

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 520**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09772115 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2313772**

54 Título: **Aislamiento y/o identificación de células madre con potencial de diferenciación adipocitario, condrocitario y pancreático**

30 Prioridad:

30.06.2008 DE 102008032236

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

15.10.2014

73 Titular/es:

**EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN
(100.0%)
Universitätsklinikum Geissweg 3
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**BUEHRING, HANS-JOERG;
TREML, SABRINA y
LAMMERS, REINER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 507 520 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aislamiento y/o identificación de células madre con potencial de diferenciación adipocitario, condrocitario y pancreático

5 La presente invención se refiere al aislamiento y/o la identificación de células madre con potencial de diferenciación adipocitario, condrocitario y pancreático, así como al uso de estas células madre.

10 Las células madre mesenquimatosas (MSC), también denominadas células estromales mesenquimatosas, son células multipotentes, que tienen la capacidad de diferenciarse, en condiciones adecuadas *in vitro* e *in vivo*, en distintos tejidos mesenquimatosos. De este modo pueden diferenciarse por ejemplo en osteocitos, condrocitos, adipocitos, miocitos, y formar tejido óseo, cartilaginoso, graso y muscular. Además, pueden diferenciarse también en astrocitos, neuronas, células endoteliales, hepatocitos, células de tipo pancreático y células epiteliales de pulmón. Morfológicamente pueden diferenciarse en su fenotipo fibroblastoide, y pueden encontrarse en distintos tejidos

15 sanguíneos, en el músculo esquelético, la piel, el hígado, las encías y la placenta.

Las MSC expresan una serie de marcadores de superficie tales como por ejemplo CD105 (endoglina, SH2), CD73 (ecto-S¹-nucleotidasa, SH3, SH4), CD166 (ALCAM), CD29 (β1-integrina), CD44 (H-CAM) y CD90 (Thy-1), que se encuentran en parte también en células endoteliales, epiteliales, así como en células musculares. Las MSC pueden diferenciarse también de las células madre hematopoyéticas, dado que las MSC no expresan los marcadores CD45, CD34 y CD133 específicos para células madre hematopoyéticas.

20

Las células madre mesenquimatosas tienen la propiedad de adherirse de manera rápida y estable sobre superficies de plástico o de vidrio, y de formar fibroblastos formadores de colonias ("*colony forming units*" (unidades formadoras de colonias) (CFU-F)). Estos últimos son sin embargo heterogéneos con respecto a sus capacidades de proliferación y de diferenciación.

25

Las células madre mesenquimatosas con un potencial de diferenciación determinado son de gran interés en la medicina y en la investigación: pueden obtenerse en particular a partir de la médula ósea, incluso en aquellos seres humanos más mayores, tienen una alta tasa de participación y pueden diferenciarse tal como se mencionó en células de tejido de origen mesenquimatoso. Por lo tanto, por ejemplo en el contexto de terapias con células madre, pueden servir directamente para el tratamiento de enfermedades degenerativas de órganos tales como huesos, cartílagos, tendones, músculos, tejido conjuntivo, células sanguíneas, etc.

30

Para la obtención o el aislamiento de células madre mesenquimatosas se usan actualmente células de médula ósea no fraccionadas como material de partida, que se cultivan sobre cubetas de plástico, las MSC se identifican a través de su adhesión a la superficie de plástico, y las células hematopoyéticas no adheridas se eliminan de la muestra. Las células obtenidas de esta manera están sin embargo poco definidas y no se diferencian sólo en poblaciones de MSC heterogéneas, sino también en osteoblastos, y/o en células precursoras de osteoblastos, en células grasas, en células de retículo, en macrófagos y células endoteliales. Un tratamiento específico de enfermedades degenerativas de un órgano es por tanto difícil con MSC sin un potencial de diferenciación determinado o imposible debido a posibles efectos secundarios.

35

El aislamiento de células madre mesenquimatosas con un potencial de diferenciación muy determinado no es posible hasta el momento o se desconoce en el estado de la técnica. Un aislamiento de este tipo ofrecería sin embargo tal como se ha mencionado, la gran ventaja de que las células madre identificadas de esta manera podrían utilizarse de manera controlada para la terapia/el tratamiento de tejido enfermo, degenerado o dañado, en el que se diferencian las células madre aisladas específicamente de esta manera.

40

De este modo podrían tratarse por ejemplo daños en cartílago, porque se añaden células madre mesenquimatosas aisladas específicamente con potencial de diferenciación condrogénico o bien directamente *in situ* al tejido afectado, donde se diferencian para dar condrocitos, y de esta manera sustituyen al tejido dañado (terapia con células madre). Por otro lado, también una diferenciación en condrocitos *in vitro* puede ser de interés, cuando, por ejemplo para la investigación/el diagnóstico/la medicina deben obtenerse condrocitos diferenciados.

45

En este contexto existe un gran interés en células madre mesenquimatosas con un potencial de diferenciación determinado, en particular para utilizar las mismas en usos correspondientes.

Por lo tanto es objetivo de la presente invención proporcionar nuevas rutas con las que puedan aislarse células madre mesenquimatosas con un potencial de diferenciación determinado.

50

De acuerdo con la invención este objetivo se resuelve mediante el uso de un anticuerpo, que se une al antígeno TNAP (*Tissue non-specific Alkaline Phosphatase*; fosfatasa alcalina no específica de tejido); en particular el objetivo se resuelve mediante el uso de un anticuerpo, o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno

55

TNAP, en combinación con un anticuerpo, o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56, para el aislamiento de células madre con potencial de diferenciación adipocitario, condrocitario y pancreático.

5 El objetivo se resuelve así mismo mediante un procedimiento para el aislamiento y/o la diferenciación de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación condrocitario, adipocitario o pancreático, en el que se utilizan los anticuerpos de unión frente a TNAP y frente a CD56.

10 Así mismo la divulgación se refiere a las células madre aisladas de esta manera y a su uso, en particular en la terapia.

15 El objetivo en el que se basa la invención se resuelve de esta manera por completo. Los inventores de la presente solicitud pudieron mostrar en algunos ensayos que con el uso de los anticuerpos mencionados es posible aislar células madre mesenquimatosas de manera específica, que a continuación se diferencian en condrocitos, adipocitos, o células de tipo pancreático.

20 Los inventores pudieron determinar en particular que las células madre mencionadas pueden aislarse y/o identificarse específicamente a través del antígeno TNAP. Esta isoforma de la ectoenzima "fosfatasa alcalina" se denomina debido a su existencia también como "fosfatasa alcalina de hígado/hueso/riñón". Las tres isoformas adicionales son fosfatasa alcalina de intestino, de placenta y de tipo placenta. La TNAP se diferencia de las otras isoformas por modificaciones postraduccionales y por la localización génica.

25 Por lo tanto se proporciona por primera vez una herramienta con la que pueden obtenerse células madre mesenquimatosas, que se diferencian de manera específica. Esto no era posible hasta el momento en el estado de la técnica.

30 Es decir, debido al nuevo uso y al nuevo procedimiento pueden proporcionarse células madre mesenquimatosas, que por ejemplo pueden utilizarse a su vez de manera ventajosa en la terapia y la profilaxis pero también en el diagnóstico y la investigación. De este modo las células madre aisladas de esta manera pueden utilizarse en particular para el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por un tejido degenerado, dañado o herido, por ejemplo en el contexto de una terapia con células madre: las células madre aisladas por medio del procedimiento de acuerdo con la invención se trasplantan para ello al tejido afectado (por ejemplo también en relación con implantes determinados), y se diferencian allí en el tejido correspondiente. Esta manera se regenera el tejido degenerado y vuelve a ser funcional de nuevo.

35 En un perfeccionamiento del uso de acuerdo con la invención se prefiere a este respecto cuando el anticuerpo anti-TNAP se selecciona del grupo:

- 40 - el anticuerpo W8B2 que se produce por la línea celular con el número ACC 2567 depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,
- fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, que se unen al antígeno TNAP, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567, y
- 45 - un anticuerpo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567.

50 El anticuerpo W8B2 específico de TNAP ha dado buenos resultados en otros estudios como marcador para células madre mesenquimatosas; de este modo los inventores pudieron mostrar en otra invención del solicitante (documento DE 10 2006 043 625) que por medio del anticuerpo W8B2 es posible aislar células madre mesenquimatosas a partir de tejido primario. No obstante hasta el momento no se conocía que con una combinación de anticuerpos, que están dirigidos frente a TNAP y CD56, pueden obtenerse células madre mesenquimatosas con potenciales de diferenciación muy determinados. Las células que producen el anticuerpo W8B2 se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) de acuerdo con el Tratado de Budapest. El anticuerpo se obtuvo mediante una inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de retinoblastoma WERI-RB-1. Originalmente el antígeno reconocido por el anticuerpo W8B2 como célula madre mesenquimatosas se había denominado antígeno-1; entre tanto el antígeno que se reconoce por el anticuerpo W8B2, se había identificado como TNAP, por lo que en el presente caso se seleccionó la denominación correcta y oficial del antígeno.

60 En una forma de realización preferida el anticuerpo de unión a CD56 se selecciona del grupo:

- el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930,
- 65 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, que se unen a CD56, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930,

- un anticuerpo, que se une al mismo antígeno que el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930, y
- un anticuerpo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930.

El anticuerpo 39D5, que se había depositado así mismo en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen de acuerdo con el Tratado de Budapest con el número ACC 2930, se obtuvo mediante una inmunización de ratones Balb/c con la línea celular hematopoyética KG-1a.

En una forma de realización del uso de acuerdo con la invención se prefiere cuando para la combinación de un anticuerpo anti-TNAP y un anticuerpo dirigido frente a CD56 se utiliza adicionalmente también un anticuerpo dirigido frente a CD271, o fragmentos funcionales del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-CD271 en forma conjugada se conocen en el estado de la técnica y pueden obtenerse por ejemplo de Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania.

El antígeno CD271 que se conoce también como LNGFR (*“low-affinity nerve growth factor receptor”* (receptor de factor de crecimiento de baja afinidad)) o p75 NTR (receptor de neurotrofina), pertenece a los receptores de neurotrofina con baja afinidad y a la superfamilia de los receptores de factor de necrosis tumoral. Originalmente se describió CD271 (LNGFR) como marcador de células del sistema nervioso, dado que CD271 (LNGFR) se encuentra en el sistema nervioso central y periférico en neuronas autónomas y sensoriales. Además CD271 se expresa también en oligodendrocitos, astrocitos y células de Schwann. Así mismo CD271 (LNGFR) se encuentra también en determinadas MCS.

