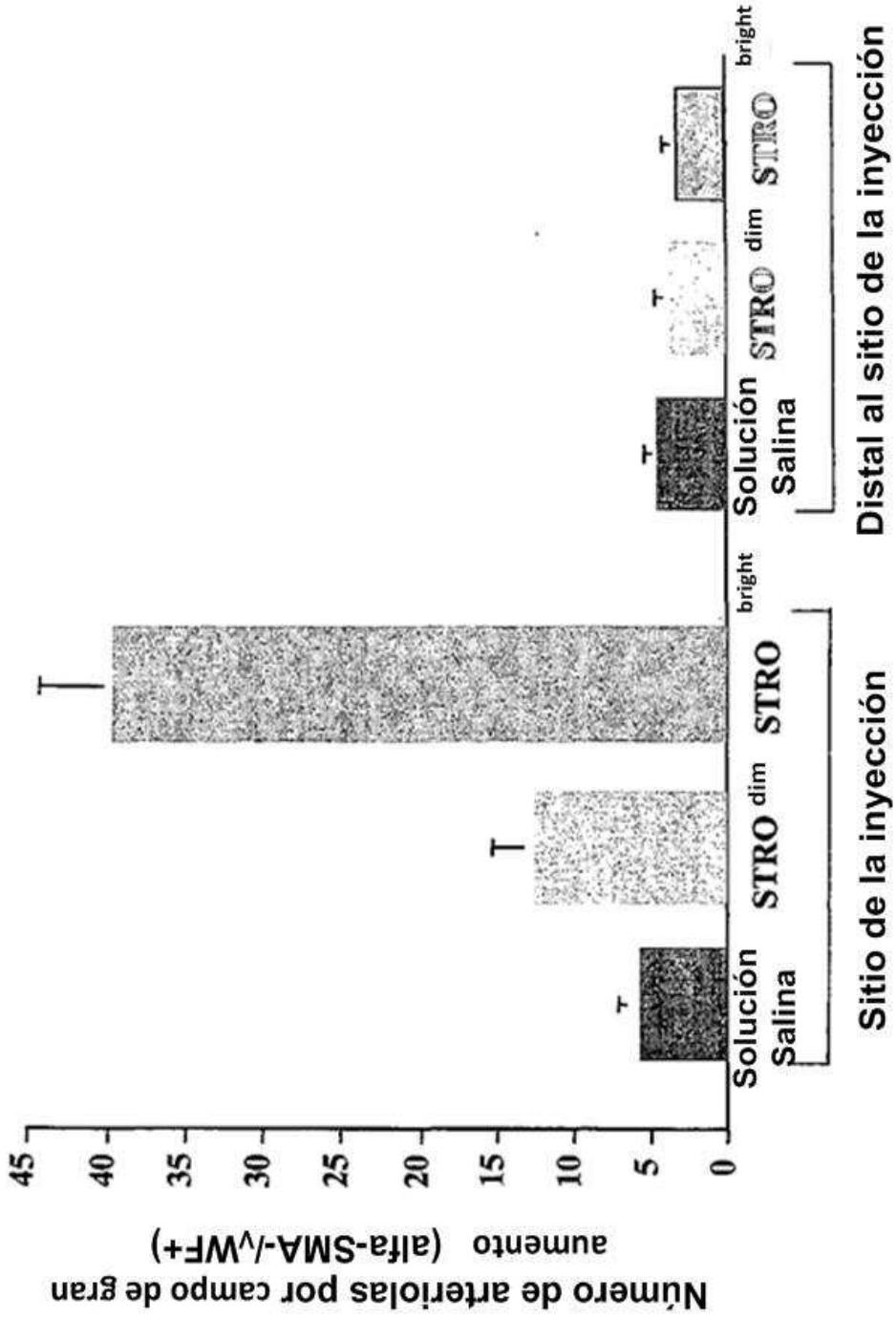

Número de arteriolas por campo de gran aumento (alfa-SMA-/vWF+)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Solución Salina
STRO dim
STRO bright
Sitio de la inyección
Solución Salina
STRO dim
STRO bright
Distal al sitio de la inyección

