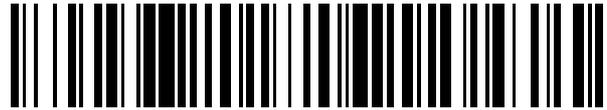


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 186**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2013 E 13707295 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2758523**

54 Título: **Células madre estromales**

30 Prioridad:

10.02.2012 GB 201202319

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

26.06.2015

73 Titular/es:

**ORBSEN THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Orbsen Building, University Road
Galway, IE**

72 Inventor/es:

ELLIMAN, STEPHEN JOSEPH

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 539 186 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

Células madre estromales

Introducción

5 La presente invención se relaciona con métodos para el aislamiento de células madre, con poblaciones de células madre obtenidas a partir de células aisladas y con usos de estas poblaciones.

Fundamento

10 En las décadas de 1960 y 1970, Friedenstein y sus colegas demostraron que el potencial osteogénico -revelado por trasplante heterotópico de células de médula ósea (BM) - estaba asociado con una sub-población menor de células mononucleares (MNCs) de BM (revisado en Friedenstein, 1990). Estas MNCs podían ser distinguidas de la mayoría de las MNC hematopoyéticas por su rápida adherencia a recipientes plásticos para cultivo de tejidos y por una apariencia de su progenie en cultivo similar a fibroblastos, sugiriendo un origen del compartimiento estromal de BM. A la vez que establecieron el estroma BM como la fuente, Friedenstein, Owen y sus colegas suministraron un segundo avance mostrando que la inoculación de suspensiones celulares de BM a densidad clonal da como resultado el establecimiento de colonias discretas iniciadas por células individuales (unidad fibroblástica formadora de colonia, CFU-F [Friedenstein et al., 1970]).

20 Posteriormente Friedenstein y Owen llamaron a esta célula generadora de CFU-F, la célula madre estromal (SSC) (Owen y Friedenstein, 1988) y las referencias a SSC se basan aquí en aquella definición original de célula.

25 Las SSCs derivadas de BM pueden ser identificadas en una población mixta de MNCs fibroblásticas que se adhieren al plástico (PA), que dan lugar a hueso, grasa o cartílago y segregan potentes proteínas inmunomodulatorias y angiogénicas. Los estudios pre-clínicos demuestran que las PA-SSC median potentes respuestas inmunomodulatorias y angiopoyéticas in vivo. Actualmente, los ensayos clínicos están probando PA-SSC en 40 distintas enfermedades degenerativas, autoinmunes e isquémicas.

30 En la médula humana, aproximadamente 1 célula mononuclear (MNC) BM por cada 80,000 MNC es una SSC que forma CFU-F. A la fecha, el método más simple y frecuentemente usado para aislar estas SSC de BM depende de la adherencia previamente notada a plástico para el cultivo de tejidos, de acuerdo con lo cual se dejan las MNC en incubación por 10-14 días y en este intervalo las CFU-F se unirán y formarán colonias a una frecuencia reconocida de 1:80000. A los 10-14 días se recogen estas CFU-F por digestión con tripsina y se siembran en placa nuevamente en un medio rico en suero a una densidad de 3-8000 CFU-F por cm². Estas CFU-F son entonces propagadas in vitro hasta que se obtiene un número de células suficiente para permitir la evaluación bioquímica y citológica. Esta aproximación es usada ampliamente pero es mirada como inadecuada para definir o purificar SSC para uso clínico en la medida en que sólo 1:80,000 BMMNC sembradas en placa son SSC y los métodos no cumplen con los buenos protocolos de fabricación requeridos para la aprobación clínica de productos relacionados.

40 Por ello, en la técnica previa se han identificado las poblaciones de células madre con base en una habilidad inicial para adherirse a una superficie plástica. A partir de esta tamización inicial, las poblaciones celulares se obtienen como poblaciones clonales, desde unidades individuales formadoras de colonia sobre la superficie. Éstas han sido denominadas en la literatura también como "células madre mesenquimales" aunque el término puede ser incorrecto porque las células no mesenquimales pueden estar incluidas dentro de las células aisladas. En una aproximación conocida de aislamiento, estas poblaciones de células conocidas son derivadas de células madre que presentan reacción positiva a la fosfatasa alcalina (ALP) y CD271. Sin embargo, en términos clínicos la célula es esencialmente no identificada.

50 Las poblaciones celulares son preparadas a partir de estas células aisladas conocidas, tales como mediante expansión clonal a partir de una célula individual aislada, y usadas para trasplante. Sin embargo, los resultados varían en que las poblaciones de células trasplantadas se comportan algunas veces de manera más bien diferente de lote a lote, y de una manera poco predecible.

55 En la técnica previa, las poblaciones celulares tienden a formar hueso y grasa y cartílago, pero con control limitado, haciendo frecuentemente grasa cuando se requiere hueso o cartílago. A la inversa, por ejemplo cuando se prefiere obtener células que hagan grasa, estas células que producen grasa son obtenidas sólo de manera no confiable.

60 Un problema significativo es que la población celular inicial es esencialmente indefinida, porque el aislamiento basado en la adherencia al plástico no es una definición suficientemente técnica para un tipo de célula. Incluso cuando son

seleccionadas, por ejemplo, por los marcadores mencionados (ALP y CD271), la expresión de estos marcadores en las células o en la progenie desaparece rápidamente durante el cultivo, dejando una población efectivamente indefinida. Las propiedades útiles de las células también se reducen o desaparecen con el tiempo – otro problema con una población celular indefinida. Jones et al, *Arthritis & Rheumatism*, vol. 62, no. 7, pp1944-1954 describen el aislamiento de células estromales (MSCs) multi-potentes derivadas de la médula ósea humana que incluye la clasificación de células CD45bajaCD271+, usadas para terapia celular.

Rozemuller et al, *Stem cells and Development*, vol. 19, no. 12, 1 diciembre de 2010, pp 1911 - 1921 describen el aislamiento de MSCs con varios anticuerpos que incluyen un anticuerpo para CD271 y posterior enriquecimiento para la actividad de CFU-F.

Kozanoglu Ilknur et al, *Cytotherapy*, vol. 11, no. 5, 2009, pp 5270533 describen el aislamiento de MSCs usando un anticuerpo NG2.

Cuthbert Richard et al, *Cytotherapy*, vol. 14, no. 4, 12 enero de 2012, pp 431-440 describen el aislamiento de células estromales brillantes CD45bajaCD271.

Objetivos de la invención

Es un objetivo global de la invención suministrar métodos para el aislamiento de células madre estromales y poblaciones celulares y tejidos derivados de ellas que son por lo menos una alternativa para la técnica, y es un objeto de realizaciones particulares de la invención suministrar métodos que son mejorados, por ejemplo a través de la definición aumentada de las células obtenidas, o células y tejidos que son mejorados, por ejemplo mediante confiabilidad aumentada de sus propiedades, haciéndolos más adecuados para aplicaciones clínicas.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el aislamiento prospectivo de células madre estromales, especialmente células madre estromales humanas, con base en la expresión de marcadores o antígenos que son expresados en una pluralidad de especies de mamíferos. En los métodos y poblaciones celulares de la invención, las células son clasificadas con base en la expresión de un marcador particular de especies cruzadas, donde esto es denominado como aislamiento prospectivo, y luego cultivo de las células obtenidas, dejando para identificación de las células, es decir unidades formadores de colonia de fibroblastos (CFU-Fs), las cuales pueden ser expandidas de manera clonal. La población celular obtenida después de la expansión clonal es entonces propuesta para usos terapéuticos, de trasplante y otros.

De acuerdo con ello, la invención suministra un método de aislamiento para una célula madre estromal, que incluye el aislamiento de una célula a partir de una población mixta de células de mamíferos, basado en la expresión de un marcador, en donde

el marcador se une a un anticuerpo, y en donde

dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador encontrado en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de humano, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo, donde el marcador es SDC2.

La invención suministra un método de aislamiento de una célula madre estromal, que incluye el aislamiento de una célula a partir de una población mixta de células de mamíferos, basado en la expresión del marcador, en donde el marcador (SDC2) es expresado por la célula de mamífero y en donde un marcador correspondiente es expresado también en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos, seleccionada de entre células de humano, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

Preferiblemente el marcador es encontrado en células madre estromales humana y células madre estromales de ratón, o en células madre estromales humanas y células madre estromales de rata, o en todas las tres. En todas las realizaciones de la invención, el marcador es SDC2.

De manera más específica, la invención suministra un método para el aislamiento de una célula madre estromal humana, que incluye el aislamiento de una célula a partir de médula ósea humana que es negativa para CD45 y positiva para otro marcador superficial celular (SDC2), en donde el otro marcador superficial celular se une a un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador celular superficial hallado en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo. De manera más

5 específica, la invención suministra un método para el aislamiento de una célula madre estromal humana, que incluye el aislamiento de una célula de médula ósea humana que es positiva para FAP alfa y positiva para otro marcador superficial celular, en donde el marcador superficial adicional celular se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador superficial celular hallado en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos, seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

10 Preferiblemente el marcador adicional es encontrado en células madre estromales humanas y células madre estromales de ratón, y en células madre estromales humanas y células madre estromales de rata, o en todas las tres. En todas las realizaciones, el marcador adicional es SDC2.

15 También se suministran métodos para la obtención de una población de células, que incluyen el aislamiento de células de acuerdo con la invención y la derivación de la población de aquellas células aisladas; y se suministran métodos para la obtención de una población clonal, que incluyen el aislamiento de una célula individual de acuerdo con la invención y la derivación de una población clonal de células a partir de la célula individual.

20 Las células así obtenidas son suministradas también por la invención - por ello, poblaciones de células estromales, preferiblemente células madre estromales, enriquecidas respecto al marcador. El enriquecimiento es de hasta 30% o más, 35% o más, o 40% o más de células que son positivas respecto al marcador.

25 Se obtiene una población específica de células de la invención mediante:

suministro de una célula madre estromal humana,

25 derivación de una población clonal de células a partir de la célula madre estromal humana, y

opcionalmente, crecimiento adicional y/o expansión y/o paso de las células a cultivo,

30 en donde la célula madre estromal humana es aislada de médula ósea, es negativa para la expresión de CD45 y es positiva para la expresión de un marcador adicional celular superficial (SDC2), en donde el marcador celular superficial adicional se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador superficial celular encontrado en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

35 Se obtiene una población específica adicional de células de la invención mediante:

suministro de una célula madre estromal humana,

40 derivación de una población clonal de células de la célula madre estromal humana, y

opcionalmente, crecimiento adicional y/o expansión y/o paso de las células a cultivo,

45 en donde la célula madre estromal humana es aislada de médula ósea, es positiva para la expresión de FAP alfa y es positiva para la expresión de un marcador celular superficial adicional (SDC2), en donde el marcador celular superficial adicional se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador celular superficial encontrado en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

50 Mediante la invención se suministran productos de las células tales como productos de células de huesos, tendón de cartílago y otras células madre estromales, como son uso de las células por ejemplo en ensayos.

55 La invención hace posible la identificación de células madre estromales deseadas, sobre la base de expresión específica del marcador, suministrando células purificadas y definidas de manera prospectiva y poblaciones derivadas de ellas.

60 Detalles de la invención

Por esto, la invención suministra un método para el aislamiento de una célula madre estromal, que incluye el aislamiento de una célula de una población mixta de células de mamíferos, basada en la expresión de un marcador superficial celular, en donde

el marcador superficial celular se une a un anticuerpo, y donde

dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador superficial celular hallado en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de entre células de humano, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo, donde el marcador es SDC2.

- 5 El anticuerpo puede reconocer un marcador superficial celular sobre una célula humana y reaccionar de manera cruzada con un marcador superficial celular sobre por lo menos otra célula de mamíferos seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo. En uso, tales métodos son adecuados para el aislamiento de células de humanos, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo, en particular células de humano.
- 10 El anticuerpo puede reconocer un marcador superficial celular sobre una célula equina y reaccionar de manera cruzada con un marcador superficial celular en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de humano, ratón, rata, conejo y cerdo. En uso, tales métodos son adecuados para el aislamiento de células de humano, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo, en particular células de equino.
- 15 De modo similar, la invención suministra un método para el aislamiento de una célula madre estromal, que incluye el aislamiento de una célula de una población mixta de células de mamífero, con base en la expresión del marcador celular superficial, en donde el marcador celular superficial es expresado por la célula de mamífero y en donde un correspondiente marcador celular superficial es expresado también en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de humano, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.
- 20 El marcador puede ser expresado en una célula humana y el correspondiente marcador puede ser expresado en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo, para aislamiento por ejemplo de células humanas. El anticuerpo puede ser expresado sobre una célula equina y el correspondiente marcador expresado en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de entre células de humano, ratón, rata, conejo y cerdo, para el aislamiento por ejemplo de células equinas. Un marcador es un marcador correspondiente si puede usarse un anticuerpo para clasificar células de humano con base en la unión a un marcador en células de humano y aquel mismo anticuerpo puede ser usado para clasificar células de otras especies de mamífero.
- 25 El aislamiento prospectivo de células madre estromales de la invención, usa así marcadores hallados a través de especies, referido a la unión a un anticuerpo común de marcadores en diferentes especies de mamífero. En una realización específica descrita bajo, el anticuerpo para humano SDC2 se une a y puede ser usado para aislar células madre estromales humanas y también se une a y puede ser usado para aislar células madre estromales en ratón, rata, caballo y conejo.
- 30 El anticuerpo puede unirse a o reaccionar de manera cruzada con marcadores en células de por lo menos tres especies de mamífero, por lo menos cuatro o por lo menos cinco especies.
- 35 De manera separada, la invención suministra un método para la obtención o derivación de una población de células madre estromales, que incluye el aislamiento prospectivo de células con base en la expresión de un marcador que es expresado de manera similar en célula de humano y por lo menos otra de ratón, rata, conejo, caballo y cerdo, para el aislamiento por ejemplo de células madre estromales humanas.
- 40 En realizaciones de la invención, se aíslan células madre estromales de acuerdo con la expresión de un marcador expresado en por lo menos células madre estromales de humano y de ratón, en por lo menos células madre estromales de humano y de rata o en por lo menos células madre estromales de humano, ratón y rata. Por esto, por ejemplo, puede usarse un anticuerpo para SDC2 para aislar poblaciones correspondientes de células madre estromales en humano, ratón, conejo, caballo y rata. Otros anticuerpos conocidos para NG2 y FAP alfa, detalles de los cuales se encuentran abajo, pueden ser usados para aislar poblaciones correspondientes de células madre estromales en humanos, ratones y ratas. De modo correspondiente, por ello pueden obtenerse poblaciones de células madre estromales, y derivadas de ellas, de dos o de todas las tres especies, en paralelo o para comparación o para ejecutar análisis de células estromales de una especie, antes de trabajar sobre células madre estromales de otra.
- 45 50 Son adecuadas varias fuentes de las células iniciales a partir de las cuales se aíslan las células madre. Una fuente, una población mixta de células de mamíferos, puede ser médula ósea, tejido adiposo, músculo esquelético, endometrio, placenta, cordón umbilical, sangre del cordón umbilical y gel de Wharton. Pueden usarse fuentes de células de humano, ratón, rata, conejo, equino y cerdo, y en ejemplos específicos se han usado células de humano. Una fuente usada en los ejemplos es médula ósea, y una fuente específica preferida es médula humana ósea. Otra fuente son células, por ejemplo SSCs, derivadas de células humanas pluripotentes. En un ejemplo, se usaron SSCs humanas de células hES.
- 55

5 En uso de la invención, puede ejecutarse una clasificación inicial sobre la sola base del primer marcador, es decir expresión de SDC2. Generalmente este método aísla también células no deseadas, significando células que no son células madre estromales y pueden ser por ejemplo células B o células T. Sin embargo, mediante el paso adicional de aislamiento de CFUs, estas células no deseadas pueden perderse dado que ellas no forman colonias, de modo que este nivel de clasificación puede ser aceptable en la medida en que sólo las células estromales deseadas capaces de formar CFUs producirán entonces poblaciones clonales.