En el presente caso los términos “fragmentos funcionales” tal como se usan en la solicitud significarán sustancias, que representan partes/secciones de los anticuerpos dados a conocer y que tendrán y mostrarán aún las propiedades funcionales, en particular las propiedades de unión celular de los anticuerpos, de los que se derivan. A este respecto estos fragmentos pueden utilizarse o bien como tal o bien en combinación con otros fragmentos; en el contexto de la presente invención se entenderán por estos últimos por ejemplo también anticuerpos anti-W8B2 o 39D5 modificados, que se adaptaron, por ejemplo se humanizaron para utilizaciones y usos correspondientes en el ser humano.

Los anticuerpos adecuados para los fines de la presente invención son preferentemente monoclonales, pudiendo obtenerse anticuerpos dirigidos frente a TNAP o CD56 adicionales con el uso de los anticuerpos W8B2 y 39D5. Köhler und Milstein publicaron una guía para la obtención de anticuerpos monoclonales (*“Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”*, Nature, (1975), 256:495-497).

En el presente caso significan también fragmentos de aquellos anticuerpos, tales como por ejemplo fragmentos Fab, F(ab)₂ o scFv, y otros fragmentos tales como CDR (*“complementarity-determining region”* (región determinante de la complementariedad), región hipervariable) como anticuerpos en el sentido y en el contexto de la presente invención, siempre que tengan su funcionalidad, es decir, las propiedades de unión específicas como los anticuerpos “completos” de los que se derivan. Tales fragmentos de anticuerpos pueden producirse por ejemplo también de manera recombinante con el uso de procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

Por lo tanto se entiende también que los anticuerpos W8B2 y 39D5 pueden humanizarse por otro lado también de manera correspondiente, y en el contexto de la invención dada a conocer en este caso, para el uso y/o el procedimiento de acuerdo con la invención, en particular también para una terapia con células madre.

Los anticuerpos humanizados pueden ser por ejemplo anticuerpos quiméricos, en los que las regiones constantes del anticuerpo animal (por ejemplo de anticuerpos de ratón o de conejo) se sustituyeron por las regiones correspondientes de anticuerpos humanos, por ejemplo los fragmentos Fc (Sharon y col., Nature, (1984), 309:364-367). Como alternativa puede unirse también la CDR de los anticuerpos animales con anticuerpos humanos, este proceso se denomina *“reshaping”* (remodelación) de anticuerpos. En un procedimiento distinto adicional se producen anticuerpos humanos en animales transgénicos.

Así mismo la divulgación se refiere a un uso de los anticuerpos, por ejemplo en forma humanizada, o fragmentos funcionales de los mismos, en el que éstos se aplicaron o introdujeron en dispositivos médicos implantables correspondientes, y se implantaron junto con el dispositivo en el paciente que va a tratarse en los sitios/tejidos defectuosos que van a tratarse. En los sitios que van a tratarse se reclutan entonces a través de los anticuerpos células madre mesenquimatosas, que se fijan en el implante, se diferencian y forman así nuevo tejido. Dispositivos médicos adecuados son en este sentido cualquier implante biocompatible, endoprótesis, por ejemplo endoprótesis vasculares, etc. de cualquier tipo que, o bien se introducen de manera permanente o de manera temporal en el paciente. Los dispositivos pueden componerse también opcionalmente por materiales completa o parcialmente

reabsorbibles y presentar además de los anticuerpos sustancias activas terapéuticas adicionales, que habitualmente se utilizan en implantes/trasplantes que van a introducirse en un organismo.

5 Tal como ya se mencionó adicionalmente en lo anterior, la presente invención se refiere también a un procedimiento para el aislamiento y/o la identificación de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación adipocitario, presentando las siguientes etapas.

10 a) poner en contacto una muestra, que contiene células madre mesenquimatosas, con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP,

b) poner en contacto la muestra de la etapa a) con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56, y

15 c) aislar y/o identificar células a las que se ha unido el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP, pero no al anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56.

20 Es decir, con esta forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención pueden obtenerse células madre, que se diferencian de manera controlada en adipocitos. Estas pueden utilizarse a su vez para fines muy determinados, ya sea en la investigación o en la medicina.

Así mismo la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y/o la identificación de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación condrocitario o pancreático, presentando el procedimiento las siguientes etapas:

25 a) poner en contacto una muestra que contiene células madre mesenquimatosas, con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP,

30 b) poner en contacto la muestra de la etapa a) con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56, y

c) aislar y/o identificar células a las que se han unido tanto el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP, como el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56.

35 Con esta forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención pueden identificarse y/o aislarse células madre, que tienen un potencial de diferenciación condrogénico o pancreático. Las células madre obtenidas de esta manera pueden entonces utilizarse o bien directamente en el contexto de una terapia con células madre (terapia autóloga o alogénica) donde se diferencian *in situ* en condrocitos o células de tipo pancreático, y por lo tanto pueden regenerar tejido cartilaginoso o tejido pancreático degenerado o dañado.

40 Por otro lado las células madre mesenquimatosas obtenidas con el procedimiento de acuerdo con la invención con potencial de diferenciación condrogénico/pancreático también puede diferenciarse también en primer lugar *in vitro* en condrocitos/células de tipo pancreático, y a continuación utilizarse para el tratamiento de tejido enfermo o degenerado.

45 En particular en los últimos años se ha desarrollado el trasplante de condrocitos autólogos para una intervención preferida para el tratamiento de defectos de cartílago (de articulación) de disco intervertebral y rodilla, en el que se regenerará el cartílago hialino. Para ello se extraen muestras del paciente a través de una artroscopia de una parte de la articulación no dañada, y se cultivan las células de cartílago contenidas en la misma en el laboratorio sobre matrices especiales. El tejido que se genera de esta manera, es decir el nuevo cartílago, se trasplanta entonces mediante una segunda operación cuidadosa con el tejido en la articulación enferma/degenerada.

50 Con el procedimiento de acuerdo con la invención es ahora posible por primera vez, aislar de manera controlada células madre con por ejemplo potencial de diferenciación condrogénico a partir del tejido de un paciente, y conseguir un cultivo rápido, eficiente y controlado de tejido de condrocitos, para el trasplante posterior en el donante de muestra (trasplante autólogo) o en otro receptor (trasplante alogénico).

55 En el procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere a este respecto cuando el anticuerpo anti-TNAP utilizado en la etapa a) se selecciona del grupo:

60 - el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567,

- fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, que se unen al antígeno TNAP, y

- anticuerpos, que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567.

5 Además, en un perfeccionamiento del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere cuando el anticuerpo que se une a CD56 utilizado en la etapa b) se selecciona del grupo:

- el anticuerpo 39D5 que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen número ACC 2930,
- 10 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, que se unen a CD56, y
- anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 39D5 que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930.

15 En una forma de realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere a este respecto cuando presenta la etapa adicional c'):

- 20 c') poner en contacto la muestra de la etapa b) con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD271.

A este respecto en el procedimiento de acuerdo con la invención puede estar previsto de acuerdo con la invención cuando las etapas a), b) y c') se llevan a cabo simultáneamente, de manera sucesiva, en un orden mixto o en orden inverso.

25 Los inventores han establecido en ensayos propios, que con el uso de los anticuerpos W8B2 y 39D5 en un procedimiento para el aislamiento/identificación de células madre mesenquimatosas podía obtenerse un enriquecimiento controlado de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación condrogénico/adipocitario o pancreático.

30 La presente invención se refiere además a células madre TNAP⁺ y CD56⁺ que se aislaron y/o identificaron con el procedimiento de acuerdo con la invención para el aislamiento y/o la identificación de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación condrocitario o pancreático, para la aplicación para la terapia, el diagnóstico o la investigación.

35 La divulgación se refiere a una forma de realización en la que se utilizan las células madre TNAP⁺ CD56⁺ obtenidas con el procedimiento de acuerdo con la invención para la generación definida de condrocitos, adipocitos y células de tipo pancreático, concretamente *in vivo* o *in vitro*.

40 Así mismo en una forma de realización adicional se prefiere cuando las células madre TNAP⁺ CD56⁺ aisladas y/o identificadas con el procedimiento de acuerdo con la invención, que se diferenciaron en condrocitos, adipocitos y células de tipo pancreático, pueden utilizarse para la terapia y/o la profilaxis de tejido degenerado o susceptible.

45 En particular se prefiere cuando las células madre TNAP⁺ CD56⁺ obtenidas con el procedimiento de acuerdo con la invención se utilizan para aplicación para la terapia y/o la profilaxis de daños, degeneraciones o enfermedades en cartílago y/o huesos, en particular de la rodilla y de los discos intervertebrales, o para la artritis reumatoide. La artritis reumatoide representa una enfermedad autoinmunitaria, y también en el caso de esta enfermedad puede utilizarse el uso de células madre para la sustitución de tejido (es decir para la denominada "*tissue repair*" (reparación de tejido)).

50 La invención se refiere así mismo a una composición farmacéutica así como a un kit, que presenta una combinación del anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567, o fragmentos de la misma, y del anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen número ACC 2930, o fragmentos de la misma.

55 Así mismo la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene células madre TNAP⁺ CD56⁺ que se aislaron y/o identificaron de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención, así como al menos un vehículo y/o sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable y, dado el caso, sustancias terapéuticamente activas.

60 Por "vehículos o sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables" se entiende en el presente caso cualquiera en la farmacia en relación con sustancia/composición que va a administrarse a un paciente, que no influye de manera desventajosa en la eficacia de las células/anticuerpos, y/o que puede soportar o facilitar farmacológicamente la aplicación de la composición farmacéutica.

65

Por "sustancia terapéuticamente activa" se entiende en el presente caso cualquier sustancia que se utiliza para los fines de un tratamiento o mejora de un cuadro clínico de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de manera sistémica, es decir por ejemplo por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía transdérmica, o por vía tópica, dependiendo el tipo de administración del tipo de la enfermedad, el cuadro clínico, así como del estado del paciente. Igualmente la administración puede repetirse o tener lugar de una sola vez, pudiendo tener lugar la administración en el primer caso una vez o varias veces al día, y/o a lo largo de un periodo de tiempo más largo.

Además de las sustancias activas la composición farmacéutica puede contener también tampones, diluyentes y/o aditivos. Los tampones adecuados incluyen por ejemplo tris-HCL, glicina y fosfato, y los diluyentes adecuados incluyen por ejemplo disoluciones de NaCl, lactosa o manitol. Los aditivos adecuados incluyen por ejemplo detergentes, disolventes, antioxidantes y sustancias conservantes. Una visión general sobre tales sustancias contenidas adicionales se encuentra por ejemplo en A. Kibbe.: "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press.