Figura 17

Figura 18

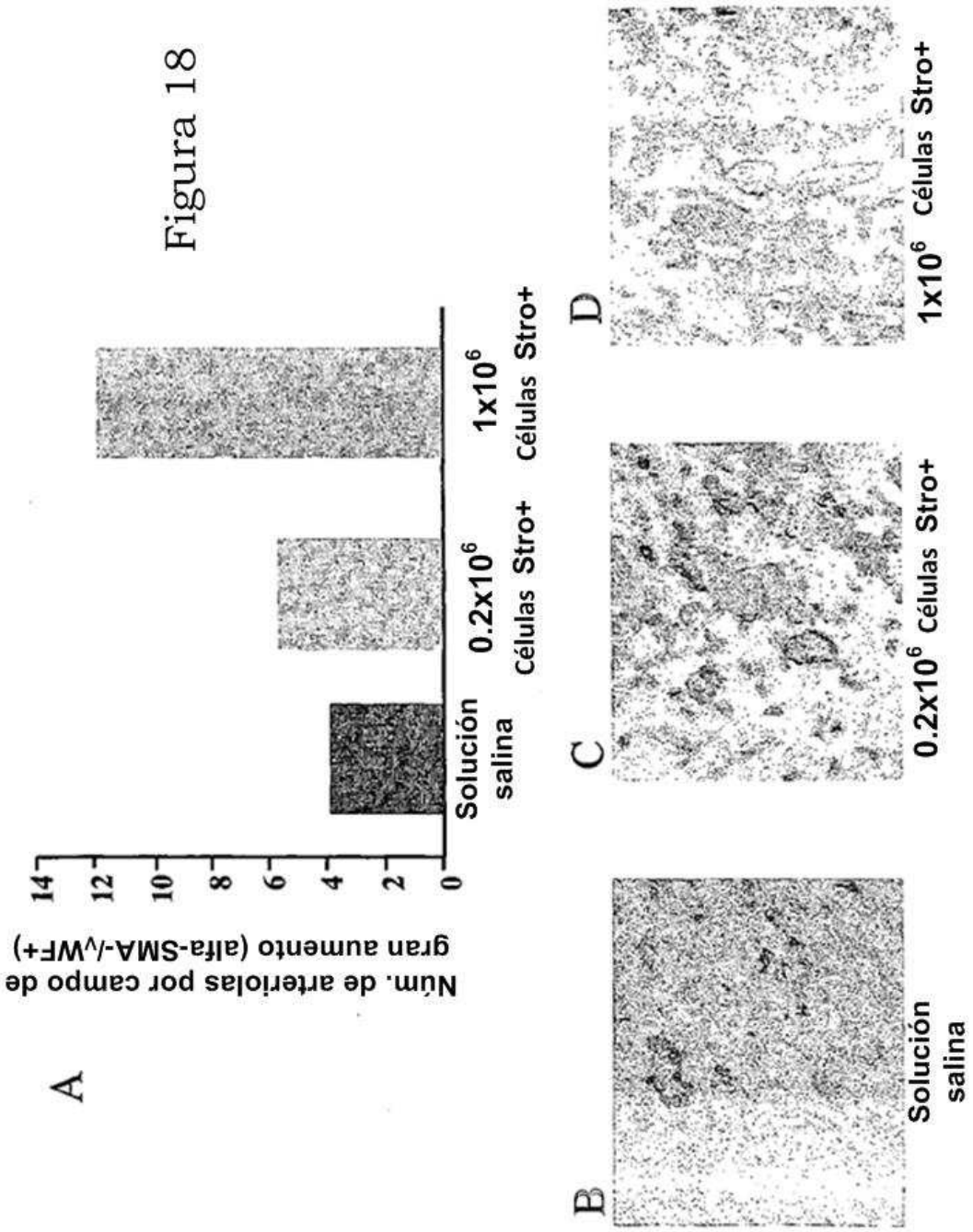

A
Núm. de arteriolas por campo de gran aumento (alfa-SMA-/vWF+)
0
2
4
6
8
10
12
14
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
B
Solución salina
C
0.2x10^6 Células Stro+
D
1x10^6 Células Stro+

