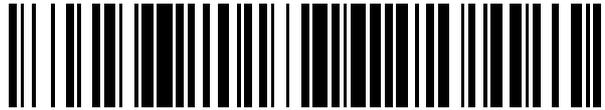


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 905**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 35/54** (2015.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007 E 12170880 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2560002**

54 Título: **Método para aislar y/o identificar células madre mesenquimales (CMM)**

30 Prioridad:

**12.09.2006 DE 102006043625**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BÜHRING, HANS-JÖRG;  
LAMMERS, REINER;  
GRIMM, SABRINA y  
BATTULA, VENKATA LOKESH**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 539 905 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

Método para aislar y/o identificar células madre mesenquimales (CMM)

5 La presente invención se refiere a un uso para aislar y/o identificar anticipadamente células madre mesenquimales homogéneas de tejido primario.

La expresión "células madre mesenquimales" (CMM) no se define uniformemente en la bibliografía. En principio hay dos tipos distintos de células: las CMM que se aíslan directamente de tejido primario no hematopoyético (por ejemplo, médula ósea, tejido adiposo, placenta) y las células que, en cultivos de estas células primarias, se diferencian en células fibroblásticas adherentes y que expresan marcadores de superficie celular, tales como CD73, CD105, CD166, pero que son negativas para el marcador de células madre hematopoyéticas CD34 y el marcador panleucocitario CD45. En general, las células generadas en cultivo se conocen como células madre mesenquimales, ya que después de este proceso poseen en sí mismo una capacidad multipotente para diferenciarse. Sin embargo, justo recientemente la International Society for Cellular Therapy ha revelado una declaración de principios recopilada con el objetivo de estandarizar la nomenclatura de estas células (Horwitz EM *et al.*, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement", *Cytotherapy* 2005; 7; 393-395). En esta publicación, las células de tejido primario que tienen la capacidad de formar colonias de fibroblastos en cultivo (unidades formadoras de colonias de fibroblastos = UFC-F) se describen como células madre mesenquimales (CMM). En cambio, las células adherentes con morfología fibroblastoide que se generan cultivando células de tejido primario se conocen como "células estromales mesenquimales multipotentes". Sin embargo, el acrónimo "CMM" se ha conservado igualmente para estas células.

En este sentido, el documento DE 102 42 338 A1 desvela el aislamiento de células de muestras de médula ósea y su cultivo posterior, diferenciándolas de este modo en células fibroblásticas adherentes. Estas células representan células estromales mesenquimales multipotentes.

Debido a su multipotencia, es decir, a su capacidad de diferenciarse, en condiciones adecuadas *in vitro* e *in vivo*, en diferentes tejidos mesenquimales (tales como hueso, grasa, músculo, cartilago, etc.), las células madre mesenquimales ya se están usando terapéuticamente. Por tanto, las CMM aisladas, por ejemplo, de sangre de cordón umbilical, de médula ósea y de tejido adiposo, que son capaces de diferenciación, puede expandirse *in vitro* y diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y miocitos, y después usarse de nuevo *in vivo*, por ejemplo, para la regeneración de huesos, cartílagos, tendones y tejido adiposo, así como estroma.

Además de la capacidad de adherirse rápidamente y con estabilidad a superficies de plástico o vidrio, los fenotipos de CMM (células estromales mesenquimales multipotentes) se caracterizan por su morfología fibroblastoide y por su expresión (por ejemplo, de CD73, CD90, CD105, CD166) y/o por carecer de expresión (de CD34, CD45). Muchas de las moléculas de superficie expresadas sobre CMM también pueden encontrarse en células endoteliales y epiteliales y en células musculares. Sin embargo, por otro lado, las CMM se diferencian claramente de las células madre hematopoyéticas ya que no expresan ninguno de los marcadores hematopoyéticos específicos, tal como, por ejemplo, CD45.

Se sabe, de la técnica anterior, que las células madre mesenquimales pueden aislarse de médula ósea usando anticuerpos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (= CD271) (Quirici *et al.*, "Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies". *Exp. Hematol.*, 2002, 30(7): 783-791). Además, se ha descrito cómo las CMM pueden aislarse usando anticuerpos contra SH2 (CD105), SH3 (CD73) y SH4 (CD73) (véase Barry F. *et al.* "The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells", *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289: 519-24 y Pittenger MF. *et al.*, "Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *Science.* 1999; 284: 143-7). Sin embargo, la desventaja de los presentes marcadores es que no son específicos para CMM pero reconocen otras poblaciones celulares en médula ósea.

Por otra parte, Vogel *et al.* (Vogel W. *et al.*, "Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells", *Haematologica*, 2003, 88: 126-133) describen el antígeno definido por el anticuerpo W8D2 como un nuevo marcador que se expresa muy heterogéneamente en CMM cultivadas.