Se entiende que las características mencionadas anteriormente y aún por explicar a continuación no sólo pueden utilizarse en la combinación indicada respectivamente, sino también en otras combinaciones o individualmente, sin abandonar el contexto de la presente invención.

La invención se explica en detalle en la siguiente descripción y las Figuras adjuntas.

Muestran:

La Figura 1 Caracterización de las células de médula ósea CD56⁺.

(A) El epítipo de CD56 NCAM16.2, pero no el de 39D5, se expresa en células NK de sangre periférica. (B) Los epítipos de CD56 NCAM16.2 y 39D5 se expresan en un subconjunto raro de médula ósea CD271⁺. (C) Células de médula ósea CD271⁺CD56⁺ y CD271⁺CD56⁻ son clonogénicas. CFU.F derivadas de 500 células clasificadas FACS, se tiñeron y se evaluaron tal como se describe. Los datos representan el valor medio de los números de CFU-F de tres ensayos diferentes (* = p<0,01). (D) Expresión de marcadores seleccionados en MSC CD271⁺CD56⁻ y CD271⁺CD56⁺ cultivadas.

La Figura 2 Fenotipo y morfología de CD271^{bright}TNAP⁺CD56⁻ y CD271^{bright}TNAP⁺CD56⁺, derivadas de la médula ósea.

Células de médula ósea teñidas tres veces se limitaron al subconjunto CD271⁺, y se analizaron con respecto a la coexpresión de CD56 y marcadores seleccionados. (A) Representación de FSC frente a CD271-APC. (B) Representación de CD56 frente a los marcadores representados en células limitadas a CD271^{bright}. (C) Representación de CD56 frente a TNAP (W8B2) en células CD271^{bright}. Las ventanas de clasificación se denominan con R2 y R3. (D) Números de CFU-F, derivados de 1.000 células BM TNAP⁺CD56⁻ y TNAP⁺CD56⁺ clasificadas por FACS o 100.000 células de médula ósea no fraccionadas. Las CFU-F resultantes se tiñeron y se normalizaron sobre 1.000 células cultivadas en placa (p<0,01). (E) Morfología de células de médula ósea TNAP⁺CD56⁻ y TNAP⁺CD56⁺. Los subconjuntos se clasificaron, se citocentrifugaron y se tiñeron con disolución de May-Grünwald-Giemsa; a continuación se evaluaron con un microscopio Zeiss Axiovert 200.

La Figura 3 Potencial de diferenciación de MSC que se derivan de células de médula ósea TNAP⁺CD56⁻ y TNAP⁺CD56⁺ clasificadas.

Células con tinción triple con CD271, TNAP (W8B2) y CD56 se clasificaron y se cultivaron tal como se describe. MSC expandidas se indujeron para la diferenciación osteogénica, adipogénica, condrogénica, miogénica, neurogénica y pancreática y se tiñeron tal como se describe. Las células resultantes se fotografiaron con un microscopio Zeiss Axiovert 200.

La Figura 4 Fenotipo y capacidad de diferenciación de MSC derivadas de células individuales.

A) Células de médula ósea, teñidas tres veces con CD56-FITC, TNAP-PE y CD271-APC se delimitaron y se clasificaron tal como se describe en la Figura 2C. Las células individuales se clasificaron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 12 días. Las colonias de MSC generadas se transfirieron a frascos T-25 y se cultivaron durante 12 días más. A continuación se tiñeron con los anticuerpos respectivos. (B) Morfología de los clones C1 y C2 de MSC derivados de TNAP⁺CD56⁺ y de los clones C12 y C13 derivados de TNAP⁺CD56⁻. (C) Potencial de

diferenciación osteogénico, adipogénico y neuronal de las MSC, derivadas de las células de médula ósea TNAP⁺CD56⁻ y TNAP⁺CD56⁺ individuales.

- 5 La Figura 5 Tabla 1: Análisis de expresión génica de micromatrices de las células de médula ósea CD271⁺CD56⁻ y CD271⁺CD56⁺.
El análisis de micromatrices se llevó a cabo con el uso de ARN de 10.000 células de médula ósea CD271⁺CD56⁻ y CD271⁺CD56⁺ clasificadas. (A) Genes regulados por incremento en la población de CD271⁺CD56⁺ en comparación con la fracción CD271⁺CD56⁻. (B) Genes regulados por disminución en la población de CD271⁺CD56⁺ en comparación con la fracción de CD271⁺CD56⁻.
- 10 La Figura 6 Tabla 2: Fenotipo y proliferación de los clones de MSC (C1 a C16), derivadas de células de médula ósea TNAP⁺CD56⁻ y TNAP⁺CD56⁺ individuales.
“+++” significa > 100 de intensidad de fluorescencia promedio (MFI); “+” significa 10 - 100 ΔMFI; “+” significa 3 - 10 ΔMFI; “(+)” significa 1 -3 ΔMFI; “-” significa una tinción negativa.
- 15 La Figura 7 Transfección de células HEK-293 con TNAP: células HEK-293 transfectadas con la secuencia codificante de TNAP/ALPL (*Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/bone/ kidney (ALPL)*), marcadas con W8B2-APC; las células expresan además de TNAP (antígeno W8B2) (A) también el gen indicador GFP (B); y
- 20 La Figura 8 Células de médula ósea clasificadas a través del anticuerpo W8B2 específico de TNAP, teñidas para la detección de la fosfatasa alcalina: células W8B2 positivas (A); células W8B2 negativas (B).

Ejemplos

- 25 Material y métodos
- Aislamiento de células de médula ósea y células de sangre periférica mononucleares*
- 30 Se obtuvo médula ósea (*bone marrow*, “BM”) de una clínica corporativa del muslo de pacientes, que obtuvieron articulaciones de cadera artificiales. Se obtuvo sangre periférica (PB) de donantes sanos del Instituto de Medicina de Transfusiones de la Clínica Universitaria de Tübingen. Se aislaron células mononucleares de la médula ósea (BMMNC) y células mononucleares de la sangre (PBMMC) por medio de fraccionamiento con gradiente de densidad de Ficoll, y se lisaron los eritrocitos restantes en una disolución de cloruro de amonio.
- 35 *Cultivo de las células primarias*
- Las células de médula ósea separadas en Ficoll y enriquecidas por FACS se cultivaron de la siguiente manera: 2 x 10⁷ células de médula ósea TNAP⁺CD56⁺ y TNAP⁺CD56⁻ no fraccionadas o 1 x 10⁴ células de médula ósea TNAP⁺CD56⁺ y TNAP⁺CD56⁻ clasificadas se cultivaron en frascos de cultivo T-75 o T-25 recubiertos con gelatina en presencia de 20 ml o 6 ml de medio de sustitución KnockoutTM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) así como 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante (rh-bFGF; CellSystem Remagen, Alemania). Después de un cultivo de 3 días se retiraron las células no adheridas y se agregó medio reciente. Las células adheridas se cultivaron hasta que se alcanzó una confluencia del 90 %.
- 45 *Ensayo de fibroblastos formadores de colonias (CFU-F)*
- Ensayos de CFU-F se llevaron a cabo mediante cultivo en placa de o bien 1 x 10⁵ o bien de 500 – 5.000 BMMNC seleccionadas por FACS en frascos T-25 recubiertos con gelatina, que contenían el medio KnockoutTM y 5 ng/ml de rh-bFGF. Después de un cultivo de 12 días se lavaron las células adheridas dos veces con PBS, se fijaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con metanol (Sigma-Aldrich), se secaron al aire y se tiñeron con disolución Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania). Las colonias de CFU-F se contaron macroscópicamente. El tamaño de las colonias ascendió a entre 1 y 8 mm de diámetro.
- 55 *Diferenciación de las MSC*
- Diferenciación de osteoblastos y adipocitos:*
- 60 MSC que se habían derivado de células BM TNAP⁺CD56[±] clasificadas o células BM no fraccionadas se cultivaron en medio NH OsteoDiff o NH AdipoDiff (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para ello se cultivaron 2 x 10⁴ (osteogénesis) o 4 x 10⁴ (adipogénesis) MSC en placas de 24 pocillos (Falcon, Heidelberg, Alemania). Después de 12 días en cultivo en medio NH OsteoDiff se fijaron las células con metanol (-20 °C, 5 min). La actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos se determinó con el uso del sustrato FASTTM BCIP/NBT (Sigma-Aldrich). La deposición de calcio en células fijadas (PFA al 4 %, 15 min) se analizó después de la tinción con rojo de alizarina al 2 % (Merck) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La formación de adipocitos se examinó después de 25 días en cultivo en medio NH AdipoDiff y después de una tinción de 45 minutos a temperatura ambiente de las células fijadas con
- 65

metanol con colorante Oil Red O (Sigma-Aldrich). Se tomaron imágenes con el uso de un microscopio Axiovert 40C (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Alemania).

Diferenciación condrogénica: 4 x 10⁵ MSC se cultivaron durante 4 horas a 37 °C en 20 µl de medio de inducción condrogénico incompleto (PAA, Pasching, Austria), que contenía un 1 % de suplemento ITS (Sigma-Aldrich), ácido L-ascórbico 175 µM (Sigma-Aldrich), L-prolina 350 µM (Sigma-Aldrich) y dexametasona 100 nM (Sigma-Aldrich). Después de la incubación se agregaron 400 µl del medio de inducción condrogénico completo que estaba completado con 10 ng/ml de TGB-β₃ (Sigma-Aldrich). Los sedimentos celulares resultantes se cultivaron durante 3 semanas, se fijaron con PFA al 4 %, se incrustaron en parafina, y se cortaron en cortes de 5 µm de grosor. Los cortes secados y desparafinizados se incubaron con disolución de azul alcian (Merck) durante 45 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en ácido acético al 3 %, se incrustaron y se fotografiaron con un microscopio Zeiss Axiovert 200.

Diferenciación miogénica: 5 x 10⁵ MSC se cultivaron durante 7 días en recipientes con una adherencia muy baja en DME High Glucose (Invitrogen), que se había complementado con β-mercaptobetanol 100 µM. Las agrupaciones resultantes se añadieron a recipientes de 24 pocillos recubiertos de gelatina durante 21 a 28 días, las células resultantes se fijaron con PFA al 4% (45 minutos, a temperatura ambiente), y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 %/PBS a lo largo de 20 minutos. Las células se marcaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos de conejo anti-ser humano frente a actina de la musculatura lisa (SMA) (Spring Bioscience, Freemont, California, EE.UU.), así como con un anticuerpo de ratón anti-ser humano frente a actinina de sarcómero (anti-alfa-actinina) (Sigma-Aldrich). Después del lavado se tiñeron las células con IgG de cabra anti-conejo conjugada con Cy3 (Jackson Immuno Research) o IgG de cabra anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) así como DAPI 0,4 µg/ml.