10 En ciertas realizaciones de la invención, se aíslan células con base en la expresión de dos marcadores separados. La selección de combinación de células puede ser selección para células positivas/ positivas, significando que las células son seleccionadas si ellas son positivas para la expresión del primer marcador y positivas para la expresión del segundo marcador. La selección puede también ser para positivo / negativo, para negativo / positivo o para negativo/negativo.

15 Un método de combinación de la invención, que combina típicamente uno o más o todos los rasgos de cualquier método descrito en otra parte aquí, incluye por ello el aislamiento de células sobre la base de la expresión de un marcador celular superficial adicional diferente del primero. Este puede ser denominado como el segundo marcador, aunque la nomenclatura es indicar simplemente que los marcadores son diferentes uno de otro y no indica una diferencia temporal en los tiempos de selección o aislamiento de acuerdo a aquel marcador. La selección con base en los marcadores puede ser secuencial, en cualquier orden, aunque es llevada a cabo comúnmente en una clasificación o aislamiento individuales, los cuales pueden ser simultáneos, como lo haga posible la tecnología disponible.

20 Un segundo marcador adecuado es CD45. De modo adecuado, se seleccionan células que son negativas para CD45. Otro marcador adecuado es FAP alfa; de modo adecuado se seleccionan las células que son positivas para FAP alfa. De modo adecuado los marcadores superficiales de la primera célula incluyen SDC2 y NG2.

25 En otro uso de la invención, se lleva a cabo una clasificación inicial sobre la base de expresión de CD45, donde se selecciona la fracción negativa. Se lleva a cabo una clasificación separada sobre la base del primer marcador, por ejemplo expresión de SDC2. Puede tomarse la fracción positiva o puede tomarse la fracción negativa. En la práctica, generalmente se lleva a cabo la clasificación de manera simultánea. La viabilidad celular puede ser reducida dramáticamente en la clasificación secuencial.

30 En un método particular de la invención, se seleccionan las células positivas para el primer marcador; estos métodos son adecuados para el aislamiento de células osteogénicas y células angiopoyéticas.

35 Un método específico de aislamiento de una célula madre estromal humana incluye el aislamiento de una célula de médula ósea humana que es positiva para un primer marcador y negativa para CD45, en donde el primer marcador se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador encontrado en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

40 El primer marcador es SDC2 y el aislamiento usa un anticuerpo que se une a SDC2 y reacciona de manera cruzada con un marcador correspondiente a todas las de humano, ratón, rata, caballo, conejo. El primer marcador puede ser NG2 y el aislamiento usa un anticuerpo que se une a NG2 humano y reacciona de manera cruzada con un marcador correspondiente a NG2 en una o más células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

45 La combinación de clasificación de marcador puede incluir también clasificación de acuerdo con tres marcadores diferentes, por ejemplo sobre la base del segundo marcador y entonces dos o más primeros marcadores. Puede usarse la clasificación por NG2 para subdividir la población SDC2 +ve.

Las células madre estromales aisladas específicas descritas aquí son:

- 50 (i) CD45 -ve, SDC2 +ve
 (ii) CD45 -ve, SDC2 -ve
 (iii) CD45 -ve, SDC2 +ve, NG2 +ve
 (iv) CD45 -ve, SDC2 +ve, NG2 -ve
 (v) FAP alfa +ve, SDC2 +ve
 55 (vi) FAP alfa +ve, SDC2 -ve
 (vii) FAP alfa +ve, SDC2 +ve, NG2 +ve
 (viii) FAP alfa +ve, SDC2 +ve, NG2 -ve

60 A partir de células que han sido aisladas pueden obtenerse cultivos y poblaciones celulares. Esto puede ser logrado mediante expansión clonal de una célula aislada (por ejemplo una célula que es por lo menos inicialmente negativa para

5 CD45 y positiva para SDC2 o negativa para CD45 y negativa para SDC2) y luego crecimiento o cultivo continuado de las células obtenidas. Nótese que las células obtenidas mediante este crecimiento y cultivo continuado y transferencia tienden inicialmente a demostrar el mismo espectro de marcador que la célula o células aisladas originalmente. A lo largo del tiempo, el patrón de expresión puede cambiar. Pero las propiedades de la población resultante están ligadas a los criterios del aislamiento inicial (por ejemplo una célula que es por lo menos inicialmente negativa para CD45 y positiva para SDC2 o negativa para CD45 y negativa para SDC2).

10 A partir de células que han sido aisladas, generalmente pueden obtenerse cultivos y poblaciones celulares que tienen una elevada homogeneidad, medida por la expresión del marcador o antígeno usado para el aislamiento. Por ello, las poblaciones de células estromales de mamíferos son suministradas también con la invención, expresando elevados niveles del primer marcador celular superficial. El % de células que expresan el primer marcador puede ser 50% o más, 60% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, o 90% o más. En una realización específica de la invención descrita abajo en más detalle, las poblaciones celulares iniciales expresan el primer marcador en un nivel de 95% o más. En cuanto se refiere a las células que son positivas, se hace referencia a positiva como se mide en o sobre la superficie celular, por ejemplo como es detectable usando un anticuerpo etiquetado al marcador.

15 También pueden derivarse poblaciones celulares de las de arriba, por ejemplo mediante cultivo y/o transferencia, y al hacerlo de este modo puede reducirse la proporción de células que retienen expresión del primer marcador, pero sin embargo permanecer mayores que en las poblaciones no seleccionadas sobre la base del marcador. Por esto, la invención suministra también otras poblaciones celulares de mamíferos que expresan altos niveles del primer marcador. El % de células que expresan el primer marcador puede ser de 30% o más, 40% o más, 50% o más, o puede estar en los niveles citados inmediatamente arriba. Las poblaciones celulares de la invención tienen pureza especificada y están definidas. Las células pueden ser identificadas/seleccionadas sobre la base de la expresión del marcador y usadas inmediatamente, sin necesidad de cultivo para determinar si se ha obtenido una población suficientemente pura de células.

En todas las modalidades de la invención, el marcador es SDC2.

30 Así, se suministra una población de células madre estromales de mamíferos, en donde 75% o más de las células son positivas para el marcador superficial celular, y en donde también se expresa un marcador celular correspondiente, en una célula de por lo menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de humano, ratón, rata, caballo, conejo y cerdo. El marcador es expresado de manera adecuada en una célula humana y el marcador correspondiente es expresado en una célula de ratón y opcionalmente también en por lo menos otra célula de mamíferos seleccionada de entre células de rata, caballo, conejo y cerdo. El marcador es expresado de manera adecuada en una célula humana y el marcador correspondiente es expresado en una célula de rata y opcionalmente también en por lo menos otra célula de mamíferos seleccionada de entre células de ratón, caballo, conejo y cerdo. En otra población a modo de ejemplo de células madre estromales, 75% o más de las células son positivas para SDC2, y estas células eran osteogénicas. Además, las células pueden caracterizarse adicionalmente por niveles de expresión del segundo marcador. El % de células que expresan el segundo marcador puede ser 50% o más, 60% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, o 90% o más. En una realización específica de la invención descrita abajo en más detalle, 95% o más de las células en las poblaciones iniciales son positivas para el segundo marcador. Las células pueden ser separadamente negativas para el segundo marcador.

45 El % de células que no expresan el segundo marcador puede ser de 50% o más, 60% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, o 90% o más. En una realización específica de la invención descrita abajo en más detalle, 95% o más de las células en las poblaciones iniciales de células, son negativas para el segundo marcador. En una población a modo de ejemplo de células madre estromales osteogénicas y angiopoyéticas, 75% o más de las células son positivas para SDC2 y 75% o más de las células son negativas para CD45.

50 De acuerdo con ello, la invención suministra también un método para obtener una población de células que incluye el aislamiento de células de acuerdo con los métodos descritos, y la derivación de población de aquellas células aisladas; y la invención suministra además un método para obtener una población clonal de células, que incluye el aislamiento de una célula individual de acuerdo con los métodos descritos y derivación de una población clonal de células a partir de la célula individual. Generalmente, el cultivo incluye la obtención de una población inicial de células y entonces el crecimiento y/o expansión y/o traspasso adicionales de las células en cultivo. SDC2 es el marcador que caracteriza de modo específico los ejemplos descritos abajo.

Las poblaciones de células descritas en ejemplos específicos abajo han sido obtenidas y se ha hallado que exhiben propiedades útiles. Por ello, adicionalmente la invención suministra una población de células que puede ser obtenida de

acuerdo con los métodos descritos y reivindicados. Las poblaciones de células son preferiblemente células de humano, equino, conejo, ratón y/o rata.

Se obtiene una población de células de una realización específica, mediante:

- 5 suministro de una célula madre estromal humana,
 derivación de una población clonal de células a partir de la célula madre estromal humana, y
 10 opcionalmente, crecimiento y/o expansión y/o traspaso adicionales de las células en cultivo,
 en donde la célula madre estromal humana es aislada de médula ósea, es negativa para la expresión de CD45 y es positiva para la expresión de SDC2, en donde el marcador celular superficial adicional se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de manera cruzada con un marcador superficial celular hallado en una célula de por lo
 15 menos otra especie de mamíferos seleccionada de entre células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

La invención suministra tejidos mediante la obtención de células de acuerdo con los métodos descritos, y obtención de tejidos de ellas. De este modo pueden obtenerse tejidos seleccionados de hueso, cartílago y tendón. Pueden obtenerse también tejidos adiposos o tejidos para cirugía reconstructiva.

- 20 Un uso adicional de la invención radica en el suministro de células para y ensayos que usan las células aisladas y la progenie de ellas. Por ello, un método de realización de un ensayo incluye la obtención de células de acuerdo con los métodos descritos, y uso de estas células en el ensayo.

- 25 Como se mencionó, las poblaciones de la técnica previa tienden a formar hueso y grasa y cartílago, con control limitado y produciendo así algunas veces grasa cuando se requiere hueso o cartílago. Pueden prepararse poblaciones celulares de la invención para que no tiendan a formar grasa. Esto es una ventaja. Pueden prepararse poblaciones celulares de la invención separadas, que en verdad tiendan a formar grasa. Así se provee al usuario de un mayor control y mayor capacidad para predecir las propiedades de las células, con base en un criterio específico de selección del marcador
 30 celular.

Una ventaja de las poblaciones específicas de células de la invención puede ser puesta en otras palabras, es decir para las células que son negativas para CD45, positivas para SDC2 que ellas con mayor frecuencia tienden a ser osteogénicas, generadoras de poblaciones de células que producen hueso y cartílago. Mediante ello puede solucionarse la dificultad de la técnica anterior de resultados mixtos y baja reproducibilidad en la obtención de hueso y cartílago. Las poblaciones específicas de células que pueden ser obtenidas ahora pueden tener ventajas adicionales; por ejemplo, las poblaciones positivas para SDC2 parecen ser más angiopoyéticas, inductoras de células vecinas para formar vasculatura. Esto es ventajoso en el tratamiento de enfermedades que se beneficiarían de una mejor vasculatura, por ejemplo enfermedades isquémicas.

- 40 Adicionalmente, las poblaciones positivas para SDC2 derivan en métodos específicos de la invención, de células iniciales que son más altamente definidas que en la técnica anterior, por referencia a un marcador que persiste en células y en progenie. En sí misma, esta es una ventaja. La población celular es una población aceptablemente definida.

- 45 Una potencial ventaja adicional de la invención es que el marcador usado para el aislamiento prospectivo de la población inicial de célula, es útil también para el aislamiento prospectivo de poblaciones de células de otras especies. Así, en una realización específica, SDC2 es común a través de todos de humano, ratón, rata, caballo, conejo. Como un resultado, es posible aislar una población correspondiente en, digamos, células de ratón y entonces extrapolar del trabajo en células de ratón al trabajo en células de humano. Una población definida en el ratón puede ser usada para obtener datos que puedan entonces ser tomados posteriormente en una población definida de manera correspondiente en otras especies, especialmente células de humano. Un problema que se cree cierto para las poblaciones de células madre mesenquimales de la técnica anterior, es decir aquellas obtenidas usando un aislamiento prospectivo conocido, es que el marcador usado para el aislamiento, digamos, de las células de ratón no tiene un patrón de expresión correspondiente en las células de humano. La invención puede así suministrar poblaciones de células definidas con poblaciones paralelas de especies cruzadas, tales como ratón y humano o ratón y equino, etc. Esto facilita el trabajo pre-clínico y
 50 clínico porque el conocimiento obtenido a partir de experimentos llevados a cabo inicialmente en células de una especie, puede ser transferido al trabajo posterior en las poblaciones de células definidas correspondientes en otras especies.

- 60 Las células y tejidos de la invención, y composiciones que incluyen las células y tejidos, pueden ser usados para tratar varias condiciones y enfermedades de mamíferos, incluyendo en particular aquellos que pueden ser tratados usando

células y productos derivados de productos SSC existentes. Las células y tejidos pueden interactuar con células dendríticas y conducir secreción IFN- β , y por ello pueden ser usados como un supresor de tumor. En general el cáncer puede ser tratado usando la invención, incluyendo específicamente carcinoma hepatocelular, cáncer cervical, cáncer pancreático, cáncer de próstata, fibrosarcoma, blastoma medular, y astrocitoma. Pueden tratarse enfermedades de los pulmones incluyendo daño agudo del pulmón (ALI); síndrome de distensión respiratoria aguda (ARDS); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Las células y tejidos pueden ser usados para tratar sepsis, falla de multiórganos inducida por sepsis, trasplante de médula ósea (BMT) o rechazo de célula madre hematopoyética (HSC); rechazo de trasplante de órganos sólidos (SOT) (incluyendo hígado, riñón, piel, córnea, corazón, pulmón); falla aguda del hígado inducida por toxina; hepatitis autoinmune; cirrosis biliar primaria (PBC) y colangitis esclerosante primaria (PSC); osteonecrosis; enfermedad degenerativa de disco; artritis reumatoide; osteoartritis y retardo en la cura de huesos en pacientes diabéticos; nefritis autoinmune incluyendo granulomatosis de Wegener (WG); quemaduras, quemaduras severas; condiciones de desgaste del músculo y síndromes atróficos incluyendo sarcopenia; caquexia y otras condiciones de desgaste del músculo incluyendo las distrofias musculares (Duchenne y Becker); falla cardíaca congestiva, infarto agudo del miocardio y apoplejía; diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; retinopatía diabética y otras retinopatías; nefropatía diabética y otras nefropatías; neuropatía diabética y otras neuropatías; úlceras diabéticas que no curan; cardiomiopatía diabética y otras miopatías; aterosclerosis; enfermedad arterial periférica e isquemia crítica de miembros inferiores; uveítis; degeneración macular aguda (AMD) (húmeda o seca); daño de retina y córnea; condiciones autoinmunes tales como gastritis autoinmune (AIG); enfermedad de injerto versus huésped (GvHD); esclerosis múltiple y enfermedades demielinizantes; enfermedad de la tiroides; enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enfermedad fistulizante de Crohn; escleroderma; lupus (SLE); enfermedad de Graves; y enfermedad autoinmune linfoproliferativa (ALPS).