Figura 19

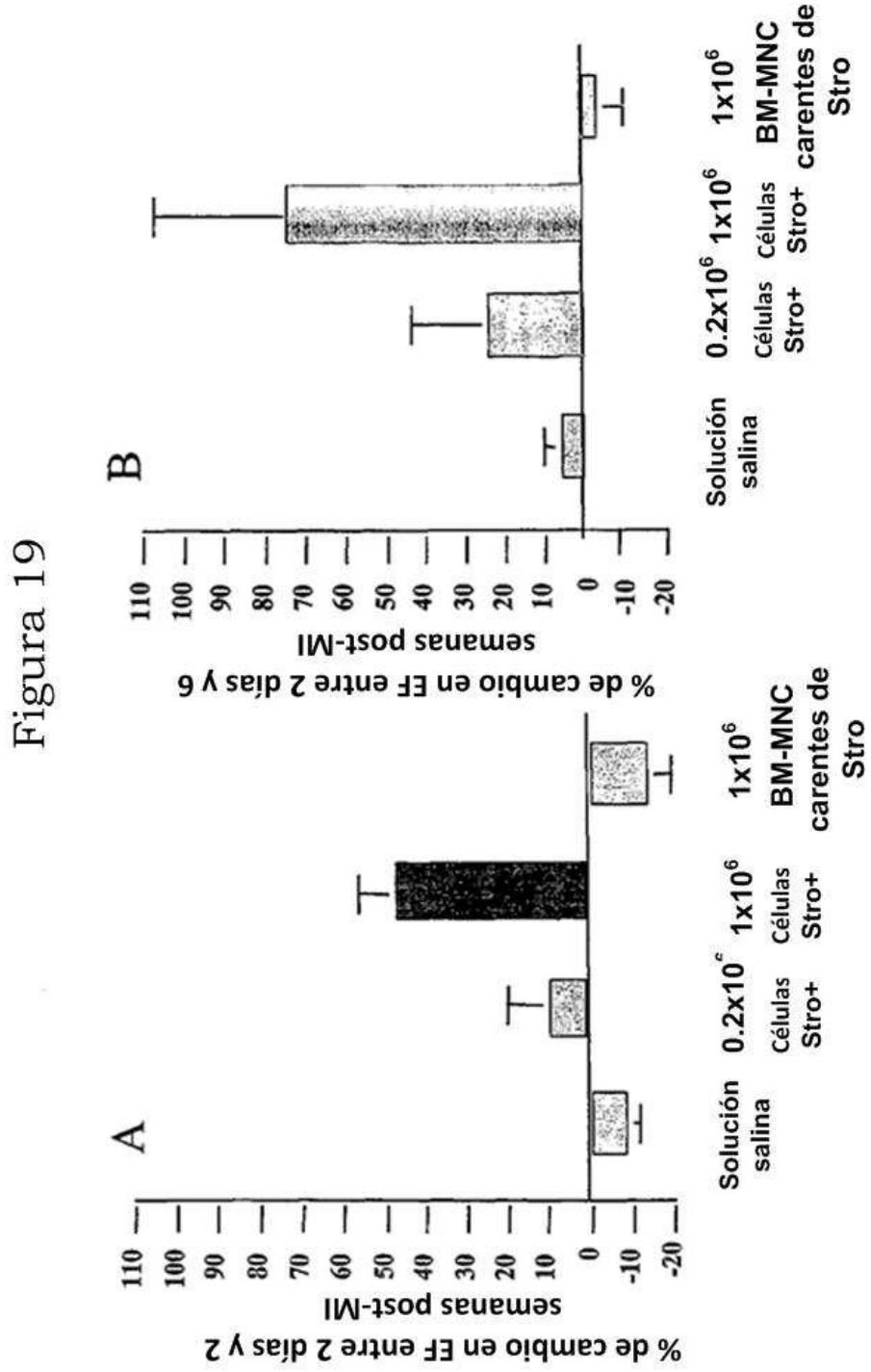