Diferenciación neuronal: 3,5 x 10⁴ MSC se cultivaron durante 6 días en 800 µl de medio de proliferación NeuroCult® NS-A (CellSystems), y a continuación durante 7 días en el medio de diferenciación NeuroCult® NS-A (CellSystems). Las células se fijaron con PFA al 4 % y se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,3 %/PBS (Sigma-Aldrich), concretamente antes de incubarse durante la noche con anticuerpo de conejo anti-ser humano frente a la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) o el anticuerpo de ratón anti-ser humano frente a la clase neuronal III-β-tubulina (en cada caso de CellSystems). Después del lavado con BSA al 0,1 %/TBS/Tween-20 (Sigma-Aldrich) se tiñeron las células con el anticuerpo de cerdo anti-conejo secundario conjugado con Cy3 (durante 30 minutos a temperatura ambiente; Jackson Immuno Research, Cambridge, Gran Bretaña) o con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) y DAPI 0,4 µg/ml.

Diferenciación pancreática: 5 x 10⁵ MSC se cultivaron en placa en recipientes de 6 pocillos con una adherencia muy baja (Costar; CellSystems), y durante 4 días en MEM, que contenía mono-tioglicerol 1 µM, ES-Cult FBS al 15% y DMEM High Glucose 4,5 g/l (Cell-Systems). Las agrupaciones celulares resultantes se cultivaron a continuación durante 6 días en placas adherentes de 6 pocillos (Falcon) en medio libre de suero complementado con ITS (Cell-Systems). Después de transferirse a placas de 24 pocillos recubiertas con poli-L-ornitina se cultivaron las células durante 6 días en un medio de proliferación pancreático (CellSystems), que contenía las sustancias complementarias N2-A y B27, así como rh-bFGF 25 ng/ml, y entonces a continuación durante 6 días más en un medio de diferenciación pancreático libre de rh-bFGF (CellSystems), con nicotinamida 10 mM. Después del lavado se fijaron las células con PFA al 4 %, se permeabilizaron con etanol al 70% y se incubaron en un tampón de bloqueo, que contenía Triton-X-100 al 0,25 % y FBS al 2 %. A continuación se marcaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-glucagón humano (dilución 1:75; Dako Cytomations, Glostrup, Dinamarca) o con un anticuerpo policlonal de conejo anti-insulina humana (dilución 1:200; Anta Cruz Biotechnology) durante la noche y se tiñeron con una IgG de cabra anti-conejo secundaria-Cy3 (Millipore, Schwalbach, Alemania) y DAPI 0,4 µg/ml.

Generación de los anticuerpos monoclonales reactivos con MSC W8B2 y 39D5

El anticuerpo monoclonal W8B2, (IgG1; especificidad para hTNAP) se obtuvo mediante inmunización de ratones Balb/c hembra de 6 a 8 semanas de edad (Charles River WIGA, Sulzfeld, Alemania) con la línea celular de retinoblastoma WERI-RB-1. El anticuerpo 39D5 (IgG1, CD56) se obtuvo mediante inmunización con la línea celular hematopoyética KG-1a.

Análisis de inmunofluorescencia y clasificación celular

Anticuerpos: se utilizaron los siguientes anticuerpos: 97C5 (CD10), 46A11 (CD13), 39D5 (CD56), 1G2C2 (CD105), 104D2 (CD117), W6B3C1 (CD133), 28D4 (CD140b), 67D2 (CD164), CUB1 (CD318; CDCP1), 24D2 (CD340; HER-2), W3C4E11 (CD349; frizzled-9), HEK-3D6 (desconocido), W1C3 (desconocido), W5C4 (desconocido), W5C5 (desconocido), W3D5 (desconocido), y W8B2B10 (TNAP). CD34-PE (clon 8G12), CD45-PE (clon HI30), CD56-FITC (clon NCAM16.2), CD56-PE (clon NCAM16.2), CD90-APC (5E10), CD63-PE (clon H5C6), CD73-PE (clon AD2), y HLA-DR-PE (clon TÜ36) se adquirieron de Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania). El anticuerpo MC-813-70 reactivo con SSEA-4 se adquirió de Chemicon (Hampshire, Gran Bretaña). CD271-APC (clon ME20.4-1.H4) se adquirió de Miltenyi Biotec. CD105-PE (clon SN6) se adquirió de eBioscience Inc. (San Diego, California, EE.UU.). CD166-PE se obtuvo de Dr. Gene Lay (BioLegend, San Diego, California, EE.UU.).

Tinción de inmunofluorescencia: después del bloqueo y uniones específicas con poliglobina 10 mg/ml (10 minutos, 4 °C) se incubaron las células durante 15 minutos o bien con 20 µl de anticuerpos o bien con 10 µl de anticuerpos conjugados con fluorocromo. Las células teñidas con los conjugados se lavaron dos veces, se suspendieron en 200 µl de tampón FACS y se utilizaron para la citometría de flujo. Las células que estaban marcadas con los anticuerpos, se tiñeron con 20 µl de un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con fragmento F(ab)₂ de R-picoetrina (PE) (Dako Cytomations, Glostrup, Dinamarca) durante 15 minutos, se lavaron dos veces y se analizaron por medio de citometría de flujo. Para la tinción de muchos colores se incubaron las células durante 15 minutos con 10 µl de un anticuerpo anti CD56-FITC y anticuerpo anti CD271-APC y/o el conjugado de PE mencionado. Después del lavado se utilizaron las células para la citometría de flujo. Para una tinción indirecta y directa combinada se marcaron las células en primer lugar con el anticuerpo no conjugado, y a continuación se tiñeron con 20 µl de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón diluido 1:25 durante 15 minutos. Los sitios de unión libres del anticuerpo secundario se bloquearon mediante incubación de las células durante 25 minutos con 20 µl de un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (0,05 µg/ml; Southern Biotech, Birmingham, AL), antes de someterse a contratinción con CD271-APC y/o CD56-FITC. Después de una etapa de lavado se analizaron las células por medio de citometría de flujo.

Análisis de citometría de flujo y clasificación celular

Las células se clasificaron en un clasificador celular FACSAria (Becton Dickinson), o se analizaron con un citómetro de flujo FACS-Cantoll (Becton Dickinson). Los datos se analizaron con el uso del software FCS-Express (De Novo Software, Ontario, Canadá). La clasificación de células individuales en placas de 96 pocillos se llevó a cabo con el uso del dispositivo ACDU.

Separación de MACS

En ensayos seleccionados se clasificaron previamente las células de médula ósea por medio de MACS (Miltenyi Biotec) con el uso de perlas de CD271-APC y de anticuerpo anti-APC. Las separaciones se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Análisis de gen-chip de las células clasificadas

Diez mil células TNAP⁺CD56⁻ y TNAP⁺CD56⁺ se utilizaron para un análisis de gen-chip comercial (Miltenyi Biotec) para llevar a cabo una oligo-micromatriz del genoma completo humano (Agilent Technologies, Böblingen, Alemania). Los ADNc amplificados se cuantificaron con el uso de un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc. Wilmington, DE). 250 ng de las PCR de biblioteca se utilizaron como molde para el marcaje con Cy3 y Cy5. Las muestras se hibridaron durante 17 horas a 65 °C en la micromatriz de Agilent de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El barrido del gen-chip y los análisis de datos se llevaron a cabo con el uso del software Luminator (Miltenyi Biotec).

Resultados

El anticuerpo monoclonal 39D5 reconoce un epítipo de CD56, que no se expresa sobre la superficie de células NK derivadas de sangre periférica (PB). Un análisis de citometría de flujo comparativo mostró que sólo el anticuerpo NCAM16.2 específico de CD56 comercialmente disponible, pero no el anticuerpo monoclonal 39D5, reaccionaba con 20 ± % de las células PB (Figura 1A). Sin embargo ambos anticuerpos reaccionaron con una pequeña subpoblación de células BM CD271^{bright} (Figura 1B). Una tinción simultánea de células BM con 39D5 y NCAM16.2 dio como resultado que ambos anticuerpos detectarían la misma población de CD271^{bright}.

La población de CD271^{bright} CD56⁺ está enriquecida para CFU-F

Para determinar el potencial clonogénico de subconjuntos CD56⁺ y CD56⁻ clasificados, se llevaron a cabo ensayos de CFU-F. La Figura 1C muestra una eficiencia enriquecida de tres veces (± 0,8) de células CD271^{bright} CD56⁺ en comparación con células CD271^{bright} CD56⁻ y un enriquecimiento de 180 veces (± 52) en CFU-F en comparación con las células BM no fraccionadas. El enriquecimiento dependía del epítipo de CD56 analizado. De forma interesante las células CD271^{bright} CD56⁺ no sólo consiguieron mayores números de colonias (38/500 frente a 12/500 células sembradas en placa), sino que estaban enriquecidas también de 2 a 4 veces en las colonias muy grandes (>100 células/colonia).

Fenotipo de las MSC que se habían derivado de las células CD271^{bright} CD56[±]-BM clasificadas

Células CD271^{bright} CD56⁺ y CD271^{bright} CD56⁻ se separaron por medio de FACS, se cultivaron en frascos recubiertos de gelatina en presencia de un medio de sustitución de suero (n = 3), se tiñeron con los anticuerpos indicados y se analizaron mediante citometría de flujo. La Figura 1D muestra que CD10, CD140b, CD318, HER2 (CD340), frizzled-9 (CD349), así como los antígenos definidos por anticuerpo W1C3, W5C4, W5C5 y W3D5 estaban expresados de manera similar en MSC que se habían derivado de ambas fracciones. CD271, SSEA-4 y CD56 se habían expresado

con la mayor densidad sobre MSC derivadas de CD271^{bright} CD56⁺, mientras que la expresión de TNAP (antígeno W8B2) sobre células MSC derivadas de CD271^{bright} CD56⁻ era pronunciada. A diferencia de las MSC primarias (Figura 2B) las MSC cultivadas expresarán de nuevo CD 166 y CD318, y regularon por disminución la expresión de CD271.