Las células y tejidos pueden ser usados también para tratar varias condiciones equinas particulares, incluyendo laminitis, daños de tendón y hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH) -también conocida como "sangrado" o un "ataque de sangrado".

La presente invención suministra también una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o desorden en un animal, en particular un mamífero y por ejemplo un humano o caballo. De manera adecuada la composición farmacéutica incluye células o tejidos de la invención en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o desorden en el animal. Así, las células pueden ser administradas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las células pueden ser administradas como una suspensión de células en un medio líquido farmacéuticamente aceptable para inyección. Son ejemplos de medio líquido soluciones salinas, soluciones salinas con tampón de fosfato, que contienen opcionalmente también materiales adicionales tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y albúmina de suero humano. Generalmente las células y tejidos pueden ser administrados en una variedad de formatos como se conocen para células madre mesenquimales existentes y productos similares y tejidos derivados de ellas. Ellos pueden ser administrados de manera sistémica, por ejemplo infusión intravenosa, o inyección directa. La composición puede incluir una matriz de andamio, o pueden administrarse células o tejidos mediante inyección en un sitio que ya incluye in situ matriz o andamio. Así las células o tejidos pueden ser administrados en combinación con ácido hialurónico, colágeno u otra matriz extracelular. Ejemplos de otra formulación y administración que pueden ser aplicados mutatis mutandis a las células y tejidos de invención, pueden ser hallados en la técnica, por ejemplo en WO2001080865, EP2545928 y WO1999061587. Se suministra un método de tratamiento de un animal, que incluye la administración al animal de una composición de la invención. Se suministran células o tejidos de acuerdo con la invención, para el uso en tratamiento de una enfermedad o desorden de un animal. Las realizaciones de los métodos y usos incluyen generalmente realizaciones de la invención, como se describe aquí.

Para la persona diestra están disponibles anticuerpos adecuados, para la ejecución de clasificación y aislamiento basados en los marcadores identificados. Un anticuerpo humano NG2/MCSP está disponible de R&D Systems, Inc. (614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, EEUU), como un IgG1 monoclonal de ratón Clone # 7.1, número de catálogo: MAB25851. Un anticuerpo NG2 (G-20) está disponible de: Santa Cruz Biotechnology, Inc. (2145 Delaware Avenue, Santa Cruz, California, 5060, EEUU), ref: sc-30923, reactivo con ratón, rata, humano, equino, canino, bovino y porcino; también está disponible el péptido de bloqueo, sc-30923 P. Un anticuerpo α /FAP de Proteína de Activación de Fibroblasto Humano, número de catálogo: AF3715, está disponible de R&D Systems, Inc. Un anticuerpo FAP alfa (Y-16) está disponible de Santa Cruz Biotechnology, Inc. reactivo con por lo menos humano, rata y ratón y también equino, canino, bovino, porcino y aviar. Una proteína de activación Anti-Fibroblasto, anticuerpo alfa, ab28243, está disponible de Abcam (330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, Reino Unido) reactivo con por lo menos ratón, rata y humano. Un anticuerpo Syndecan 2, orb13481, reactivo con por lo menos humano, ratón y rata está disponible de Biorbyt Ltd. (12 Pembroke Avenue, Denny Industrial Centre, Waterbeach, Cambridge, CB25 9QR, Reino Unido). El anticuerpo SDC2 usado en ejemplos específicos, número de catálogo: MAB29651 (Clone 305507) está disponible de R&D Systems, Inc, reactivo con humano, ratón, rata, equino, conejo y cerdo.

SDC2, también llamado Fibroglicano y ahora, CD362, fue caracterizado originalmente por vía bioquímica como una de las mayores proteínas celulares superficiales que contienen sulfato de heparan (HS) glicosaminoglicano (GAG) expresadas en el pulmón. SDC2 es uno de cuatro miembros de esta familia de paso simple transmembrana en vertebrados. Aquí, la referencia a "S2" y "SDC2" se refiere a SDC2.

5 Ahora la invención es descrita en realizaciones específicas con referencia a las ilustraciones acompañantes en las cuales:

10 Fig. 1 muestra etiquetado por anticuerpo anti-SDC2 de células madre estromales humanas pero no fibroblastos humanos de pulmón. Las líneas verdes indican tinción anti-SDC2-APC de células. Las líneas rojas indican etiquetado con anticuerpo adecuado de control (IgG2B de rata isotipo Control-APC; R&D # IC013A; Clone - 141945). Las líneas azules indican etiquetado positivo de control de MRC5 con anticuerpo anti-PDGFRa-APC (R&D Systems # FAB1264A; Clone - PRa292);

15 Fig. 2 muestra etiquetado por anticuerpo SDC2-APC de células mononucleares de médula ósea humana CD271^{brillante}/CD45^{baja}. Los datos muestran perfil de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de 3.5×10^7 BMMNCs teñida con los arriba mencionados SDC2-APC, CD271-PE y CD45-FITC (ambos de BD). La tinción de CD45-FITC permitió la entrada de BMMNCs a 3 poblaciones, (A) CD45-ve -AZUL, (B) CD45baja -NARANJA, y (C) CD45alta -VERDE. En (B) TP SDC2+ve/CD271brillante/CD45baja raro, las células son AZUL;

20 Fig. 3 muestra enriquecimiento aumentado en CFU-F de células mononucleares de médula ósea clasificadas SDC2+/CD271^{brillante}/CD45^{baja}. Los datos muestran perfil de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) de 10^7 BMMNCs teñidas con los arriba mencionados SDC2-APC, CD271-PE y CD45-FITC (ambos de BD);

25 Fig. 4 muestra un porcentaje de pozos de una placa de 96 pozos en la cual no se formaron clones, como función del número de células mononucleares SDC2+/CD271^{brillante}/CD45 por célula;

Fig. 5 muestra el número de duplicaciones de población de clones;

30 Fig. 6 muestra deposición in vitro GAG de células madre estromales SDC2+ a una tensión de oxígeno de 2% y 19%. Se muestran secciones representativas de histología teñida de safranina-O de pellas de micromasa derivada de SDC2+SSC;

35 Fig. 7 muestra deposición in vitro de lípidos de células madre estromales SDC2+ y SDC2 (etiquetadas como S2+ y S2- respectivamente);

Fig. 8 muestra deposición de calcio de células madre estromales SDC2+ y SDC2 en respuesta a estímulo osteogénico in vitro;

40 Fig. 9 muestra deposición de GAG de células madre estromales SDC2+ y SDC en respuesta a estímulo condrogénico in vitro;

45 Fig. 10 muestra información relativa de cuerda HUVEC de células madre estromales SDC2+ y SDC2 en respuesta a estímulo angiogénico in vitro;

Fig. 11 muestra que células mononucleares de médula ósea humana CD45-/SDC2+ raras expresan marcador de célula madre estromal CD271, CD146 y NG2;

50 Fig. 12 muestra expresión de SDC2 de células madre estromales aisladas de y médula ósea de conejo;

Fig. 13 muestra el incremento en los niveles de SDC2 en células madre estromales derivado de médula ósea equina por confluencia, y células madre estromales derivadas de médula ósea de cerdo expresan SDC2 en baja tensión de oxígeno;

55 Fig. 14 muestra incremento en los niveles de SDC2 en células madre estromales derivado de tres cepas de médula ósea de rata, por confluencia;

Fig. 15 muestra aislamiento FACS de célula mononuclear CD45 con co-tinción para SDC2 y Scal; y

60 Fig. 16 muestra enriquecimiento aumentado en CFU-F en células mononucleares de ratones seleccionados SDC2+/Scal.

5 Nosotros usamos un anticuerpo monoclonal de rata IgG2B para los humanos SDC2 conjugado a la alofocianina (APC) fluorocromo (R&D Systems número FAB2965A; clon 305515) para indicar si la expresión de proteína SDC2 está enriquecida sobre la superficie celular de SSC humano, en comparación con un control de línea de células de fibroblasto de pulmón fetal humano, MRC5. Los fibroblastos de pulmón MRC5 cultivados en medio de crecimiento SSC (aMEM/10% PAA FSC; matraces NUNC T175) no expresaron SDC2 (Fig. 1). Como un control, nosotros mostramos que los fibroblastos MRC5 expresan el marcador PDGFRa (CD140a-APC). Éstos datos sugieren que la expresión de la proteína SDC2 está enriquecida sobre la superficie de SSC humano en comparación con control de fibroblastos de pulmón (Fig. 1).

10 En la actualidad, el estado de la técnica para la purificación de SSC de BM a base de anticuerpos consiste en el uso de una combinación de anticuerpos anti-CD271 (LNGFR) y anti-CD45, reportada por la Universidad de Leeds (Drs. McGonagle y Jones). Se ha mostrado que este aislamiento de células CD45baja/CD271brillante captura todas las CFU-F (SSC).

15 Sin embargo, puede ser difícil estandarizar de un laboratorio a otro la definición de células CD271 'brillantes'. Para investigar si este anticuerpo anti-SDC2 hace una co-tinción de CD45baja/CD271 brillante BMMNCs, se aspiraron 30 ml de BM humana del donante CRFG#0007 en la Clinical Research Facility (CRF) en el Hospital Universitario Galway (GUH) por Dr Ruth Morrell.

20 Se aislaron BMMNCs (5×10^8) mediante centrifugación Ficoll, se lavaron en PBS, se suspendieron nuevamente en tampón MACS y se bloquearon con bloque FC humano (Miltenyi, UK). Se tiñeron BMMNCs (4×10^7) con anti-SDC2-APC (R&D), anti-CD271-PE (BD) anti-CD45-FITC (BD) y pigmento de viabilidad Sytox/DAPI. Se analizaron las células por FACS en el Becton Dickinson Ariall en el NUI Galway.

25 Fig. 2 indica gráficas representativas de histograma/punto de experimentos de citometría de tinción triple SDC2/CD271/CD45. Fig. 2B indica BMMNCs que expresan niveles bajo/medio del marcador CD45 (naranja). De acuerdo con otros reportes, encontramos que las células positivas para CD271 son encontradas dentro de la población CD45baja (Fig. 2B) y en estos experimentos, notamos que el anticuerpo anti-SDC2-APC etiqueta células positivas para CD45baja/CD271. Específicamente, el anticuerpo anti-SDC2-APC etiqueta CD45baja/CD271 brillante BMMNCs. La población que es triple positiva para SDC2+/CD45baja/CD271+ es rara dentro de BMMNCs con una frecuencia que varía de 1:16,000 a 1:23,000.

30 Fig. 3 muestra que la fracción SDC2+/CD271+/CD45- MNC contiene 3000 veces más CFU-F/SSC comparado con BMMNCs nativas clasificadas previamente. A la inversa, la fracción negativa para SDC2 de la población CD271 + no retiene un número significativo de CFU-F/SSC

35 Se realizaron los experimentos de clasificación de células sencillas FACS para contar el número de células clonogénicas dentro de la población SDC2+/CD271+. Se clasificaron las SDC2+/CD271 +/CD45- MNC sencillas a 1, 3 y 20 células por pozo en una placa de 96 pozos. Un análisis de dilución limitante revela que, a 1 célula por pozo, se formaron 16-17 clones por placa de 96 pozos (Fig. 4). Todos los 16 clones fueron proliferativos y capaces de soportar 15-20 duplicaciones de población (Fig. 5). De modo notable, los clones SDC2+ seleccionados fueron capaces de soportar condrogénesis significativa en respuesta a cultivos de micromasa in vitro. Todos los cinco clones exhibieron deposición incrementada de glicosaminoglicano (GAG) cuando fueron cultivados en bajas tensiones de oxígeno (2%) (Fig. 6).

40 Cuando se comparan con SSC (de los progenitores) clasificadas previamente, las SDC2+SSC clasificadas por FACS y expandidas por cultivo exhiben deposición atenuada de manera significativa de lípidos, en respuesta a un estímulo in vitro con medio adipogénico potente sobre un régimen de 14 días de diferenciación (Fig. 7), como se visualiza con tinción con Aceite Rojo O, extracciones y determinación cuantitativa. A la inversa, comparadas con SDC2-SSC y SSC clasificadas previamente, SDC2+ SSC provocan una deposición incrementada de calcio y transformación incrementada en mineral de la matriz, en respuesta a una inducción de 14 días con un medio osteogénico, según se mide mediante extracción de calcio y tinción con Rojo Alizarina S respectivamente (Fig. 8). De manera notable, no se observó diferencia entre las tres poblaciones de SSC cuando fueron sometidas a cultivo de micromasa condrogénica (Fig. 9).

45 Las células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) pueden formar túbulos angiogénicos tipo cuerda dentro de 24 horas de haber sido sembradas en placa sobre matrigel rico en nutrientes. Los co-cultivos de SDC2+ SSC a una relación de 1:1 con HUVEC sobre matrigel provocan un incremento de 3 veces en el número de túbulos vasculares estables a 24 horas (Fig. 10).

50

55

Finalmente, las SDC2+/CD45- MNC humanas expresan también marcadores estromales claves incluyendo CD146, NG2 (CSPG4) y CD271 (Fig. 11).

5 La Fig. 12 representa histogramas de citometría de flujo de SSC derivadas de BM y MNC adiposas de tejido BM de cabra y conejo. Mientras el marcador SDC2 no parece ser detectable en SSC de cabra, pueden detectarse niveles significativos de proteína SDC2 en SSC de conejo (Fig. 12).

10 Un incremento en detección de proteína de SDC2 es aumentado en SSC de equino cultivadas en respuesta a cultivo confluyente (Fig. 13). La proteína SDC2 puede ser detectada también en una sub-población de SSC porcinas cuando son cultivadas en baja tensión de oxígeno (Fig. 13).

15 El marcador SDC2 es expresado sobre la superficie de SSC de rata (Fig. 14). Como se ve en SSC equinas, la proteína SDC2 incrementa en la superficie de SSC de rata en respuesta a confluencia. Este patrón puede ser visto en SSC derivadas de la médula de tres cepas de rata de laboratorio usadas típicamente, es decir Dark Agouti, Sprague Dawley y Lewis (Fig. 14).