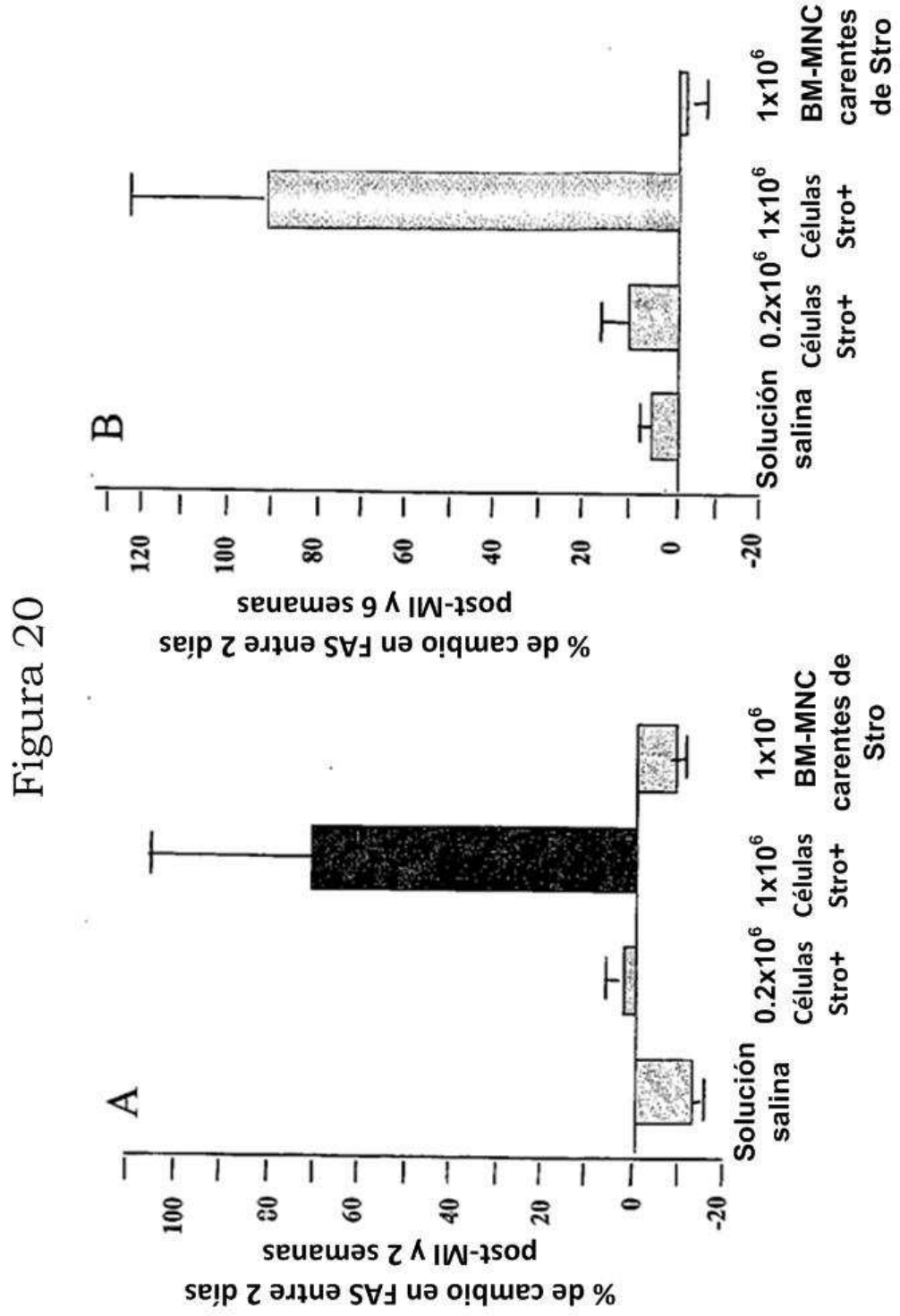