5

Análisis de la expresión génica de células de médula ósea CD271^{bright}CD56⁻ y CD271^{bright}CD56⁺ primarias

Un análisis de micromatriz del genoma completo de 10.000 células de médula ósea clasificadas se llevó a cabo, para comparar el perfil de expresión génica de células de médula ósea CD271^{bright}CD56⁻ y CD271^{bright}CD56⁺. Las células CD271^{bright}CD56⁺ mostraron una expresión elevada de 11 a 43 veces de la proteína 4 relacionada con frizzled secretada, y la proteína gen 4 relacionada con cáncer de esófago, de la carboxipeptidasa E, del factor de crecimiento derivado de plaquetas A, del factor de terminación de traducción eucariota 1 y de CD163 (Figura 5: Tabla 1A). A diferencia de esto los genes que codificaban para la subfamilia de receptores de tipo inmunoglobina de leucocitos, para la proteína con dedos de zinc 212, anfirregulina, HLA-clase II DM beta, espondina 2 y HLA-clase II DR alfa estaban expresados con niveles reducidos de 62 a 23 veces en este subconjunto (tabla 1B), lo que indica una alta diversidad del perfil de expresión génica estos subconjuntos.

10

15

Fenotipo de las células de médula ósea CD271^{bright}CD56[±]

Para comparar el perfil de expresión de los marcadores de superficie sobre células CD271^{bright}CD56⁺ y CD271^{bright}CD56⁻ se tiñeron las células de médula ósea tres veces con anticuerpo anti-CD271, anticuerpo anti-CD56 y una serie de anticuerpos de ensayo, y se delimitaron en una población de CD271^{bright} (Figura 2; ventana R1). La Figura 2B muestra que CD63, CD73, CD140b, CD164 y el antígeno W3D5 estaban expresados con un nivel similar sobre ambos subconjuntos de células, mientras que CD45, CD117, CD133, CD318 eran negativos. A diferencia de esto las células CD271^{bright}CD56⁺ expresaron CD13, CD105, frizzled-9 (CD349), HLA-DR y TNAP (antígeno W8B2) con un nivel reducido, mientras que CD166 se encontró exclusivamente sobre estas células. El hecho de que la expresión de CD166 estuviera ausente en la mayor parte de las células MSC primarias, sorprendió, dado que las MSC cultivadas expresan de manera conocida un alto nivel de CD166. También el antígeno tumoral CDCP1 (CD318) era negativo en células primarias CD271^{bright}CD56⁻ y CD271^{bright}CD56⁺ (Figura 2B), sin embargo se expresaba fuertemente en MSC cultivadas (Figura 1B).

20

25

30

Capacidad clonogénica de células de médula ósea TNAP⁺CD56[±]

Con los presentes resultados pudo mostrarse que TNAP está expresada con un alto nivel sobre células CD271^{bright}CD56⁻ y con un nivel menor sobre subconjuntos de células CD271^{bright}CD56⁺ (Figura 2A). Para someter a ensayo la capacidad clonogénica de estos subconjuntos se fraccionaron las células con las ventanas R2 y R3 (Figura 2C). Números de células definidos se añadieron en frascos de cultivo, y se contaron las CFU-F resultantes después de un cultivo de 12 días. La Figura 2D muestra que las células TNAP⁺CD56⁺ llevaban a un número de CFU-F mayor de 2-(± 0,4) veces que las células TNAP⁺CD56⁻. Una tinción con Giemsa mostró que las células TNAP⁺CD56⁻ contenían un citoplasma grande y claro con vacuolas, mientras que las células TNAP⁺CD56⁺ contenían un citoplasma menor con corpúsculos basófilos (Figura 2E).

35

40

Capacidad de diferenciación de MSC, derivadas de células TNAP⁺CD56[±]

Para los ensayos de diferenciación se expandieron células TNAP⁺CD56⁻ TNAP⁺CD56⁺ no fraccionadas o clasificadas, hasta que habían experimentado aproximadamente 9 a 10 divisiones celulares. Un número definido de las MSC resultantes se indujo a continuación para diferenciar en células de las líneas osteogénicas, adipogénicas, condrogénicas, miogénicas, neuronales y pancreáticas.

45

Diferenciación osteoblástica: El cultivo de MSC, que se habían derivado de subconjuntos de células clasificados, en un medio adecuado llevó a una aparición de 95 ± 5 % (CD56⁺) y 70 ± 5 % (CD56⁻) de células de fosfatasa alcalina positivas (Figura 3). A diferencia de esto las MSC, que se habían derivado de las células de médula ósea no fraccionadas, llevaron únicamente a del 35 % ± 5 % de células de fosfatasa alcalina positivas. Una tinción con rojo de alizarina S pudo observarse en todas las fracciones de osteoblastos. Sin embargo, el número de la deposición de calcio en los osteoblastos, que se habían derivado de células no fraccionadas era veinte veces mayor.

50

55

Diferenciación de adipocitos: El cultivo de las MSC no fraccionadas y derivadas de TNAP⁺CD56⁻ en medio de diferenciación de adipocitos llevó a una aparición de adipocitos incorporados en Oil Red O. A diferencia de esto las MSC derivadas de TNAP⁺CD56⁺ no podían formar adipocitos (Figura 3). Las MSC TNAP⁺CD56⁻ mostraron un aumento de 5 ± 0,5 veces en adipocitos Oil Red O positivos en comparación con células no fraccionadas. Por lo tanto la capacidad para la diferenciación de adipocitos en el subconjunto TNAP⁺CD56⁻ es ilimitada.

60

Diferenciación condrogénica: para analizar el potencial para la diferenciación de condrocitos se cultivaron MSC, que se habían derivado de células fraccionadas y no fraccionadas, en un medio adecuado y se tiñeron los sedimentos resultantes con azul alcian. Aunque se detectó una diferenciación condrogénica en ambas fracciones, las secciones

65

de sedimento de células TNAP⁺CD56⁺ eran 5 (\pm 1,6) veces mayores que las de las células TNAP⁺CD56⁻ (Figura 3). Además se detectaron condrocitos viables casi exclusivamente en el subconjunto TNAP⁺CD56⁺, mientras que los sedimentos de TNAP⁺CD56⁻ contenían principalmente células apoptóticas. Las MSC de células no fraccionadas llevaron a tamaños de sedimentos heterogéneos, sin embargo continuamente con menos células viables. Estos datos muestran que una condrogénesis efectiva está limitada al subconjunto de MSC TNAP⁺CD56⁺.

Diferenciación miogénica: el cultivo de las MSC derivadas de TNAP⁺CD56[±] en un medio que era adecuado para la diferenciación en células de la musculatura estriada, llevó a una aparición de una tinción con α -actina específica para la musculatura estriada en células de todas las fracciones (Figura 3). A diferencia de esto el marcado específico para la musculatura lisa SMA era negativa en todas las fracciones. Las MSC no diferenciadas mostraron una tinción con α -actina muy débil.

Diferenciación neuronal: MSC que se cultivaron en un medio de diferenciación neuronal, se tiñeron con respecto a GFAP y β -tubulina III neuronal. La Figura 3 muestra una clara tinción de células que se habían derivado de MSC no fraccionadas y de MSC TNAP⁺CD56⁺ y derivadas de TNAP⁺CD56⁻. En MSC no diferenciadas o en células diferenciadas que estaban marcadas con anticuerpos control específicos de isotipo no se observó tinción alguna.

Diferenciación pancreática: El cultivo de MSC en un medio de diferenciación pancreático llevó a una coloración con glucagón e insulina de islotes de tipo pancreático en células de todas las fracciones (Figura 3). Sin embargo los islotes, que se habían derivado de MSC TNAP⁺CD56⁺, eran más grandes, y la intensidad de tinción de estos marcadores era claramente marcada en comparación con las MSC derivadas de TNAP⁺CD56⁻ o las MSC sin fraccionar. En las MSC no diferenciadas o en las células diferenciadas, que estaban marcadas con un anticuerpo control adaptado a isotipo, no se observó coloración alguna.

25 *Análisis de células individuales de los clones TNAP⁺CD56⁻*

Las características de crecimiento, el fenotipo y la capacidad de diferenciación de células MSC TNAP⁺CD56⁺ y TNAP⁺CD56⁻ se determinó clasificándose las células individuales en placas de cultivo de 96 pocillos recubiertas con gelatina, y se cultivaron en un medio libre de suero, hasta que aparecieron colonias visibles macroscópicamente (> 20 células). La eficacia de clonación de las células TNAP⁺CD56⁺ y TNAP⁺CD56⁻ clasificadas ascendió 11/96 o 5/96. Esta frecuencia aumentada en al menos el doble de las células CD56⁺ coincide con los valores de colonias aumentados en dos veces de las células clasificadas descritas en la Figura 2D.

Las colonias resultantes se transfirieron a frascos T-25 y se expandieron hasta que alcanzaron del 60 al 70 % de confluencia. Un análisis de fenotipo mostró que todos los 16 clones eran negativos para CD45, sin embargo expresaban CD73, CD90, CD105 y CD166, y mostraron además una expresión de CD271 reducida (Figura 4A, Figura 6: Tabla 2). Todos los clones CD56⁺, a excepción del clon C3, regulaban por disminución la expresión de CD56. A diferencia de esto la expresión de CD56 estaba inducida en dos de cuatro clones de MSC, que se habían derivado de células CD56⁻ (C14, C15). De manera interesante pudo observarse una expresión de CD34 significativa en dos de los clones CD56⁺ y CD56⁻, mientras que TNAP sólo se detectó en un clon CD56⁺ y en cuatro de cinco clones CD56⁻. También la expresión de Frizzled-9 se observó únicamente en cuatro de once clones CD56⁺, así como en todos los clones CD56⁻. Estos datos muestran que cada uno de los clones individuales tiene un perfil de expresión individual, con una expresión preferida de TNAP y Frizzled-9 en los clones CD56⁻.

La expansión de todas las 16 células individuales a lo largo de 24 días llevó a una aparición de células fusiformes con una morfología similar a fibroblasto (Figura 4B). Entre los clones individuales se observó una fuerte heterogeneidad con respecto al potencial de proliferación (Figura 6: Tabla 2). Aunque el número promedio de células, que se habían derivado de los clones CD56⁺, era aproximadamente dos veces tan alto como el de las células derivadas de clones CD56⁻ ($93,5 \times 10^3$ frente a $52,8 \times 10^3$ después de un cultivo de 24 días) no pudo detectarse ninguna relación entre los clones individuales o los perfiles de fenotipo (Figura 6: Tabla 2).

Los clones de proliferación intensa C1 y C2 (TNAP⁺CD56⁺) y C12 y C13 (TNAP⁺CD56⁻) se analizaron también con respecto a su potencial de diferenciación osteoblástico, adipocitario y neuronal. De la Figura 5C puede deducirse que únicamente un clon CD56⁻, pero ninguno de los clones CD56⁺ llevaba a la generación de adipocitos incorporados en Oil Red O. Células de tipo neurona que expresan osteoblastos fosfatasa alcalina positivos y β -tubulina-III neuronal se generaron por tres de cuatro clones, sin embargo no por el clon CD56⁻ C13 (Figura 4C). Era destacable que las células β -tubulina-III-positivas eran 5-10 veces más frecuentes en los clones CD56⁺ que en los clones CD56⁻.