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1.1 - Aislamiento de producto de aspiración de médula ósea

25 Se obtuvieron muestras de médula ósea humana de la cresta ilíaca posterior de voluntarios saludables (n=3) siguiendo el consentimiento escrito de los pacientes. Los pacientes soportaron pruebas de virología para HIV I y II, Hep A/C, HBsAg, núcleo anti-HB, sífilis y CMV de acuerdo con los requerimientos de la directiva de tejidos de la UE 2006/17/EC. Se forman conjuntos de muestras en un BSC y se dividen en alícuotas de 7.5 mL y se someten a centrifugación de gradiente de densidad.

Ejemplo 1.2 -Aislamiento y expansión de SSC humanas mediante centrifugación por gradiente de densidad (Ficoll)

30 En una cabina de seguridad biológica bajo técnicas asépticas, se transfieren con pipeta 7.5 mL de Ficoll a tubos de centrifuga de 50 ml. Para remover los coágulos, se filtraron los 30 ml de BM a través de un tamiz celular de 100 micras (BD Falcon) dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml. Se diluyó la médula filtrada 1/1 en D-PBS y luego se repartieron de manera equitativa entre los 4 tubos que contenían Ficoll, transfiriendo lentamente con pipeta la BM sobre el lado del tubo que estaba a un ángulo de 35° a 45° para asegurar una liberación lenta de BM, sin perturbar Ficoll o producir burbujas. Luego se sometieron a centrifugación los tubos por 22 minutos a 900 g, con los frenos de la centrifuga ajustados a cero para formar una muestra fraccionada. Después del procedimiento de centrifugación, los contenidos de los tubos formaron tres capas; una capa superior de plasma, una capa delgada – capa leucocitaria -contiene las MNC, una capa clara de Ficoll y una capa de fondo que contiene los constituyentes de las células rojas de la sangre—eritrocitos y granulocitos. Se realizó aspiración cuidadosamente a la capa leucocitaria teniendo cuidado de no perturbar las células circundantes. Se transfirieron entonces estas células a otro tubo de centrifuga de 50 mL y se suspendieron nuevamente en 45 mls de D-PBS. Se sometieron entonces estos tubos a centrifugación por 10 minutos a 350 g. Se realizó aspiración al sobrenadante y se suspendieron nuevamente las pellas en 5 mL de medio completo. Se realizó centrifugación a estos entonces por 10 minutos 350 g. Se realizó aspiración al sobrenadante y se reunieron las pellas en 5 mL de D-PBS.

45 Ejemplo 1.3 - Inoculación de placas CFU-F

50 Después del aislamiento de células mononucleares a través de la colocación directa en placas o Ficoll, se aislaron 9×10^6 células de ambos conjuntos de células y se inocularon en platos de 10 cm en triplicado a una densidad de inoculación de 3×10^6 MNC/placa. Se lavaron estas células y se alimentaron al mismo tiempo como células en cultivo, como se delineó arriba.

Ejemplo 1.4 - tinción de CFU-F con Cristal Violeta

55 En los días 12-14, se fijaron las células y se tiñeron para análisis de CFU-F. Se realizó aspiración al medio de las placas y se lavaron tres veces las placas en D-PBS para remover el medio remanente. Las células fueron fijadas mediante transferencia con pipeta de 8 mL de metanol al 95%, almacenado a -20°C, a las células por 10 minutos y agitación suave. Se aspiró el metanol de las placas y se lavaron las células una vez con D-PBS. Se añadieron entonces 8 mL de cristal violeta (0.5% de cristal violeta, 99.5% de metanol) a las placas y se agitaron suavemente las placas. Se dejaron las placas por 10-15 minutos. Se realizó aspiración al exceso de cristal violeta y se lavaron las células tres veces con D-PBS para retirar cualquier exceso remanente de tinción. Se invirtieron entonces las placas y se dejaron secar durante la

noche. Se tomaron entonces imágenes de las placas secas usando un escáner plano. Se contaron entonces las colonias y se les realizó caracterización mediante inspección visual bajo un microscopio de luz invertida (Olympus CKx41). Las colonias compuestas por agrupaciones mayores a 50+ fueron contadas como una CFU.

5 Ejemplo 2 - análisis de anticuerpos de células mononucleares y células madre estromales

La Tabla 1 muestra los detalles de los anticuerpos usados para tomar el perfil de las células mononucleares y células madre estromales producidas en el Ejemplo 1.

10

Tabla 1:

Anticuerpo	Proveedor	No. de catálogo
CD362/Sydecan-2	R&D Systems	N/A
CD271/LNGFR	BD	N/A
W8B2/TNAP/ALP	Miltenyi	N/A
TWEAK/TNFSF13	BD	N/A
APRIL/CD256	BD	N/A
CD146	BD	N/A
CD105	Invitrogen	MHCD10504
CD73	BD	550257
CD90	BD	555596
CD14	AbD Serotec	SFL2185
CD19	BD	345777
CD3	BD	345765
CD34	BD	555822
CD45	BD	555483
Controles Γ 1, γ 2a	BD	342409
HLA-DR	Invitrogen	MHLDR04
Control Γ 2b	Caltag	MG2b04

Preparación de la solución de bloqueo

La solución de bloqueo fue preparada mediante adición de 1 mL de FBS a 49 mL de D-PBS en un tubo de 50 mL.

15

Preparación de muestras

Se trataron las células con tripsina a 37°C y se transfirieron al medio de cultivo en tubos de 15 mL. Se realizó centrifugación a las células por 5 minutos a 400 g. Se realizó aspiración al sobrenadante y se suspendieron nuevamente las células en 5 mL de medio de cultivo completo. El conteo de células y prueba de viabilidad fueron ejecutados usando Trypan blue. Se realizó centrifugación entonces a las células por 5 minutos a 400 g y se realizó aspiración al sobrenadante. Se añadió entonces solución de bloqueo a las pellas de células para suspender las células nuevamente a 1×10^6 células/mL.

20

25 Tinción de SSC (análisis sobre Canto FACS)

Se retiraron de refrigeración anticuerpos etiquetados con PE y se colocaron sobre hielo con una placa de fondo redondo de 96 pozos (Sarstedt) y solución de bloqueo. Se transfirieron con pipeta 1×10^5 células (100 μ L) dentro de cada uno de 12 pozos de la placa de 96 pozos sobre hielo, uno para cada anticuerpo y 1 para células no teñidas. Se realizó centrifugación entonces a las placas por 4 minutos a 400 g, 4°C. Se realizó aspiración al sobrenadante cuidadosamente para no perturbar las pellas de células y se añadieron 50 μ L de solución de bloqueo a cada pozo y se suspendieron nuevamente las pellas mediante transferencia de la solución con pipeta.

30

Ejemplo 3 - Diferenciación condrogénica de SSC

35

La Tabla 2 muestra la composición del medio condrogénico incompleto (ICM).

Tabla 2:

Reactivo	Volumen	Concentración final
DMEM (HG)	95 mL	

Reactivo	Volumen	Concentración final
Dexametasona 1 mM	10 µL	100nM
Ácido ascórbico 2-P: 5 mg/mL	1 mL	50 µg/mL
L-Prolina: 4 mg/mL	1 mL	40 µg/mL
Suplemento ITS+	1 mL	6.25 µg/mL insulina bovina 6.25 µg/mL transferrina 6.25 µg/mL ácido selenioso 5.33 µg/mL ácido linoleico 1.25 mg mL BSA
Piruvato de sodio	1 mL	1mM
Penicilina/estreptomicina	1 mL	100 U/mL penicilina 100 µg/mL estreptomicina

Se descongelaron las células usando baño de agua a 37°C y se transfirieron rápidamente al medio de cultivo en tubos de 15 mL, lavando el criovial con 1 mL de medio. Se realizó centrifugación a las células por 5 minutos a 400 g. Se realizó aspiración al sobrenadante y se suspendieron nuevamente las células en 5 mL de medio de cultivo completo. Se ejecutó recuento de las células y se recolectaron suficientes células para formar pellas de entre 2-2.5x10⁵ células/pella. Se colocaron 4 cultivos positivos y 2 cultivos negativos para cada muestra. Se realizó centrifugación nuevamente a las células por 5 minutos a 400 g para remover el medio de cultivo. Se realizó aspiración al sobrenadante y se suspendieron nuevamente las células en 3 mL de medio condrogénico incompleto (ICM). Se dividieron 3 mL de suspensión de células en tubos de 15 mL (2 mL para pellas positivas, 1 mL para pellas negativas). Se realizó centrifugación a los tubos por 5 minutos a 100 g. Se suspendieron nuevamente las células para pellas positivas en 500 µL de medio condrogénico completo (CCM) para formar cada pella. CCM consiste en ICM con 0.5 µL de TGF-β por mL de ICM.

Se suspendieron nuevamente las células para pella negativa en 500 µL de ICM para formar cada pella. Se transfirieron las células a tubos Eppendorf con tapa rosca y se realizó centrifugación por 5 minutos a 100 g en un rotor que se abre hacia afuera. Se aflojaron las tapas de los tubos para permitir el intercambio de gas y se incubó en BSC a 37°C, 5% CO₂. Se cambió el medio cada segundo día mediante aspiración de tanto medio como fuera posible sin perturbar las pellas y reemplazando con bien fuera CCM o ICM para pellas positivas y pellas negativas respectivamente. El día 21, se recolectaron las pellas de células mediante la realización de aspiración de todo el medio y lavado dos veces en D-PBS. Se dejaron secar al aire las pellas y se emplearon 3 de las 4 pellas positivas para medición de GAG y la otra fue usada para histología. Se almacenaron a -20°C las pellas para medición GAG, y se fijó la pella usada para histología en formalina 10% por 1 hora y entonces se almacenó en agua hasta que estaba lista para ser procesada.

Ejemplo 4 - ensayo condrogénico

25 Preparación de solución patrón de DMMB

Se disolvieron 16 mg de DMMB durante la noche en 5 mL de etanol 100% grado reactivo. Se añadieron 2.73 g de NaCl y 3.04 g de glicina a 975 mL de agua desionizada. Se añadieron a esta solución 0.69 mL de HCl concentrado (11.6 M) y se mezcló. Se añadió a esta solución el DMMB disuelto. Se enjuagó entonces repetidamente el recipiente que contenía DMMB, con agua DI hasta que se transfirió toda la solución de DMMB. Se ajustó el pH a 3.0 con HCl 1 M. Se ajustó el volumen a 1 L con agua desionizada y se protegió la solución de la luz envolviendo en lámina de estaño.

Se preparó solución de papaína disolviendo 1 mg de papaína (Sigma P4762) en 9.75 mL de tampón caliente diluido. Se preparó papaína diluida mediante adición de 250 µL de esta solución a 10 mL de dilución tampón.

Se añadieron 200 µL de solución de papaína a cada pella y se permitió que ocurriera digestión durante la noche en horno a 60°C. Se agitaron entonces las muestras con aparato Vórtex para dispersar las pellas. Se construyeron estándares usando sulfato de 6-condroitina (Sigma C4384) mediante adición de 4 mg de sulfato de 6-condroitina a 10 mL de dilución tampón haciendo un patrón de 400 µg/mL. Éste fue entonces diluido para dar una solución de 40 µg/mL. Se hicieron diluciones como sigue, a partir de esta solución de 40 µg/mL como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3:

Solución de sulfato de condroitina (40 µg/mL)	Tampón de dilución	Concentración de GAG/pozo(50 µL)
200 µL	0 µL	2 µg
180 µL	20 µL	1,8 µg
160 µL	40 µL	1,6 µg
120 µL	80 µL	1,2 µg

ES 2 539 186 T3

Solución de sulfato de condroitina (40 µg/mL)	Tampón de dilución	Concentración de GAG/pozo(50 µL)
80 µL	120 µL	0,8 µg
40 µL	160 µL	0,4 µg
0 µL	200 µL	0 µg

5 Se añadieron en triplicado 50 µL de estándares y muestras a cada pozo de una placa de 96 pozos. Se añadieron 200 µL de DMMB de solución patrón a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente (RT) por 5 minutos. Se leyeron las placas usando un lector de absorbancia de placas a 595 nm. Las lecturas de absorbancia de los estándares que contenían 0 µL GAG/pozo fueron usadas como un valor blanco y sustraídas de las otras lecturas de absorbancia.

Medición de ADN usando PicoGreen

10 Se preparó solución de 1xTE mediante dilución de la solución patrón 20x suministrada en el kit Quant-iT (Sigma P7589) 1 en 20 partes de agua destilada. Se preparó una solución diluida de PicoGreen mediante dilución de DMSO a 1 en 200 partes de dH₂O. Se diluyó el patrón de ADN (100 µg/mL) en 1xTE 50 veces para dar una concentración final de 2 µg/mL. Se prepararon estándares de ADN como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4:

15

Patrón de trabajo de ADN	1xTE	Conc final de ADN/mL
400 µL	0	2000 ng
200 µL	200 µL	1000 ng
100 µL	300 µL	500 ng
40 µL	360 µL	200 ng
20 µL	380 µL	100 ng
10 µL	390 µL	50 ng
4 µL	396 µL	10 ng
0 µL	400 µL	0 ng

20 Se diluyeron adicionalmente muestras a las que se había hecho digestión con papaína (descrito arriba), 25 veces en 1xTE. Se añadieron 100 µL de estándares y muestras en triplicado a una placa negra de 96 pozos. La placa tiene que ser negra porque la reacción es afectada por la luz. Se añadieron 100 µL de solución de PicoGreen a cada pozo de estándar y muestra y se dejó incubar por 2-3 minutos. Lectura de las placas sobre lector fluorescente de placas, excitando primero la placa a 485 nm y luego realizando la lectura de la placa a 538 nm.

Ejemplo 5 - diferenciación adipogénica de SSC

25 La Tabla 5 muestra la composición del medio de inducción adipogénica.

Tabla 5:

Reactivo	Volumen (para hacer 100 mL)	Concentración final
DMEM (HG)	87.6 mL	
Dexametasona 1 mM	100 µL	1 µM
Insulina 1 mg/mL	1 mL	10 µg/mL

Reactivo	Volumen (para hacer 100 mL)	Concentración final
Indometacina 100 mM	200 µL	200 µM
MEZCLA 500mM	100 µL	500 µM
Penicilina/Estreptomicina	1 mL	100 U/mL penicilina 100 µg/mL estreptomicina
FBS	10 mL	10 %

La Tabla 6 muestra la composición del medio de mantenimiento adipogénico.