A
% de cambio en EF entre 2 días y 2
semanas post-MI
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro
B
% de cambio en EF entre 2 días y 6
semanas post-MI
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro

Figura 20


A
% de cambio en FAS entre 2 días post-MI y 2 semanas
100
80
60
40
20
0
-20
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro
B
% de cambio en FAS entre 2 días post-MI y 6 semanas
120
100
80
60
40
20
0
-20
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro

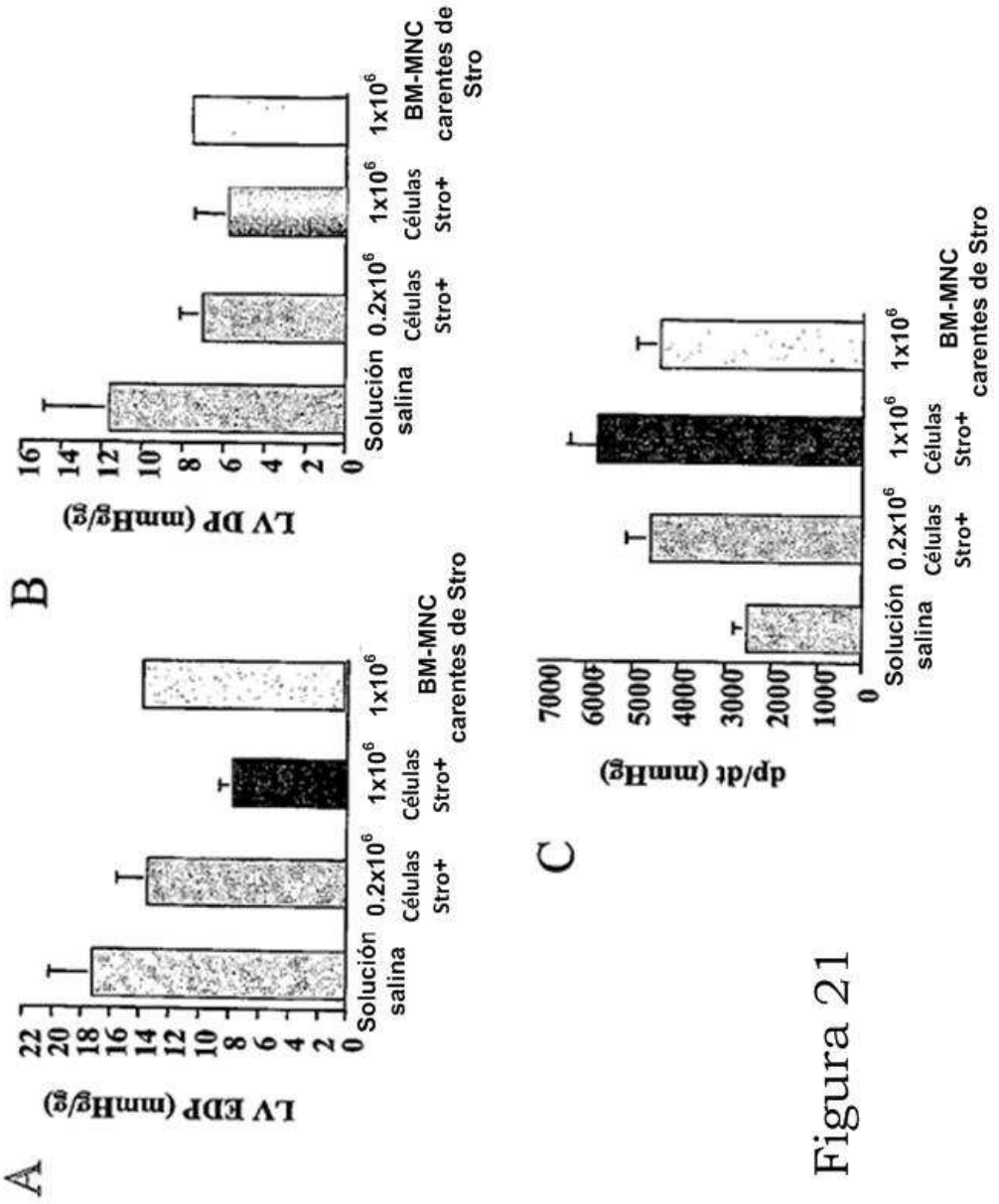

A
LV EDP (mmHg/g)
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro
B
LV DP (mmHg/g)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro
C
dp/dt (mmHg)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Solución salina
0.2x10^6 Células Stro+
1x10^6 Células Stro+
1x10^6 BM-MNC carentes de Stro