El marcador de superficie celular CD271 ha sido hasta ahora el marcador de superficie celular más específico disponible en el comercio para el aislamiento de células madre mesenquimales. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales para este marcador se comercializan, por ejemplo, por las compañías BD PharMingen, San Diego, Estados Unidos y Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que este marcador no es selectivo para las CMM sino que también se expresa en otras células hematopoyéticas DC45 positivas. Como resultado, en un método de aislamiento con anticuerpos anti-CD271, no solo se aíslan células madre mesenquimales sino también hematopoyéticas.

En el contexto de las desventajas reconocidas de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevas posibilidades para aislar, en la medida que sea posible, células madre mesenquimales (CMM) puras de tejidos primarios.

5 Como se reivindica en la presente invención, este objeto se consigue mediante un anticuerpo, o fragmentos funcionales del mismo, mediante el cual el anticuerpo es el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), con el número DSM ACC 2813 (W5C5).

10 Además, el objeto se consigue mediante un método para identificar y/o aislar células madre mesenquimales homogéneas que implica las siguientes etapas:

15 a) poner en contacto una muestra de células en suspensión de tejido primario que contiene células madre mesenquimales, con al menos un anticuerpo, o con un fragmento del mismo, mediante lo cual el anticuerpo es el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), con el número DSM ACC 2813 (W5C5).

20 b) identificar y/o aislar en la muestra las células que en la etapa a) se han unido a los anticuerpos.

Además, la invención también se refiere a anticuerpos que se usan para este aislamiento/identificación de células madre mesenquimales, y que se generan a partir de la línea celular de hibridoma conocida como W5C5, que se ha depositado en el German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) de acuerdo con el Tratado de Budapest.

25 De esta manera, el objeto de la invención queda completamente satisfecho.

Los inventores sabían que con los anticuerpos mencionados es posible aislar subpoblaciones de CMM homogéneas ultra-puras, por ejemplo, directamente de médula ósea, y por consiguiente directamente de tejido primario. Por tanto, por ejemplo, un subconjunto de células CD271 positivas, que contenía exclusivamente CMM, fue capaz de identificarse por análisis de fluorescencia doble de un conjunto de células CD271 positivas mediante los anticuerpos como se reivindica en la invención. Únicamente la fracción positiva de anticuerpos contenía células madre mesenquimales clonogénicas, es decir, tenía la capacidad de formar UFC-F.

35 Como se ha mencionado anteriormente, previamente no fue posible aislar células madre mesenquimales ultra-puras de tejidos primarios. Como se ha mencionado anteriormente, en la técnica anterior, sólo se sabía cómo aislar e identificar células CMM cultivando células del tejido primario, es decir, células adherentes con morfología fibroblastoide que expresan los marcadores de superficie tales como CD73, CD105, CD166 y que se describen como células estromales mesenquimales multipotentes.

40 Con los anticuerpos mencionados, se dispone de nuevas herramientas para identificar CMM, ya que estos anticuerpos son específicos para antígenos que reconocen los dominios extracelulares, unidos a células, de las proteínas de la membrana plasmática que se expresan muy selectivamente en CMM. Dichos anticuerpos son por lo tanto apropiados para el direccionamiento, es decir, las células vivas pueden aislarse y posteriormente cultivarse, o las células (tumorales) pueden eliminarse.

Estos resultados fueron absolutamente sorprendentes ya que, hasta ahora, no podían producirse células madre mesenquimales con tan alto grado de pureza. Con los nuevos anticuerpos, puede por tanto prepararse una población de CMM extremadamente pura que puede usarse, por ejemplo, para terapia génica y celular.

50 Por lo tanto, con el nuevo método para usar los anticuerpos, es posible mejorar claramente las técnicas reconocidas de la técnica anterior para el aislamiento/identificación de células madre mesenquimales, ya que solo es posible obtener subpoblaciones de CMM ultra-puras y homogéneas con el método como se reivindica en la invención y con los nuevos anticuerpos como se reivindica en la invención usados en su interior.

55 En el contexto de la presente invención, en lugar del anticuerpo respectivo reivindicado, también puede usarse un fragmento del anticuerpo que tenga las mismas características de marcaje que las del anticuerpo completo, sin que se ponga de manifiesto expresamente en cada caso. "Fragmento funcional" significa en este caso cualquier fragmento de un anticuerpo que contenga la función de unión al antígeno del anticuerpo. Dichos fragmentos son, por ejemplo,  $F_{ab}$ ,  $F_{(ab)_2}$ ,  $F_v$  y otros fragmentos tales como los fragmentos CDR. Los fragmentos mencionados tienen la especificidad de unión del anticuerpo y también pueden producirse, por ejemplo, con métodos conocidos.