Tabla 6:

5

Reactivo	Volumen (para hacer 100 mL)	Concentración final
DMEM (HG)	88 mL	
Insulina 1 mg/mL	1 mL	10 µg/mL
Penicilina/Estreptomicina	1 mL	100 U/mL penicilina 100 µg/mL estreptomicina
FBS	10 mL	10 %

10 Se descongelaron las células usando baño de agua a 37°C y se transfirió rápidamente al medio de cultivo en tubos de 15 mL, lavando el criovial con 1 mL de medio. Se realizó centrifugación a las células por 5 minutos a 400 g. Se realizó aspiración al sobrenadante y se suspendieron las células nuevamente en 5 mL de medio de cultivo completo. Se ejecutó el recuento de células y se recolectaron suficientes células para inocular las células en confluencia (4×10^4 células/pozo) en una placa de 24 pozos con un fondo plano. Se prepararon 4 pozos de prueba y 4 pozos de control. Se inocularon las células en 1 mL de medio de cultivo en cada pozo. Se incubaron las células a 37°C, 5% de CO₂ y después de 48 horas se miraron las células que se habían adherido al plástico y parecían confluyentes. Para probar los pozos, se reemplazó el medio de cultivo completo con 1 mL de medio de inducción adipogénica y se dejó por 3 días. Se reemplazaron los pozos de control con medio de cultivo completo. Después de 3 días en medio de cultivo adipogénico, se reemplazó el medio en los pozos de prueba con 1 mL/pozo de medio de mantenimiento y se dejó por entre 1 y 3 días. Este fue entonces reemplazado con 1 mL/pozo de medio de mantenimiento. Se repitió este proceso tres veces. Después del cambio final de medio a medio de mantenimiento, se dejaron las células en medio por 5 a 7 días antes de recolectarlas.

20 Ejemplo 6 - Ensayo adipogénico

Tinción con Aceite Rojo O

25 Se preparó una solución de trabajo de Aceite Rojo O mezclando 6 partes de solución patrón de Aceite Rojo O con 4 partes de dH₂O. Se dejó en reposo la solución por 10 minutos y se filtró entonces a través de papel de filtro Whatman no.1.

30 Se realizó aspiración al medio y se lavaron las células dos veces en D-PBS. Se fijaron entonces las células en formol al 10% por 1 hora a RT. Se realizó aspiración al formol y se enjuagaron las placas en dH₂O. Se transfirieron con pipeta 500 µL de solución de trabajo de Aceite Rojo O a cada pozo para cubrir la capa de células. Se aplicó rotación a las placas lentamente en movimiento de la figura 8 para esparcir homogéneamente el Aceite Rojo O sobre las células y se dejó por 5 minutos. Se realizó aspiración al pigmento y se removió el exceso de pigmento mediante adición de 2 mL/pozo de isopropanol 60%. Se movieron nuevamente las placas en forma de remolino como el movimiento de la figura 8 y se

realizó aspiración al isopropanol. Se enjuagaron las lacas con agua corriente hasta que el agua rodaba por la placa de manera suave. Se almacenaron entonces las muestras en dH₂O hasta que se tomaron las imágenes.

Extracción de Lípido Teñido.

5 Después de tomar imágenes de las muestras, se realizó aspiración al agua de los pozos. Se realizó en extracción del Aceite Rojo O transfiriendo con pipeta isopropanol (2x 500 µL) sobre la superficie de los pozos varias veces. Se transfirieron entonces el isopropanol y el pigmento a un tubo Eppendorf. Se realizó centrifugación a las muestras por 2 minutos a 500 g a las pellas y residuos en las muestras. Se inocularon en triplicado a una placa de 96 pozos, 200 µL del pigmento extraído para cada muestra. Se midió la tinción usando un lector de placas a 520 nm.

Ejemplo 7 - Diferenciación osteogénica de SSC

La Tabla 7 muestra la composición del medio de diferenciación osteogénica.

15

Tabla 7:

Reactivo	Volumen (para hacer 100 mL)	Concentración final
DMEM (LG)	87.5 mL	
Dexametasona 1 mM	10 µL	100 nM
Ácido ascórbico 2-P 10 mM	1 mL	100 µM
B glicerofosfato	1 mL	10 mM
FBS	10 mL	10 %
Penicilina/Estreptomicina	1 mL	100 U/mL penicilina 100 µg/mL estreptomicina

20 Se descongelaron las células usando un baño de agua a 37°C y se transfirieron rápidamente a medio de cultivo en tubos de 15 mL, lavando el criovial con 1 mL de medio. Se realizó centrifugación a las células por 5 minutos a 400 g. Se realizó aspiración al sobrenadante y se suspendieron nuevamente las células en 5 mL de medio de cultivo completo. Se ejecutó el recuento de las células y se recogieron suficientes células para inocular las células en confluencia (4x10⁴ células/pozo) en una placa con fondo plano de 24 pozos. Se prepararon 4 pozos de prueba y 4 pozos de control. Se inocularon las células en 1 mL de medio de cultivo en cada pozo. Se incubaron las células a 37°C, 5% CO₂ y después de 25 48 horas se miraron las células que se habían adherido al plástico y parecían confluyentes. Se reemplazó el medio en los pozos de prueba con medio osteogénico y el medio en los pozos de control fue reemplazado con medio de cultivo completo. Se cambió dos veces por semana el medio en todos los pozos. Las células fueron recogidas entre los días 10 y 17.

30 Ensayo osteogénico

Se usaron 1 de 4 pozos de prueba y pozos de control para la tinción de Rojo Alizarina. Los otros 3 fueron usados para la determinación cuantitativa de calcio.

35 Tinción con Rojo Alizarina

Se preparó una solución de Rojo Alizarina S 2% disolviendo 2 g de Rojo Alizarina S en 100 mL de dH₂O. Se mezcló la solución y se ajustó el pH a aproximadamente 4.1-4.3 usando hidróxido de amonio 1%, dado que el pH es esencial para el proceso de tinción. Se realizó aspiración al medio de los pozos. Se lavaron dos veces las células en D-PBS para remover el medio remanente para asegurar que no había ocurrido tinción del medio. Se preparó metanol al 95% diluyendo 95 mL de metanol al 100% con 5 mL de agua. Se almacenó entonces el metanol en hielo para bajar la temperatura. Las células fueron fijadas en metanol enfriado con hielo por 10 minutos. Se realizó aspiración al metanol y se enjuagaron las células en dH₂O. Se añadieron a los pozos 500 µL de Rojo Alizarina S al 2% y se dejó por 5 minutos,

40

agitando las placas en forma de remolino ocasionalmente de manera suave con el movimiento de la figura 8. Después de 5 minutos era visible la tinción de calcio. Se enjuagaron las células en dH₂O y se tomaron imágenes usando una Olympus CKx41.

5 Ensayo de calcio

Se preparó HCl 0.5 M mediante dilución de 4.3 mL de HCl 11.6 M en 95.7 mL de agua. Se realizó aspiración del medio de los pozos y se lavaron los pozos dos veces en D-PBS para remover cualquier medio remanente. Se añadieron a cada pozo 0.2 mL de HCl 0.5 M y se rasparon las células de los pozos usando un raspador de células, y se recolectaron en tubos Eppendorf etiquetados. Se dejó agitando la solución durante la noche, sobre el agitador de células en un cuarto frío oscuro. Se realizó centrifugación brevemente a las muestras a residuos celulares de las pellas. Se ejecutó el ensayo de calcio usando un kit Stanbio. Se preparó una solución de trabajo 1:1 de reactivo de unión y pigmento de trabajo.

15 La Tabla 8 muestra la composición de los estándares de ensayo de calcio.

Tabla 8:

Concentración (µg/pozo)	Volumen 10 mg/dl est./pozo
0	0
0,05	0,5 µL
0,10	1 µL
0,2	2 µL
0,4	4 µL
0,6	6 µL
0,8	8 µL
1,0	10 µL

20 Se inocularon en placa por triplicado estándares y muestras en una placa de 96 pozos. Se añadieron a cada pozo de estándar 10 µL de HCl 0.5 M. Se añadieron a cada pozo 10 µL de muestra. Se añadieron 200 µL de solución de trabajo a cada pozo de estándar y de muestra. Se leyó la absorbancia a 550-650 nm usando un Victor3™ 1420.

25 SDC2 presentaron co-tinción con Sca1 sobre la superficie en BMMNC murinas CD45-ve de la cepa C57/Bl6. Además, la clasificación FACS de médula murina de MNC SDC2+/Sca1+ revela que SDC2 marca una sub-población de SSC que se auto renueva que puede formar CFU-F a frecuencias significativamente aumentadas, comparada con MNC clasificadas previamente colocadas en placa.

30 Ejemplo 8 - células SDC2+ de células humanas pluripotentes

Obtuvimos poblaciones de células que expresan SDC2 de células humanas pluripotentes, en este caso células ES (ES-), para comparación con células derivadas de médula ósea (BM-).

35 Se inocularon en placa BM-SSCs y ES-SSCs (células madre mesenquimales humanas Millipore (derivadas de células hES)), a una densidad de 10⁵ células por pozo de una placa de 6 pozos (Nunc) en medio completo (kit de medio completo BM-SSCs: α-MEM, 10% FBS; ES-SSCs: Millipore FibroGRO™ LS) y se dejaron adherir durante la noche. Se recogieron las células cuando ellas alcanzaron niveles de subconfluencia (confluyentes en ~60%), y niveles de confluencia (confluyentes al 100%).

40 Los resultados de análisis citométrico de flujo de marcadores SSC "clásicos" ilustraron que BM-SSCs y ES-SSCs tenían expresión similar de CD73. La expresión del marcador CD105 permaneció igual para ambos cultivos confluyente y sub-

confluyente; la expresión de CD105 pareció descender con el aumento en la confluencia. La expresión de SDC2 por SSCs de BM y ES permaneció consistente con las condiciones confluyente y sub-confluyente de cultivo; el porcentaje de población de BM-SSCs que expresa SDC2 aumenta en cultivos confluyentes y es consistentemente elevada para ES-SSCs tanto en cultivos confluyentes como no-confluyentes. El RFI de expresión SDC2 por ES-SSC es mayor.

5 Por esto, las células madre estromales derivadas de hES de expresaron SDC2 y por ello pueden obtenerse poblaciones de células enriquecidas para SDC2 directamente de células humanas pluripotentes, incluyendo células hES y hiPS.

10 Ejemplo 9 - células de SDC2+ en tratamiento de daño pulmonar inducido por ventilación en ratas, métodos y materiales

Todo el trabajo fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad Nacional de Irlanda, Galway y fue conducido bajo licencia del Departamento de Salud, Irlanda.

15 Aislamiento y cultivo de hSSC

Se aislaron SSCs humanas (hSSCs) de adultos voluntarios como se describió previamente. A continuación de la aspiración, se inoculó en placa la médula ósea en matraces de cultivo celular. Las células que presentaban adherencia crecieron hasta una confluencia de 80% y luego se les añadió tripsina y fueron multiplicadas por cultivo hasta el paso 4, luego de lo cual ellas fueron usadas para los experimentos. Se realizó caracterización de SSCs de acuerdo con lineamientos internacionales. Se obtuvieron fibroblastos, usados como células de control, a partir de una línea celular estable como se describió previamente.

Serie 1 [daño pulmonar inducido por ventilación]

25 • se anestesiaron ratas adultas masculinas Sprague Dawley, se les intubó por vía orotraqueal y se distribuyeron de manera aleatoria para soportar ventilación mecánica dañina.

30 • Se emplearon los siguientes ajustes de ventilador: P_{insp} 35 cm de H_2O , tasa respiratoria 18 min^{-1} , y PEEP 0 cm de H_2O . Cuando el cumplimiento respiratorio estático había descendido en un 50%, se permitió la recuperación de los animales

• A continuación de la recuperación, los animales fueron organizados de manera aleatoria para administración intravenosa de: (i) vehículo (PBS, 300 μL); (ii) fibroblastos (4×10^6 células); (iii) SSCs humanas (4×10^6 células) o (iv) células de la invención, denominadas como S2+SSCs humanas (4×10^6 células); en un diseño de cuatro grupos.

35 • Se evaluaron durante 24 horas la extensión de la recuperación siguiendo ALI y la respuesta inflamatoria.

Serie 2 [ventilación protectora de baja extensión]

40 • se anestesiaron ratas adultas masculinas Sprague Dawley, se les intubó por vía orotraqueal y se distribuyeron de manera aleatoria para ventilación mecánica de baja extensión.

• El protocolo de ' baja extensión ' estaba compuesto de ventilación mecánica por 90 minutos con los siguientes ajustes: FiO_2 de 0.3, tasa respiratoria $80 \cdot \text{min}^{-1}$, volumen corriente $6 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ y presión expiratoria final positiva de 2 cm de H_2O

45 • a continuación de la recuperación, los animales fueron organizados de manera aleatoria para administración intravenosa de: (i) vehículo (PBS, 300 μL); (ii) fibroblastos (4×10^6 células); o (iii) SSCs humanas intratraqueales (4×10^6 células); en un diseño de seis grupos.

50 • Se evaluaron durante 24 horas la extensión de la recuperación siguiendo ALI y la respuesta inflamatoria.

Análisis estadístico

55 Se probó la normalidad en la distribución de todos los datos, usando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía, seguido por prueba de Student-Newman-Keuls, o por prueba de Kruskalis-Wallis seguido por prueba de Mann-Whitney U con la corrección Bonferroni para comparaciones múltiples, según fuera adecuado. Se estimaron como apropiadas las suposiciones subyacentes del modelo, sobre la base de gráficas adecuadas de residuo. Se consideró significativo un valor p de dos colas de <0.05 .

60 *Resultados*

Eficacia de S2⁺SSCs en el aumento de la recuperación de Ventilación Inducida ALI

5 Ingresaron 40 animales al protocolo experimental, destinando 10 a cada uno de los grupos VILI. Cuatro animales VILI, dos destinados a recibir vehículo, y dos destinados a recibir fibroblastos, no sobrevivieron el protocolo de daño. Todos los otros animales sobrevivieron el protocolo del año y la subsiguiente destinación de tratamiento. Ingresaron cada uno de 8 animales a los grupos de control del vehículo y fibroblasto, mientras que cada uno de 10 animales recibieron hSSCs y S2+SSCs.

10 Características de la línea base: no hubo diferencias entre los grupos VILI en la línea base en términos de variables antes del daño, la duración de ventilación dañina o la extensión del daño pulmonar producido (Tabla 9).

Tabla 9: línea base de datos respecto a los animales sometidos a ventilación de alta extensión.

Variable	Ventilación de alta extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2+SSCs
Número de animales	8	8	10	10
Peso animal (g)	400 ± 26	392 ± 51	410 ± 19	417 ± 18
Tiempo de ventilación (minutos)	76 ± 27	76 ± 16	77 ± 19	78 ± 14
Cumplimiento pulmonar antes del daño (ml/mmHg)	0.64 ± 0.09	0.66 ± 0.12	0.67 ± 0.13	0.66 ± 0.11
Cumplimiento pulmonar después de VILI	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03
Nota: los datos están expresados como promedio ± desviación estándar				

15 S2+SSCs restauró la función y estructura pulmonar a continuación de VILI: la terapia con S2⁺SSC aumentó la restauración de la oxigenación arterial, como se evidencia por un reducido gradiente de oxígeno alveolar-arterial comparado con el vehículo (p<0.05). Además, se demostró recuperación funcional en la fisiología pulmonar como respuesta a terapia con S2⁺SSC, por mejoras significativas (p<0.01) en el cumplimiento estático del sistema respiratorio, en comparación con el vehículo.