60 *Transfección de células HEK-293 con TNAP*

Células HEK-293 (que pueden obtenerse en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ con el número DSMZ N° ACC 305) se transfectaron con la secuencia codificante de TNAP/ALPL (Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/bone/ kidney (ALPL)), que se integró en el vector pCMV6-AC-GFP (que pueden obtenerse en la empresa Origene Technologies, Rockville, MD, EE.UU.). Para la transfección se usó el reactivo

MegaTran1.0 transcript 1 (igualmente de OriGene Technologies, Rockville, MD, EE.UU.). Después de la incubación se lavaron las células y se marcaron con W8B2-APC. El análisis de citometría de flujo (véase la Figura 7) muestra que aproximadamente el 40% de las células era fuertemente positivas para W8B2: Las células expresan además de TNAP (antígeno W8B2) (Figura 7A) también el gen indicador *Green-Fluorescent Protein* (proteína fluorescente verde (GFP)) (Figura 7B).

Detección de la actividad de fosfatasa alcalina

Células de médula ósea se marcaron con el anticuerpo W8B2 específico de TNAP (W8B2-APC) y se clasificó en el aparato de clasificación celular FACSaria (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ EE.UU.). Las células clasificadas se tiñeron a continuación con un kit comercialmente disponible para la detección de la fosfatasa alcalina (StemTAG AP staining kit; Stem Cell Technologies, Vancouver, CA). Sólo las células W8B2-positivas mostraron una reacción para esta enzima (Figura 8A). Las células W8B2-negativas no mostraron reacción alguna (Figura 8B).

Con los presentes resultados se caracterizaron poblaciones de MSC que se reconocen por anticuerpos específicos de CD56 y específicos de TNAP. Era destacable que podía inducirse una diferenciación efectiva de condrocitos y de islotes de tipo pancreático sólo en los casos de la fracción TNAP⁺CD56⁺. A diferencia de esto pudieron generarse adipocitos únicamente a partir de células TNAP⁺CD56⁻. La clasificación de células individuales a partir de ambos subconjuntos confirmó la diferente capacidad de proliferación y de diferenciación de las células TNAP⁺CD56⁺ y TNAP⁺CD56⁻.

Con los presentes resultados pudo mostrarse también que sólo las células die TNAP⁺CD56⁺ podían diferenciarse de manera efectiva en condrocitos, tal como pudo mostrarse mediante el tamaño elevado de sedimento de cartílago y la extensa tinción de proteoglicano.

Con el presente estudio por lo tanto se identificaron antígenos, concretamente TNAP y CD56, a través de los que pueden identificarse y/o aislarse de manera efectiva MSC con potencial de diferenciación condrogénico, adipocitario o pancreático.

Estos resultados son relevantes en particular con respecto al uso clínico de las células madre aisladas de esta manera o de los condrocitos/adipocitos/células de tipo pancreático obtenidos a través de estas células madre. De este modo regularmente son difíciles de tratar por ejemplo lesiones del cartílago articular y de discos intervertebrales, precisamente debido a la limitada capacidad de regeneración de este tejido. Enfermedades tales como artritis reumatoide, traumatismos, fracturas óseas y lesiones de discos intervertebrales están directamente relacionadas con la falta de una condrogénesis efectiva. A pesar del progreso en la ortopedia y el éxito creciente en el trasplante de condrocitos autólogos, siguen siendo un desafío los planteamientos relacionados con la biología celular para la regeneración de cartílagos. El problema principal es el uso de células cultivadas para fines clínicos, en los que las células de partida están caracterizadas sólo escasamente.

Por lo tanto, la presente invención ofrece la posibilidad de proporcionar células de médula ósea TNAP⁺CD56⁺ altamente enriquecidas y bien definidas, con una excepcional capacidad de diferenciación condrogénica, que pueden utilizarse para el uso clínico como población o cultivo de partida. Estas células pueden utilizarse o bien directamente para la inyección, por ejemplo en los espacios intervertebrales / discos intervertebrales, o expandirse *in vitro* y diferenciarse en condrocitos, antes de usarse para usos clínicos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso *in vitro* de un anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP, en combinación con un anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56, para el aislamiento de células madre con potencial de diferenciación adipocitario, condrocitario y pancreático.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el anticuerpo anti-TNAP se selecciona del grupo:
- el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, que se unen al antígeno TNAP, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567, y
 - 15 - un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567.
- 20 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que el anticuerpo de unión a CD56 se selecciona del grupo:
- el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, que se unen a CD56, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930,
 - 25 - un anticuerpo, que se une al mismo antígeno que el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930, y
 - un anticuerpo, que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930.
- 30 4. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que además de la combinación de un anticuerpo anti-TNAP y un anticuerpo dirigido frente a CD56 se utiliza también un anticuerpo dirigido frente a CD271, o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se unen a CD271.
- 35 5. Procedimiento para el aislamiento y/o la identificación de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación adipocitario, caracterizado por que presenta las siguientes etapas:
- a) poner en contacto una muestra, que contiene células madre mesenquimatosas, con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP,
 - b) poner en contacto la muestra de la etapa a) con un anticuerpo, que se une a CD56, o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se unen a CD56 y
 - 40 c) aislar y/o identificar células, a las que se ha unido el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP, pero no el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56.
- 45 6. Procedimiento para el aislamiento y/o la identificación de células madre mesenquimatosas con potencial de diferenciación condrocitario, caracterizado por que presenta las siguientes etapas:
- a) poner en contacto una muestra, que contiene células madre mesenquimatosas, con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP,
 - b) poner en contacto la muestra de la etapa a) con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56, y
 - 50 c) aislar y/o identificar células, a las que se han unido tanto el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une al antígeno TNAP, como el anticuerpo o fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD56.
- 55 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que presenta la etapa adicional c'):
- c') poner en contacto la muestra de la etapa b) con un anticuerpo o con fragmentos funcionales del anticuerpo, que se une a CD271.
- 60 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que el anticuerpo anti-TNAP utilizado en la etapa a) se selecciona del grupo:
- el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, que se unen al antígeno TNAP y

- anticuerpos, que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567.

5 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado por que el anticuerpo de unión a CD56 utilizado en la etapa b) se selecciona del grupo:

- el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930,

10 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, que se unen a CD56 y

- anticuerpos, que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930.

15 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizado por que las etapas a), b) y c') se llevan a cabo simultáneamente, de manera sucesiva o en orden inverso.

20 11. Células madre TNAP⁺ CD56⁺, que se aislaron y/o identificaron con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 y 7 u 8 o 9 o 10 para la aplicación para la terapia o el diagnóstico.

12. Uso de células madre TNAP⁺ CD56⁺, que se aislaron y/o identificaron con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 y 7 u 8 o 9 o 10, para la generación definida de condrocitos y células de tipo pancreático.

25 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que las células madre TNAP⁺ CD56⁺, que se aislaron y/o identificaron con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 10 y se diferenciaron en condrocitos y células de tipo pancreático, pueden utilizarse para la terapia y/o profilaxis.

30 14. Células madre TNAP⁺ CD56⁺, que se aislaron y/o identificaron con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 y 7 u 8 o 9 o 10 para la aplicación para la terapia y/o profilaxis de daños, degeneraciones o enfermedades en cartílago, huesos, discos intervertebrales o para artritis reumatoide.

35 15. Composición farmacéutica, que presenta una combinación del anticuerpo W8B2 o fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567, y del anticuerpo 39D5 o fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930.

40 16. Composición farmacéutica, que contiene células madre TNAP⁺ CD56⁺, que se aislaron y/o identificaron de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 y 7 u 8 o 9 o 10, así como al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, sustancias terapéuticamente activas.

45 17. Kit, que contiene una combinación del anticuerpo W8B2 o fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2567, y del anticuerpo 39D5 o fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, que se produce por la línea celular de hibridoma depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número ACC 2930.