Figura 21

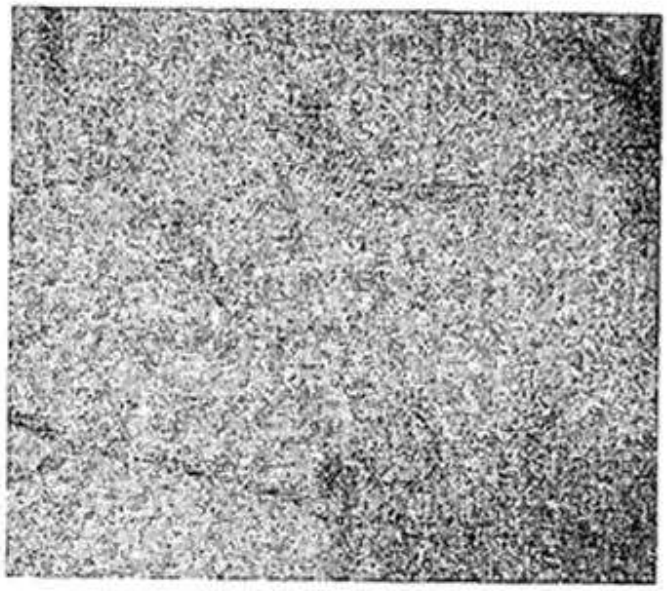
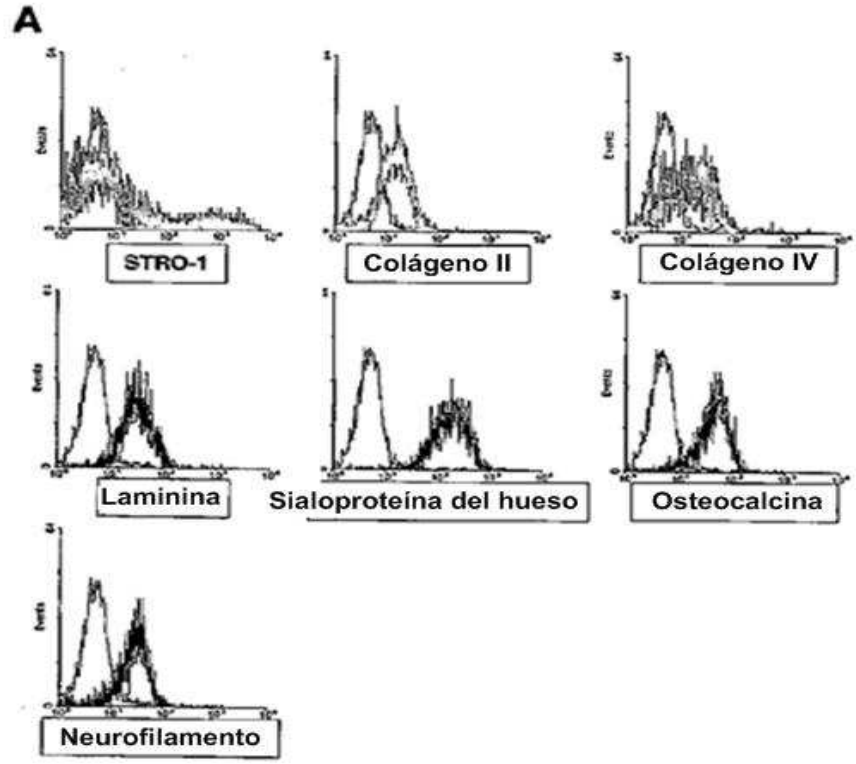


Figura 22


A
STRO-1
Colágeno II
Colágeno IV
Laminina
Sialoproteína del hueso
Osteocalcina
Neurofilamento

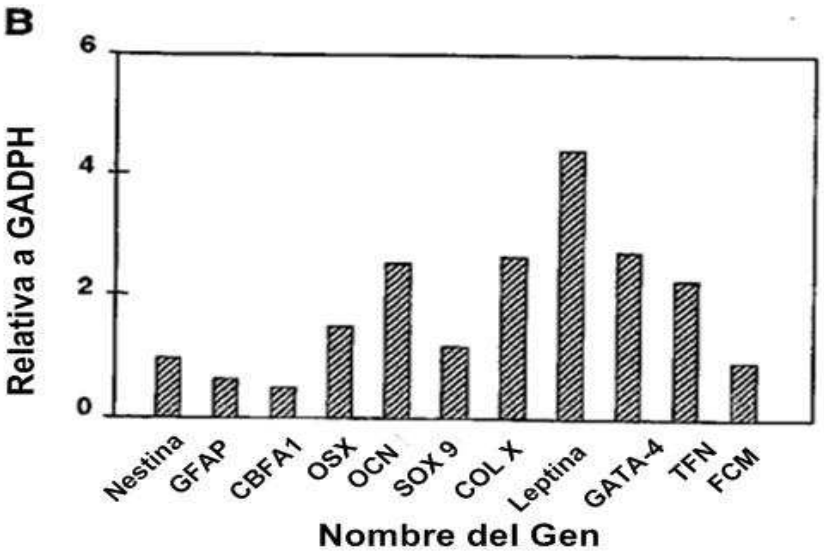

B
Relativa a GADPH
6
4
2
0
Nestina
GFAP
CBFA1
OSX
OCN
SOX 9
COL X
Leptina
GATA-4
TFN
FCM
Nombre del Gen

Figura 23