20 S2+SSCs mejoró la permeabilidad pulmonar microvascular, como se evidencia por un descenso en las relaciones de peso de pulmón húmedo:seco y un descenso en las concentraciones de proteína fluida alveolar (Tabla 10). hSSCs aumentó la recuperación de la estructura pulmonar. S2⁺SSCs hizo descender el aumento en el calibre alveolar, como se evidencia por la reducción en la fracción de volumen de tejido alveolar, e incrementó la recuperación del volumen de espacio de aire, como se evidencia por el incremento en la fracción de volumen aire-espacio alveolar (Tabla 10).

25

Tabla 10: Datos respecto a la extensión de resolución 24 horas después de ventilación de alta extensión.

Variable	Ventilación de alta extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2+SSCs
Tensión arterial O ₂ (FiO ₂ = 0.3; KPa)	13.4 ± 2.8	12.7 ± 2.8	16.9 ± 2.9*	17.0 ± 1.7*
Tensión arterial O ₂ (FiO ₂ = 1.0; KPa)	32.1 ± 13.1	32.8 ± 16.0	65.3 ± 9.4*	56.2 ± 14.4*
Cumplimiento pulmonar estático (ml/mm Hg)	0.37 ± 0.04	0.34 ± 0.08	0.55 ± 0.14*	0.53 ± 0.08*
Relaciones de peso de pulmón húmedo: seco	5.9 ± 0.8	5.4 ± 0.9	4.6 ± 0.2*	4.3 ± 0.7*
Nota: los datos están expresados como promedio ± desviación estándar. Los datos finales son recolectados al completar el protocolo experimental.				
* Grupos de vehículo y fibroblasto significativamente diferentes.				

Inflamación modulada por S2⁺SSCs siguiendo VILI: S2⁺SSCs hizo descender el recuento total de células inflamatorias en fluido BAL (lavado broncoalveolar) y atenuó de manera sustancial (p<0.001) la acumulación de neutrófilos en el pulmón. Tanto S2⁺SSCs como hSSCs no diferenciadas fueron igualmente efectivas en la modulación de la respuesta inflamatoria siguiendo VILI (Tabla 11).

5

Tabla 11: Datos respecto a la respuesta inflamatoria 24 horas después de la ventilación de alta extensión.

Variable	Ventilación de alta extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2+SSCs
Recuento de células en BAL (x 10 ⁶ /ml)	2.91 ± 1.0	3.42 ± 0.86	1.30 ± 0.32*	1.50 ± 0.51*
% de neutrófilos en BAL (%)	44.7 ± 12.2	56.7 ± 3.4	15.8 ± 8.5*	16.0 ± 8.5*
Recuento de neutrófilos en BAL (x 10 ⁶ /ml)	1.31 ± 0.60	1.92 ± 0.44	0.20 ± 0.10*	0.27 ± 0.22*
Recuentos de linfocitos BAL (x 10 ⁹ /ml)	1.57 ± 1.02	0.94 ± 0.44	0.57 ± 0.14†	1.03 ± 0.67

Nota: los datos están expresados como promedio ± desviación estándar. Los datos finales son recolectados al completar el protocolo experimental.

* Grupos de vehículo y fibroblasto significativamente diferentes.

† Significativamente diferente del grupo de vehículo

10 Efecto en los parámetros de 'no daño': no hubo efecto de S2+SSCs o hSSCs no diferenciadas sobre pH arterial, PCO₂, bicarbonato, exceso de base, lactato o presión arterial media (datos no mostrados).

Efecto de S2+SSCs en animales después de ventilación de baja extensión

15 Ingresaron 16 animales al protocolo experimental, con 4 destinados a cada uno de los grupos. Todos los animales sobrevivieron al protocolo de daño y subsiguiente destinación de tratamiento.

20 Características de línea base: no hubo diferencias entre los grupos de ventilación protectora en la línea base en términos de variables anteriores al daño, la duración de la ventilación dañina o la extensión del daño pulmonar producido (datos no mostrados).

S2+SSCs no afectaron la función o estructura pulmonares: no hubo efecto de la terapia de S2+SSC sobre la estructura o función pulmonares después de la ventilación protectora (Tabla 12).

25 Tabla 12: Datos respecto a la extensión de la resolución 24 horas después de ventilación de baja tensión.

Variable	Ventilación de baja extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2+SSCs
Tensión arterial O ₂ (FiO ₂ = 0.3; KPa)	17.6 ± 1.2	17.8 ± 0.8	17.8 ± 0.6	18.5 ± 0.7
Tensión arterial O ₂ (FiO ₂ = 1.0; KPa)	65.8 ± 1.7	69.2 ± 1.7	68.8 ± 3.3	64.3 ± 6.3
Cumplimiento pulmonar estático (ml/mm Hg)	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.64 ± 0.02	0.61 ± 0.04
Relaciones de peso de pulmón húmedo: seco	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.6

Variable	Ventilación de baja extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2 ⁺ SSCs
Nota: los datos están expresados como promedio ± desviación estándar. Los datos finales son recolectados al completar el protocolo experimental.				

S2⁺SSCs no causaron inflamación: no hubo efecto de la terapia de S2⁺SSCs sobre la respuesta inflamatoria en la estructura pulmonar después de la ventilación protectora (Tabla 13).

5 Tabla 13: Datos respecto a la respuesta inflamatoria 24 horas después de la ventilación de baja extensión.

Variable	Ventilación de baja extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2 ⁺ SSCs
Recuento de células en BAL (x 10 ⁶ /ml)	1.24 ± 0.24	1.08 ± 0.13	1.01 ± 0.10	1.14 ± 0.32
% de neutrófilos en BAL (%)	11.3 ± 2.8	9.8 ± 2.1	20.8 ± 4.9	10.3 ± 2.0
Recuento de neutrófilos en BAL (x 10 ⁶ /ml)	0.14 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.11 ± 0.03
Recuentos de linfocitos BAL (x 10 ⁵ /ml)	0.64 ± 0.16	0.65 ± 0.38	0.65 ± 0.52	0.59 ± 0.31
Nota: los datos están expresados como promedio ± desviación estándar. Los datos finales son recolectados al completar el protocolo experimental.				

Efecto sobre los parámetros de 'no daño': no hubo efecto de S2⁺SSCs o hSSCs no diferenciadas sobre pH arterial, PCO₂, bicarbonato, exceso de base, lactato o presión arterial media (Tabla 14).

10 Tabla 14: Datos respecto a los parámetros de 'no daño' 24 horas después de ventilación de baja extensión

Variable	Ventilación de baja extensión			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSCs	S2 ⁺ SSCs
pH arterial	7.40 ± 0.04	7.39 ± 0.03	7.38 ± 0.03	7.40 ± 0.04
PCO ₂ arterial (KPa)	5.4 ± 0.8	5.5 ± 0.2	5.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3
Bicarbonato arterial (mMol/L)	20.5 ± 2.0	22.0 ± 1.5	20.9 ± 1.0	21.7 ± 2.1
Exceso de base	3.4 ± 1.5	3.3 ± 1.7	3.4 ± 2.0	2.8 ± 1.8
Lactato arterial (mMol/L)	3.1 ± 1.4	2.2 ± 0.6	2.1 ± 0.8	2.0 ± 1.2
Presión arterial media (mmHg)	113.2 ± 2.7	101.0 ± 10.7	98.0 ± 13.7	99.5 ± 17.1
Nota: los datos están expresados como promedio ± desviación estándar. Los datos finales son recolectados al completar el protocolo experimental.				

Conclusiones

15 S2⁺SSCs de la invención restauró la función y estructura pulmonares después de VILI, como se evidencia por un reducido gradiente de oxígeno alveolar-arterial, mejoras significativas (p<0.01) en el cumplimiento estático del sistema

5 respiratorio, y mejora en la permeabilidad pulmonar microvascular. También, ellas aumentaron la recuperación de la estructura pulmonar después de VILI. Las células modularon la inflamación después de VILI, redujeron el recuento total de células inflamatorias en el fluido BAL y atenuaron de manera sustancial ($p < 0.001$) la acumulación de neutrófilos en el pulmón. No hubo efecto de la terapia de S2⁺SSC sobre la estructura o función pulmonar, o sobre la respuesta inflamatoria, a continuación de la ventilación protectora. Estos hallazgos sugieren que las células de la invención son bien toleradas en este modelo.

Así, la invención suministra métodos para obtener poblaciones definidas de células madre estromales y usos de ellas.

10

Reivindicaciones

- 5 1. Una población de células madre estromales de mamíferos, en donde 30% o más de las células son positivas para Syndecan-2.
- 10 2. Una población de células de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células son células de ratón, rata, equino o humano.
- 10 3. Una población de células de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las células son células de humano.
- 15 4. Una población de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde 40% o más de las células son positivas para Syndecan-2.
- 15 5. Una población de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde 50% o más de las células son positivas para Syndecan-2.
- 20 6. Una población de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde 75% o más de las células son positivas para Syndecan-2.
- 20 7. Un método para el aislamiento de una célula madre estromal, que incluye el aislamiento de una célula a partir de una población mixta de células de mamíferos basado en la expresión de Syndecan-2.
- 25 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, para el aislamiento de células humanas.
- 25 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, para el aislamiento de células de ratón, rata o equino.
- 30 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la población mixta de células de mamíferos es obtenida a partir de una fuente seleccionada de médula ósea, tejido adiposo, músculo esquelético, endometrio, placenta, sangre del cordón umbilical, cordón umbilical, gel de Wharton y células derivadas de células pluripotentes.
- 35 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, para el aislamiento de células osteogénicas y angiopoyéticas.
- 35 12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para el aislamiento de células estromales, que incluye adicionalmente el paso de derivación de una población de células a partir de aquellas células aisladas.
- 40 13. Un método para la obtención de una población clonal de células, que incluye el aislamiento de una célula individual de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11; y derivación de una población clonal de células a partir de la célula individual.
- 40 14. Un método para la obtención de tejidos, que incluye la obtención de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, y obtención de tejidos de ellas.
- 45 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tejido es hueso.
- 45 16. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tejido es cartílago.
- 50 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tejido es tendón.
- 50 18. Un ensayo que incluye el uso de las células de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 55 19. Una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o desorden en un animal, por ejemplo un humano, que incluye células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 55 20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 19, que incluye solución salina o solución salina tamponada con fosfato, y que incluye opcionalmente también uno o más de dimetilsulfóxido, albúmina de suero humano, ácido hialurónico y colágeno.
- 60 21. Células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso en el tratamiento de una enfermedad o desorden de un animal, por ejemplo un humano.