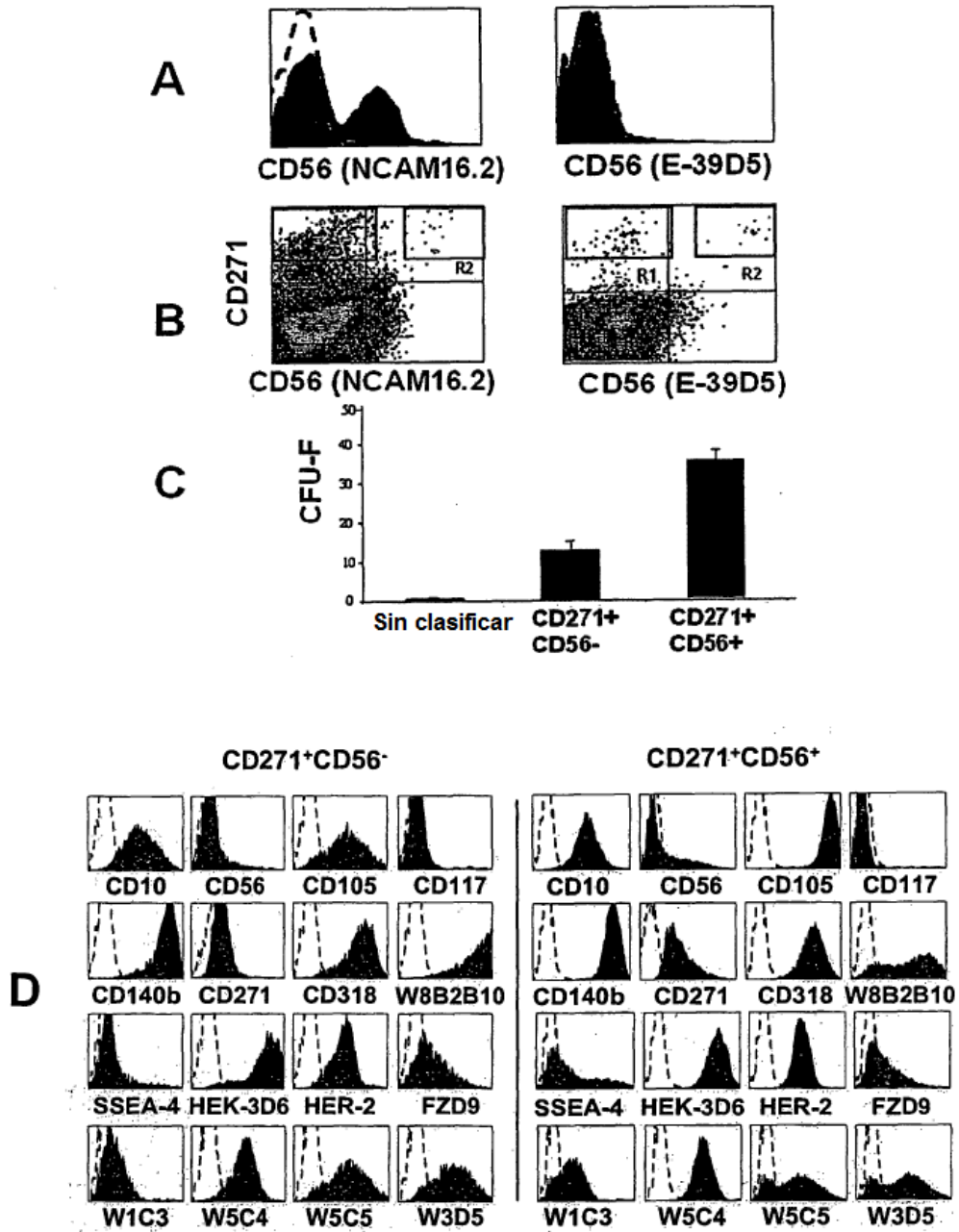


Fig. 1

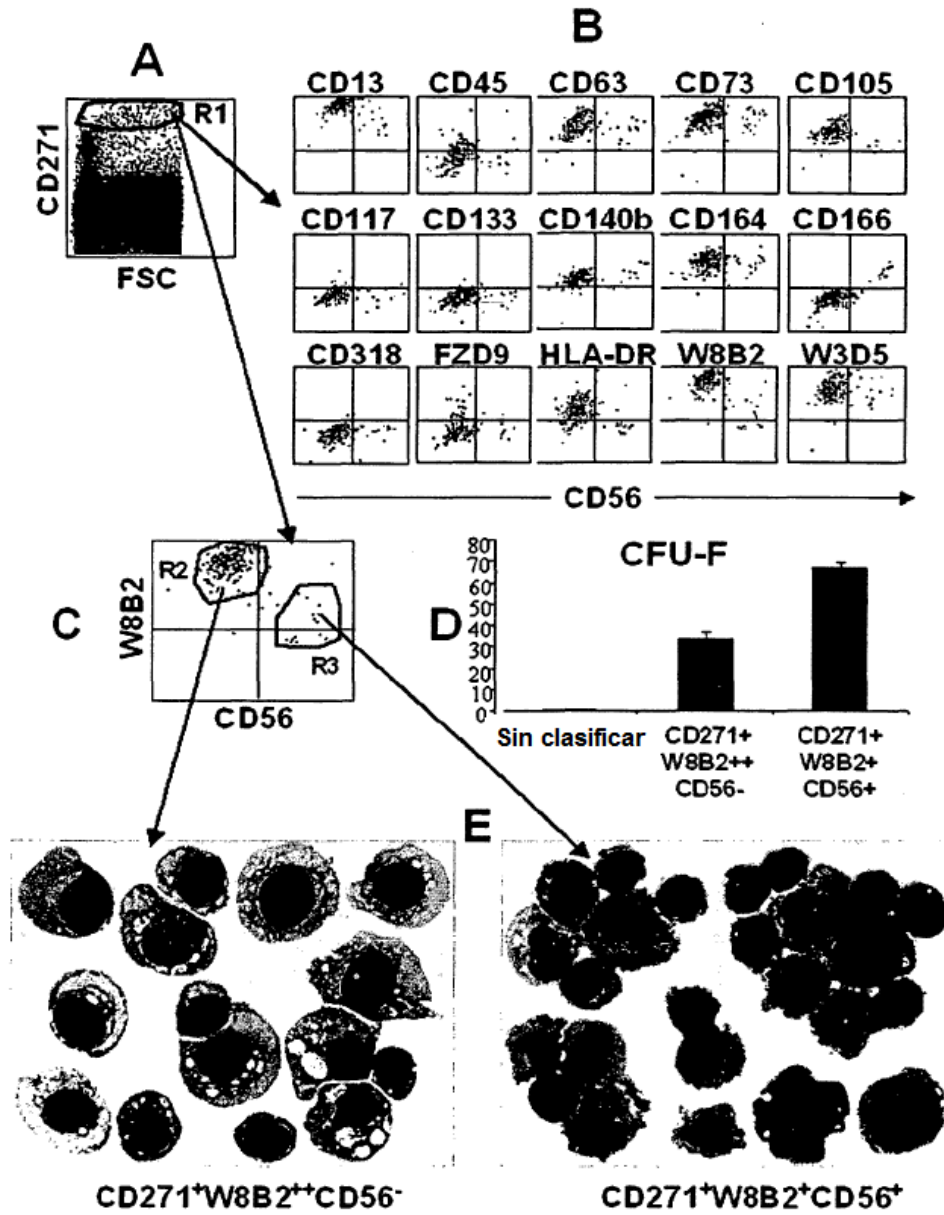


Fig. 2

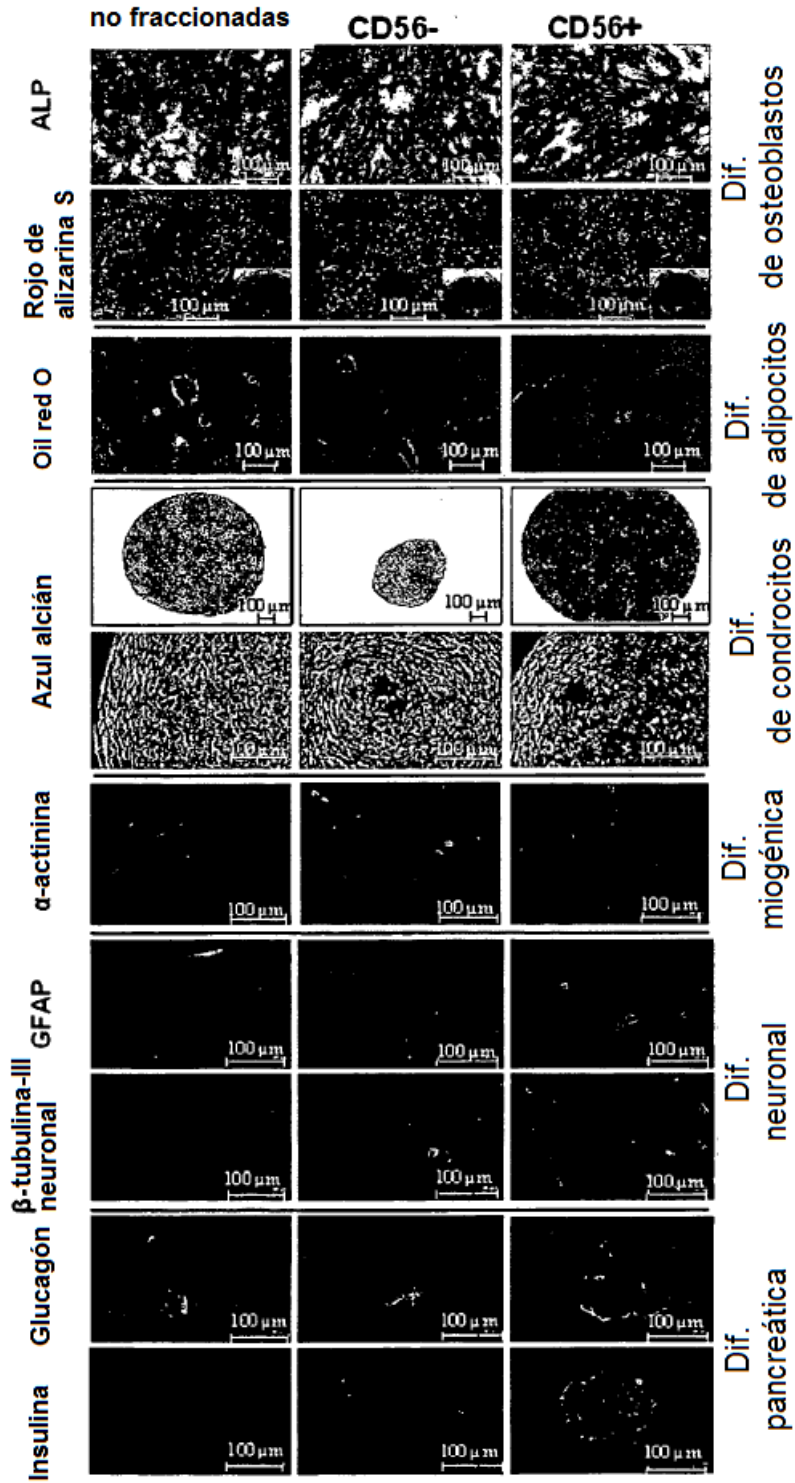


Fig. 3

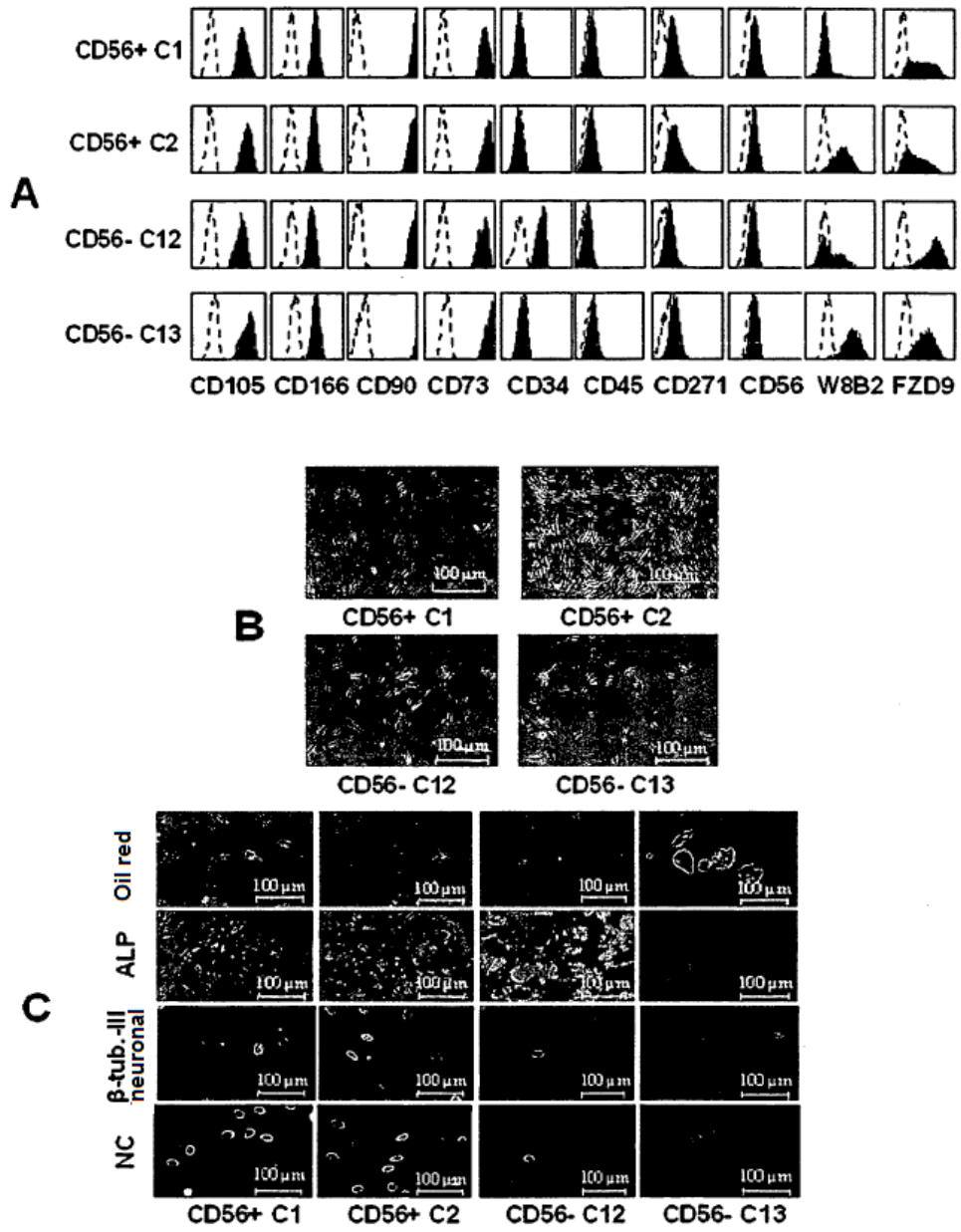


Fig. 4

Genes regulados por incremento en células CD 56+

Símbolo de gen	Nombre de gen	Número de registro de gen	Modificación del plegamiento
SFRP4	Proteína 4 relacionada con Frizzled secretada	NM_003014	43,18
ECRG4	Proteína de gen 4 relacionada con cáncer de esófago	NM_032411	21,06
CPE	Carboxipeptidasa E	NM_001873	15,34
PDGFA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF-A	X06374	13,41
ETF1	Factor de terminación de la traducción eucariota 1	NM_004730	11,80
CD163	Antígeno CD163 (CD163)	NM_004244	11,34
T2BP	Proteína de unión a TRAF2	NM_052864	10,99
PH-4	Factor inducible por hipoxia prolil-4-hidrolasa	NM_177939	10,44
LGALS13	Lectina, de unión a galactosidasa, soluble, 13, (Galectina 13)	NM_013268	10,21
TLR8	Receptor 8 de tipo Toll	NM_016610	8,39
ITGA10	Integrina, alfa 10	NM_003637	8,36
TJP1	Proteína 1 de "unión estrecha" (Zona occludens 1)	NM_003257	8,06
DNAJB6	Homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 6	NM_058246	8,04
LIMD1	Proteína 1 que contiene dominios LIM	NM_014240	7,905
WIF1	Factor 1 inhibidor de WNT	NM_007191	7,88
KUB3	Proteína 3 de unión a Ku70	BC033881	7,04
KLK4	Calicreína 4	NM_004917	6,93
UBE2B	Enzima de conjugación con ubiquitina E2B	BC001694	6,83

Fig. 5

Genes regulados por disminución en células CD 56+

Símbolo de gen	Nombre de gen	Número de registro de gen	Modificación del plegamiento
LILRB2	Receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos, subfamilia B	NM_005874	-61,98
ZNF212	Proteína con dedos de zinc 212	NM_012256	-38,64
AREG	Anfirregulina (factor de crecimiento derivado de Schwannoma)	NM_001657	-29,66
HLA-DMB	Complejo de histocompatibilidad principal, clase II, DM beta	NM_002118	-29,61
SPON2	Espondina 2, proteína de matriz extracelular (SPON2)	NM_12445	-23,59
HLA-DRA	Complejo de histocompatibilidad principal, clase II, DR alfa	NM_019111-	-23,19
GZMB	Granzima B (granzima 2, serinesterasa 1 asociada con linfocitos T citotóxicos)	NM_004131	-21,20
CSF2RA	Receptor del factor 2 estimulante de colonias, alfa, baja afinidad (granulocitos-macrófagos)	NM_172247	-11,41
FLJ12528	Treonil-ARNt-sintetasa	NM_025150	-11,32
HLA-DBP1	Complejo de histocompatibilidad principal, clase II, DP beta1	NM_002121	-11,29
PLCB2	Fosfolipasa C, beta 2 (PLCB2)	NM_004573	-8,83
MAPK1	Proteína quinasa 1 activada por mitógeno	NM_138957	-8,66
COPG2	Complejo de proteína "coatómero", subunidad gamma 2	NM_012133	-8,64
NOTCH1	Homólogo 1 de Notch	NM_017617	-8,61
MRPL23	Proteína ribosómica mitocondrial L23	NM_021134	-7,77
Septin6	Septina 6 (SEPT6)	NM_015129	-7,75
GLRA2	Receptor de glicina, alfa 2	NM_002063	-7,65
BCL2A1	Proteína 1 relacionada con BCL2	NM_004049	-7,14
PANX1	Panexina (PANX1)	NM_015368	-6,68
AF320072	Proteína relacionada con cáncer de estómago VRG118	AF320072	-6,68
CD74	Antígeno CD74 (polipéptido invariante de MHC, clase II asociado a antígeno)	NM_004355	-6,65
GDI1	Inhibidor de la disociación 1 de GDP	NM_001493	-6,59
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina (motivo C – X – C)	NM_003467	-5,03

Fig. 5 (continuación)

Identidad del clon	CD105	CD166	CD90	CD73	CD34	CD45	CD271	CD56	W8B2	FZD9	Número de células tras cultivo de 24 horas
CD56+ (C1) G11	++	+	+++	++	-	-	+	(+)	-	+	450 X 10 ³
CD56+ (C2) F7	++	+	+++	+++	-	-	+	(+)	+	(+)	450 X 10 ³
CD56+ (C3) B6	++	++	+++	+++	-	-	+	++	-	-	75 X 10 ³
CD56+ (C4) C4	++	++	+++	+++	+	-	+	+	-	(+)	12 X 10 ³
CD56+ (C5) E4	+	+	+++	++	-	-	+	+	-	-	12 X 10 ³
CD56+ (C6) B12	++	++	+++	+++	-	-	+	+	-	-	1 X 10 ³
CD56+ (C7) F10	++	++	+++	++	-	-	+	+	-	-	3 X 10 ³
CD56+ (C8) C1	++	++	+++	+++	-	-	+	+	-	-	7 X 10 ³
CD56+ (C9) C6	+	+	+++	+++	-	-	+	+	-	-	9 X 10 ³
CD56+ (C10) F6	++	++	+++	+++	+	-	+	+	-	-	5 X 10 ³
CD56+ (C11) B7	++	++	+++	+++	(+)	-	+	+	-	+	4 X 10 ³
CD56- (C12) E9	++	+	+++	++	+	-	(+)	(+)	(+)	++	100 X 10 ⁵
CD56- (C13) C4	++	+	+++	+++	-	-	(+)	-	+	+	100 X 10 ⁵
CD56- (C14) A9	++	+	+++	+++	(+)	-	+	(+)	+	(+)	50 X 10 ³
CD56- (C15) E3	++	+	+++	+++	(+)	-	(+)	+	-	(+)	8 X 10 ³
CD56- (C16) H9	++	+	+++	++	+	-	-	-	++	(+)	6 X 10 ³

Fig. 6

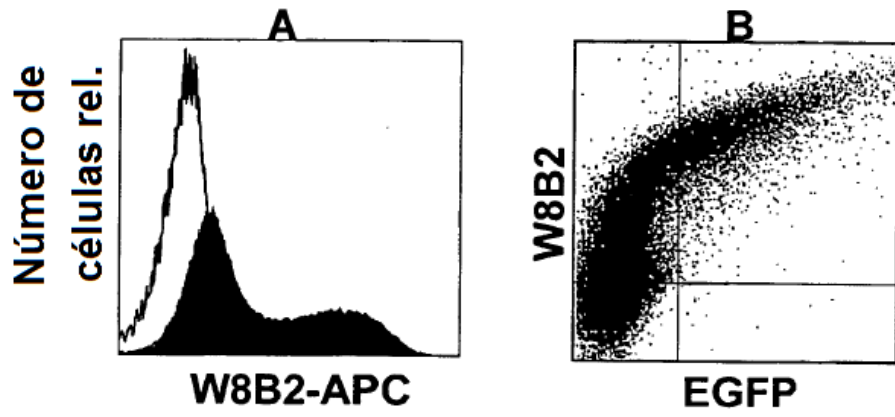


Fig. 7

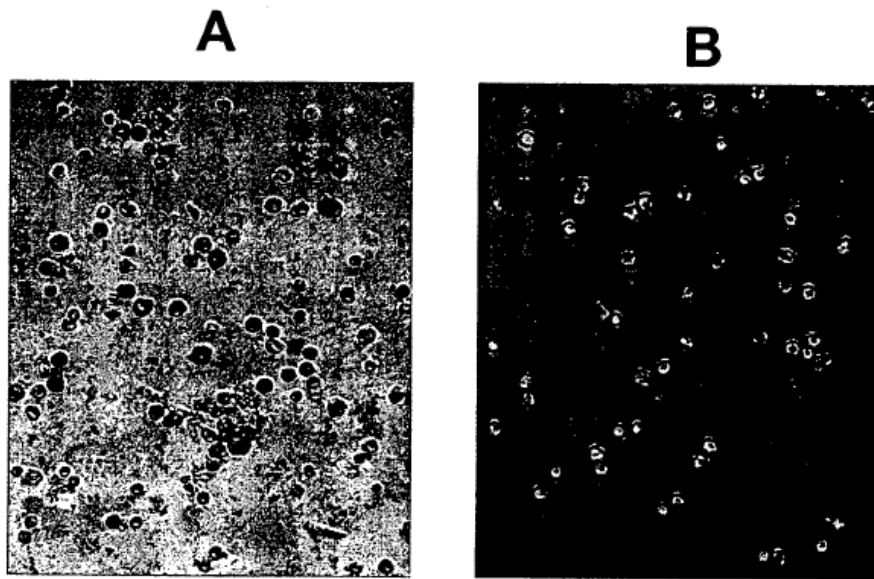


Fig. 8