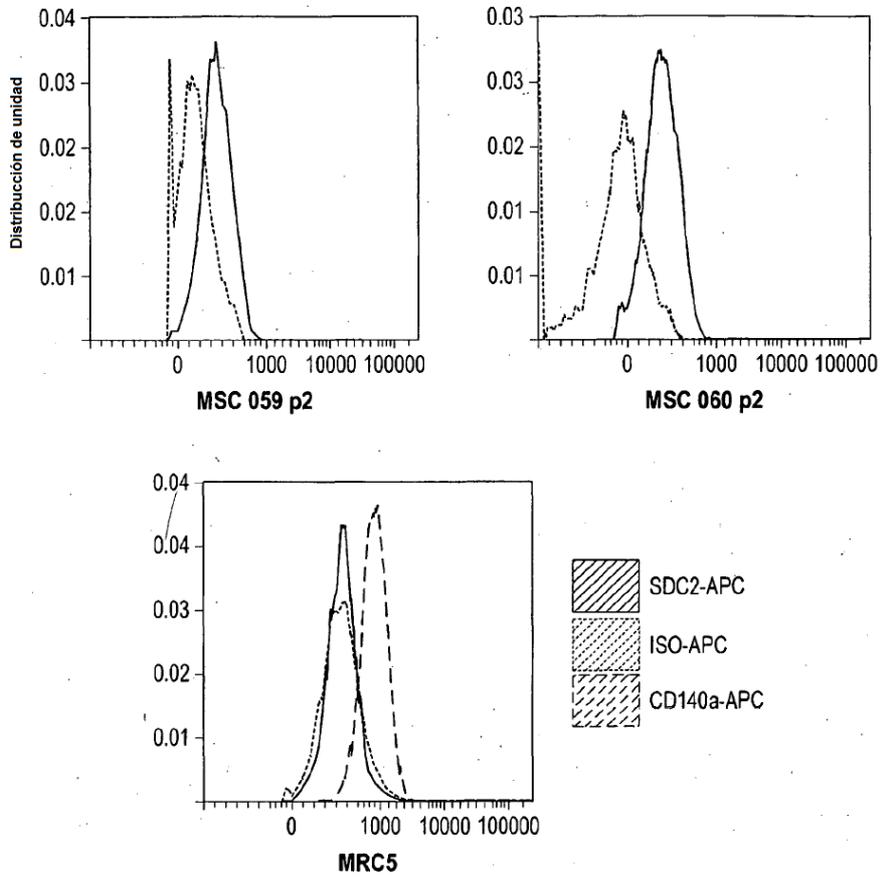


Fig.1

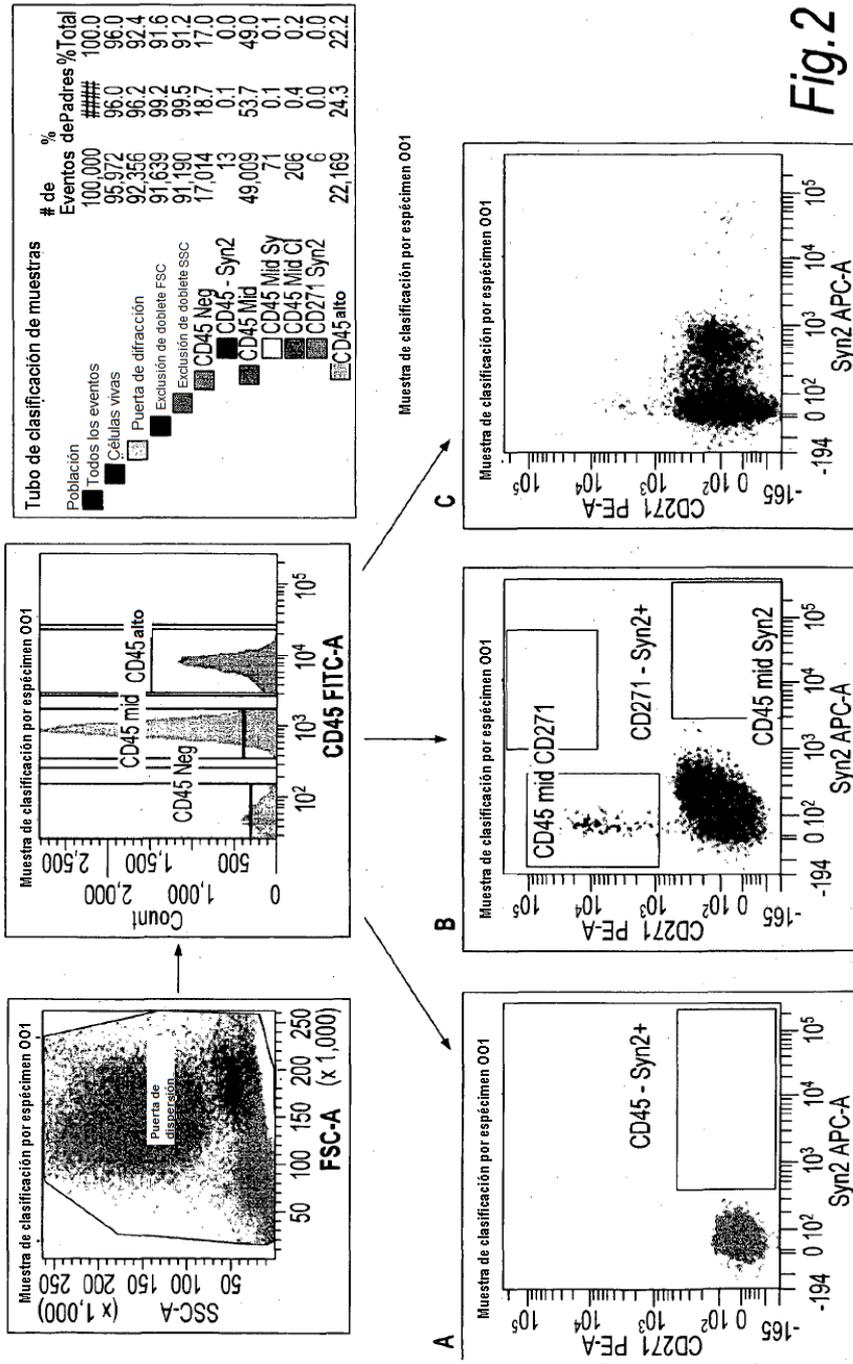


Fig.2

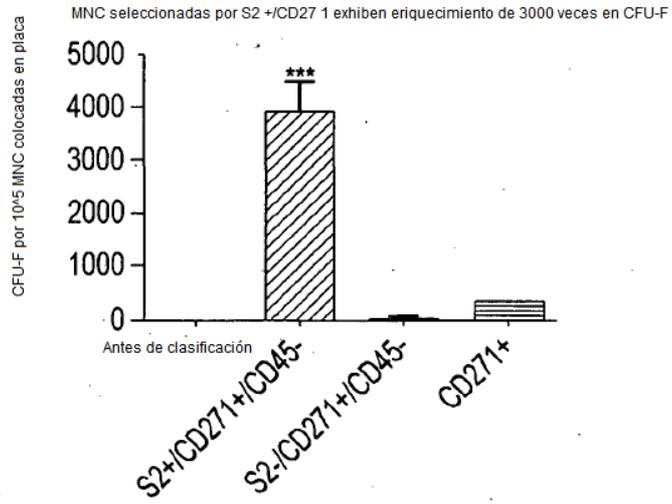


Fig.3

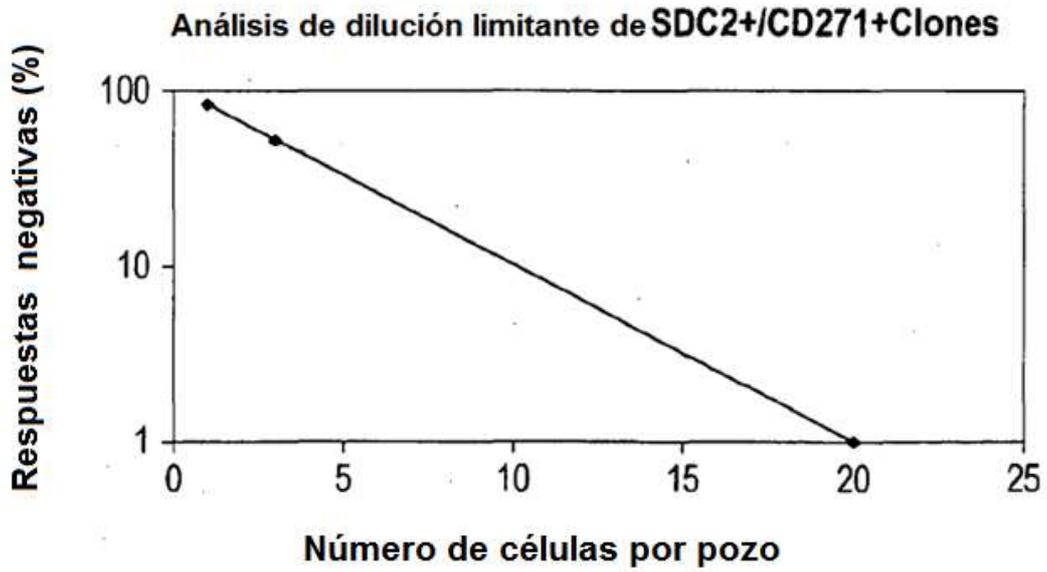


Fig.4

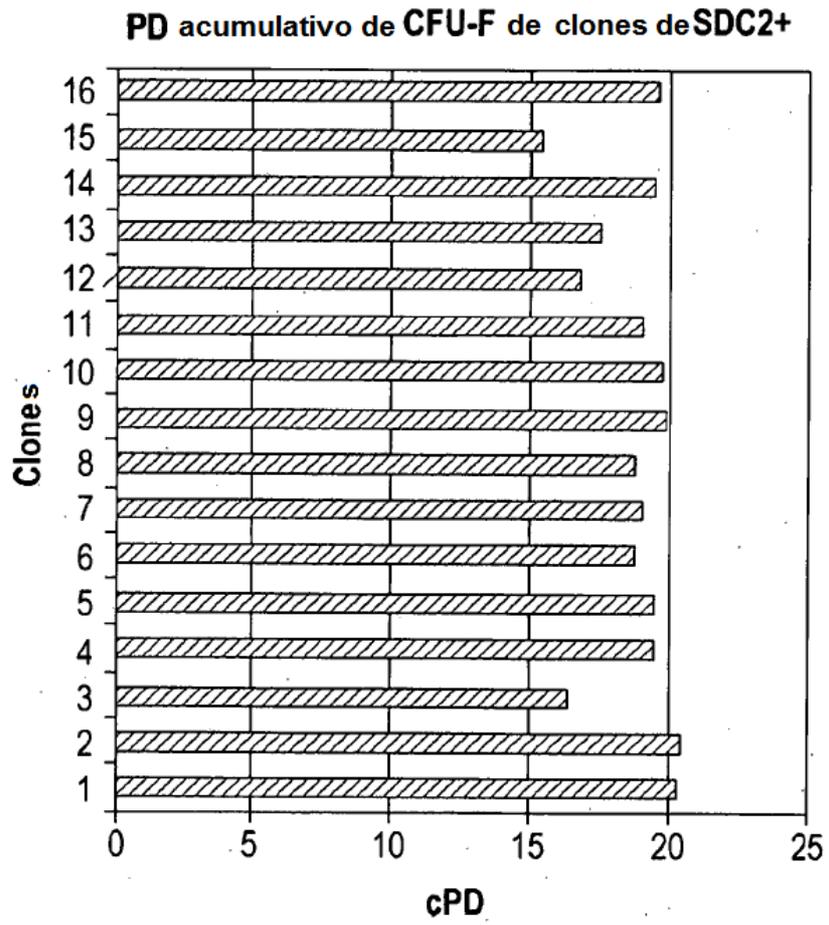
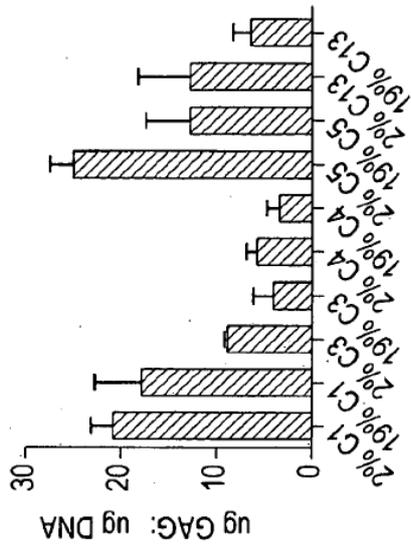


Fig.5

GAG : RELACION DE ADN DE CLONES 087



GAG POR PELLA DE CLONES 087

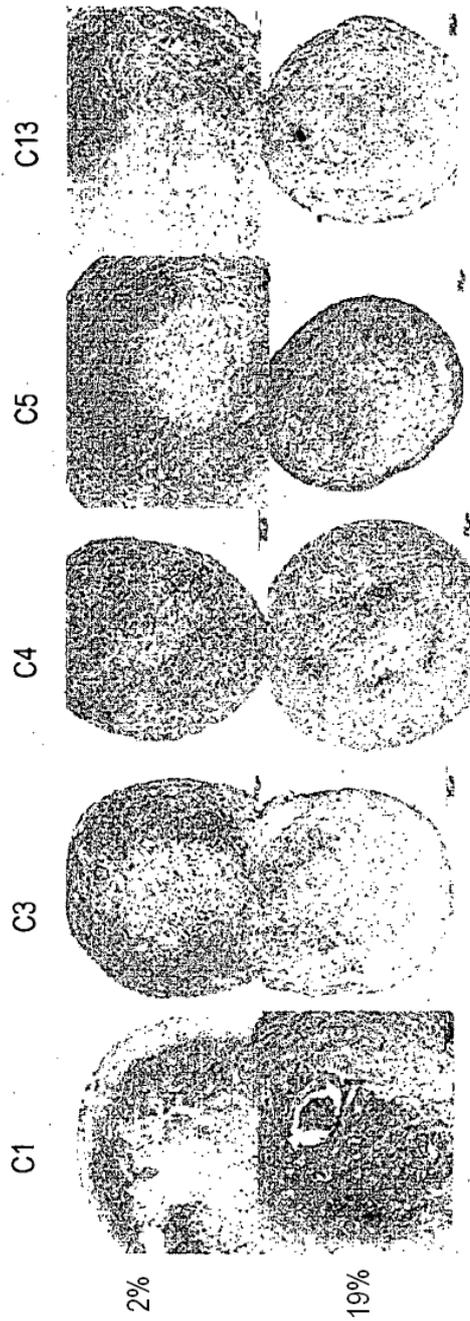
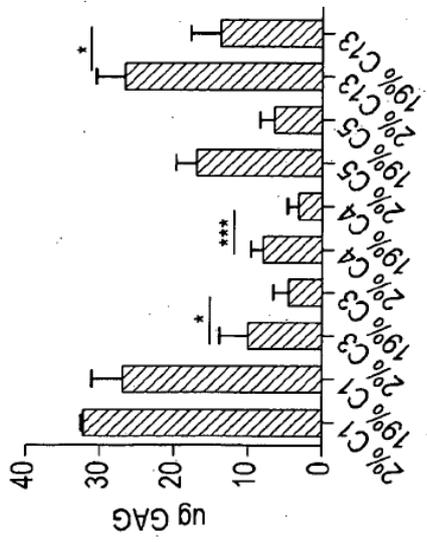


Fig.6

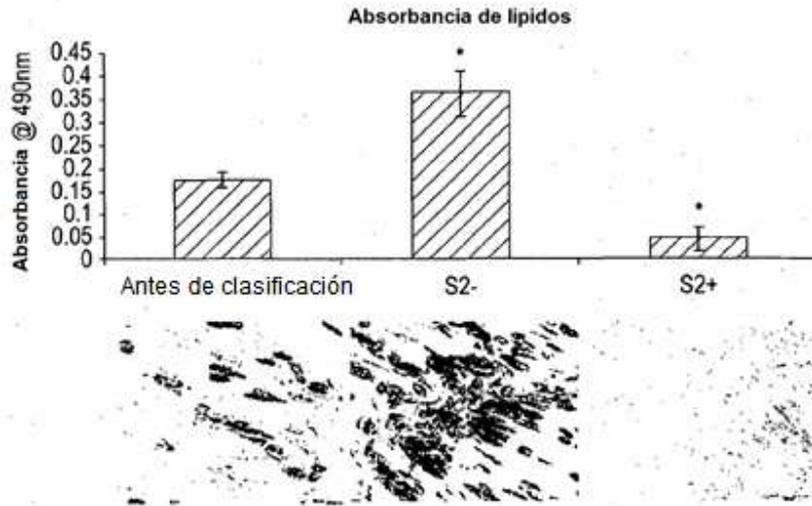


Fig.7

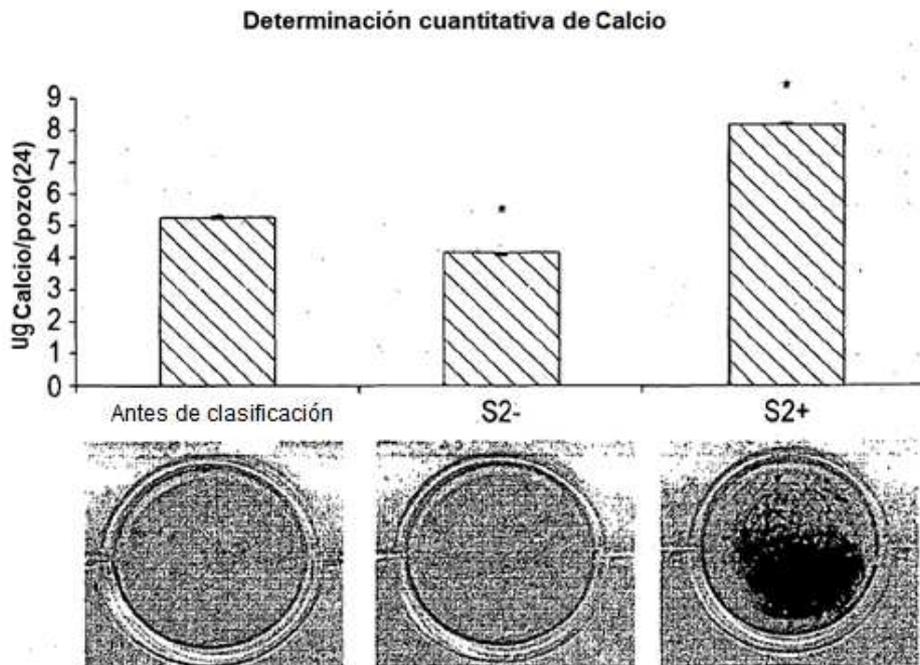


Fig.8

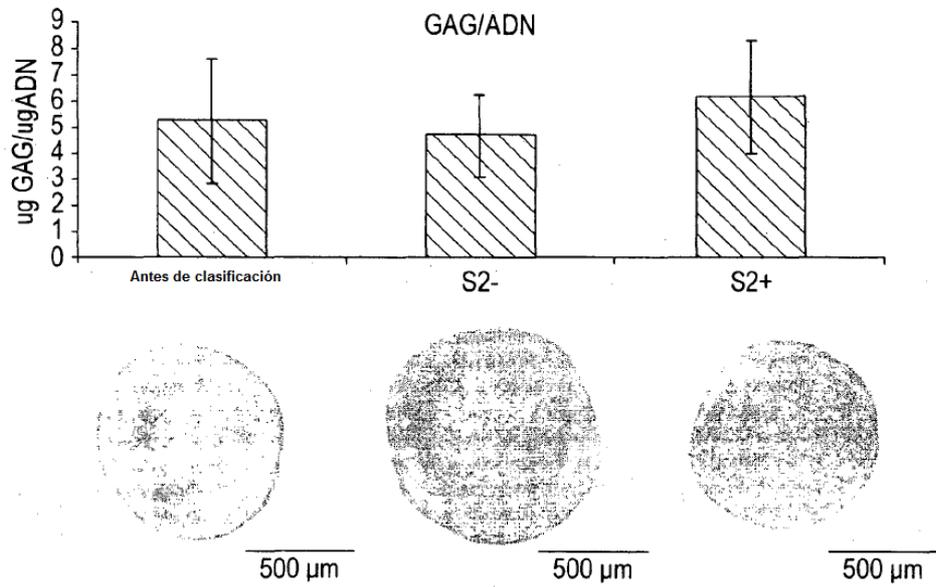


Fig.9

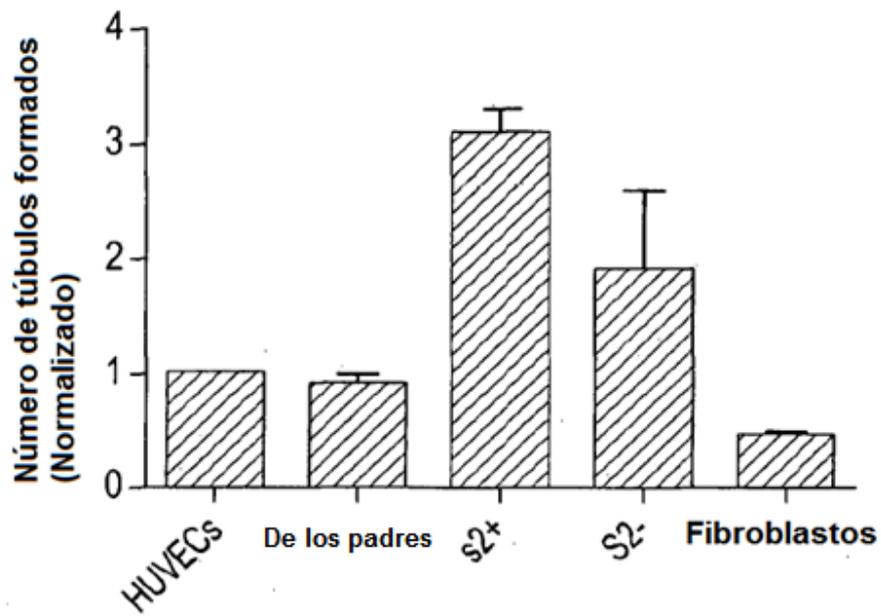


Fig.10

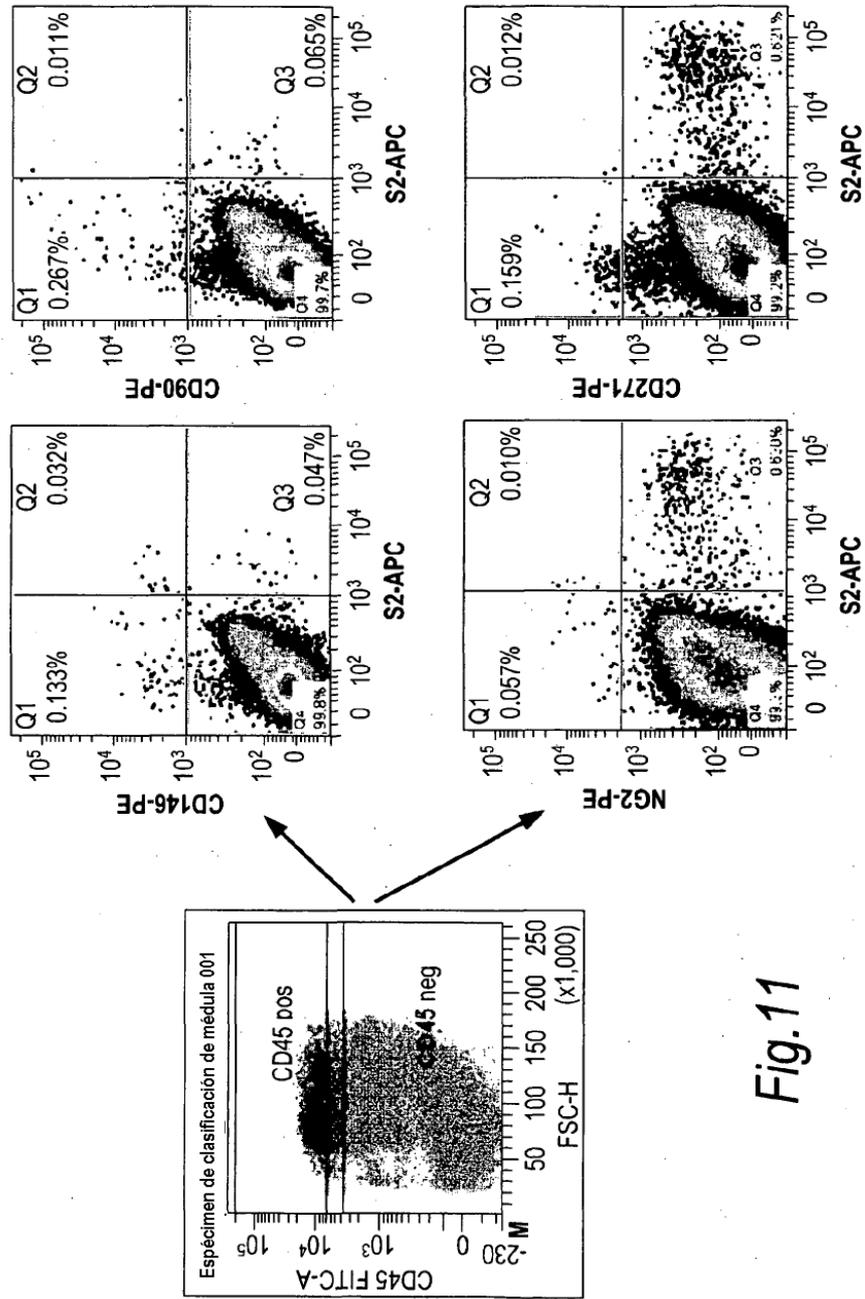


Fig.11

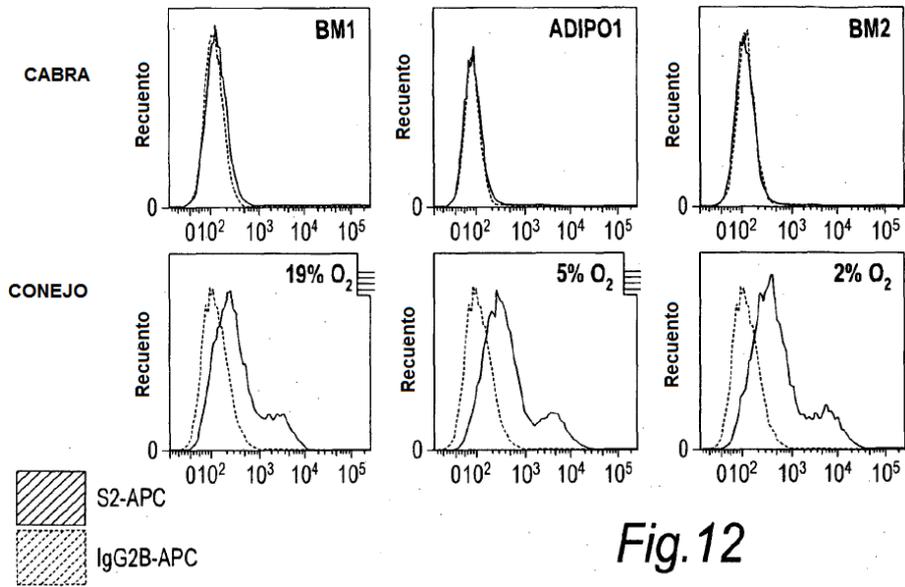


Fig.12

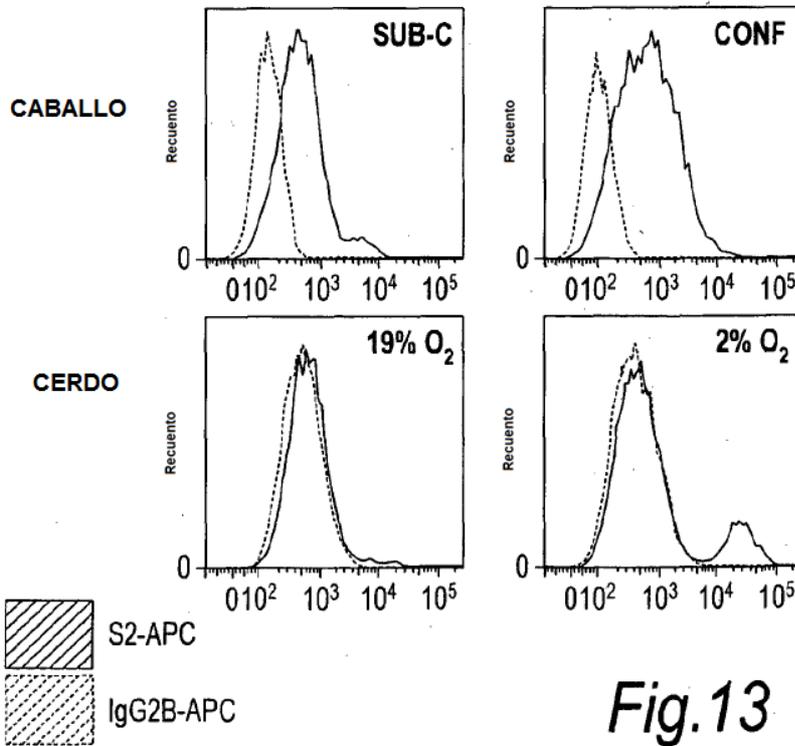


Fig.13

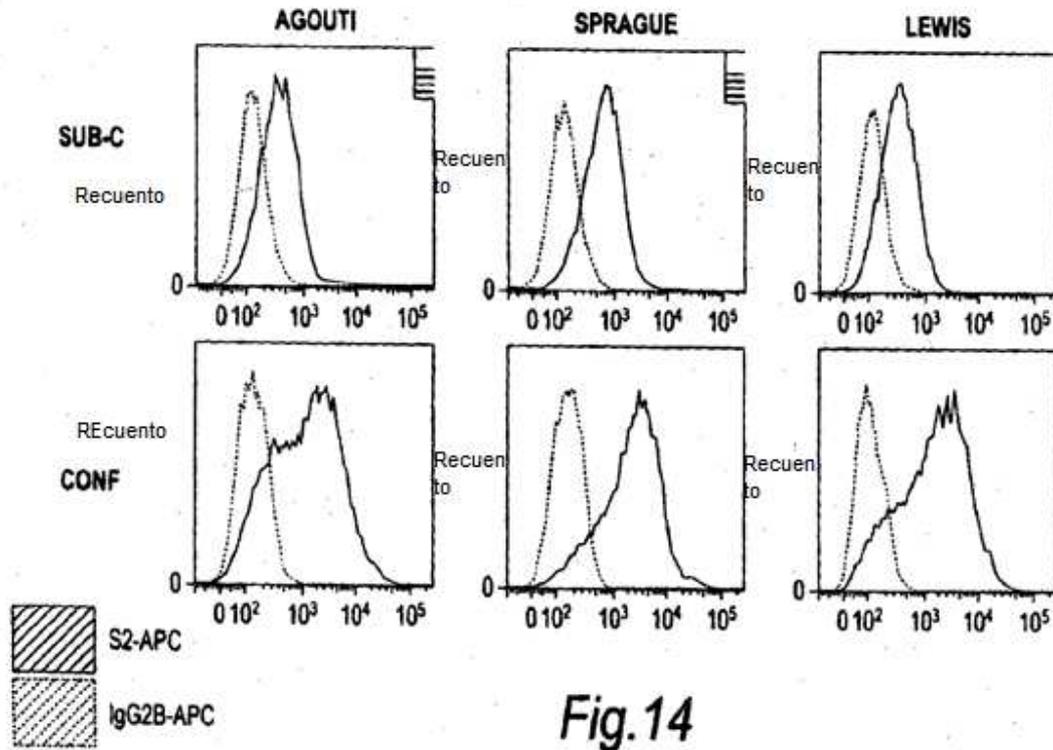


Fig.14

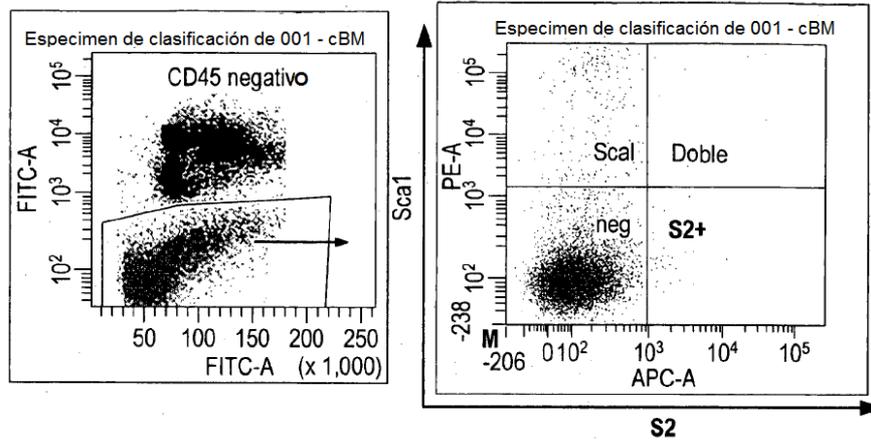


Fig.15

MNC de ratón seleccionadas por S2 exhiben enriquecimiento de 1500 veces en CFU-F

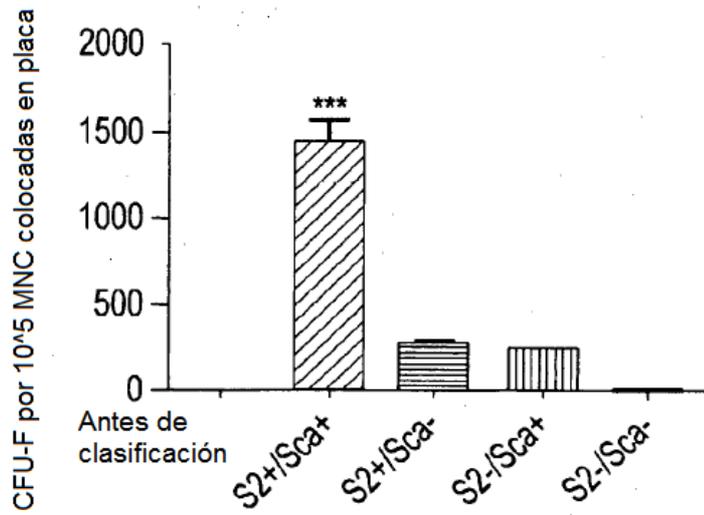


Fig.16