60 Además, existe la posibilidad, de usar anticuerpos humanizados derivados de los anticuerpos mencionados. Como la parte constante de los anticuerpos en anticuerpos de ratón puros, es murina, si dichos anticuerpos fueran a usarse, por ejemplo, en seres humanos, conducirían a reacciones que implicarían el rechazo por el sistema inmunitario. Además de especificidad por antígenos humanos que residen en la región variable, los anticuerpos

5 monoclonales de ratón que se han generado contra un antígeno humano contienen dominios antigénicos de ratón, que puede rechazar el sistema inmunitario humano como exógeno. Las partes murinas de las secciones constantes pueden por tanto eliminarse por métodos usados en biología molecular y sustituirse por partes estructuralmente constantes de anticuerpos humanos. Las secciones constantes de anticuerpos no están implicadas en la unión específica del anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal creado de este modo se denomina "anticuerpo monoclonal humanizado" y ya no lo rechaza el sistema inmunitario humano. Los anticuerpos humanizados se producen, por ejemplo, en un cultivo de células de ovario de hámster. (En lo concerniente a la generación de anticuerpos humanizados véase, por ejemplo, Sharon *et al.*, Nature 309: 364 - 367, 1984). Por consiguiente estará claro ahora para el especialista que los anticuerpos de ratón, descritos por primera vez en el presente documento, pueden modificarse por métodos de biología molecular pertinentes para su uso en seres humanos, incluso, por ejemplo, para cambiar las regiones constantes de los anticuerpos de ratón, por regiones constantes humanas.

15 Debe entenderse que los anticuerpos como se reivindica en la invención también pueden marcarse/conjugarse diversamente, dependiendo del uso o uso deseado en relación con el método de detección, por ejemplo, con reactivos químicos. Estos tipos de modificación de anticuerpos están dentro del campo de acción y habilidad del especialista en la técnica.

20 El anticuerpo reivindicado W5C5 lo produce la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), con el número DSM ACC 2813 (W5C5).

25 El anticuerpo, publicado por primera vez en el presente documento, y la línea celular de hibridoma que lo produce, tienen la característica ventajosa de ser adecuados para el aislamiento/identificación de células madre mesenquimales ultra-puras a partir de tejido primario.

Por otra parte, en otras realizaciones, se usa un anticuerpo que se une al mismo antígeno o epítipo que un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma W5C5.

30 Con los anticuerpos preparados por los inventores, es posible caracterizar e identificar exactamente los antígenos respectivos en las CMM, lo que a su vez hace posible generar selectivamente anticuerpos contra los antígenos así determinados. Después estos pueden usarse en el método como se reivindica en la invención para aislar las CMM.

35 En una realización adicional de la invención, el tejido primario se selecciona del grupo que incluye médula ósea, tejido adiposo y placenta. Se sabe bien que esos tejidos contienen células madre mesenquimales. Estas células, o la muestra que contiene las células, se obtienen como se reivindica en los métodos de laboratorio y en las técnicas de extracción conocidos en la técnica anterior.

40 En el método como se reivindica en la invención, la puesta en contacto de una muestra de células en suspensión que incluye células mesenquimales, puede realizarse en solución, como ocurre, por ejemplo, cuando se usa una separación de células activada por fluorescencia (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorter*).

45 En citometría de flujo, las células marcadas con anticuerpos conjugados con fluorocromos se analizan y se separan individualmente. Por lo tanto, de este modo puede establecerse que una fracción de una población de células sea positiva para un marcador determinado.

También puede usarse un método para la separación de células por campo magnético (MACS: separación de células activada por campo magnético). En este método las células se separan usando anticuerpos a los que se acoplan perlas magnéticas.

50 Las células madre mesenquimales identificadas/aisladas de esta manera pueden después usarse, por ejemplo, para un trasplante para conseguir la regeneración, por ejemplo, de hueso, cartílago, etc, dañado.

55 También es posible el uso de anticuerpos, o de sus derivados humanizados, para revestir implantes médicos o dispositivos médicos como estents y el uso de dichos implantes o dispositivos tratados para el tratamiento de tejido cartilago o hueso enfermo o defectuoso o dañado.

60 En una realización adicional preferida del método como se reivindica en la invención la muestra que incluye células madre mesenquimales heterogéneas se pone en contacto con un anticuerpo que se genera de la línea celular de hibridoma W5C5, y con un anticuerpo anti-CD271; posteriormente, dichas células en la muestra que se han unido a ambos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden después aislarse o identificarse. El anticuerpo anti-CD271 y los anticuerpos como se reivindican en la invención muestran preferentemente un marcaje de color/fluorescencia distinto. En el método como se reivindica en la invención, el anticuerpo anti-CD271 y al menos uno de los nuevos anticuerpos como se reivindica en la invención se usan en el presente documento de manera simultánea o sucesiva.

65 Los anticuerpos anti-CD271 se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo, de Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, o RayBiotech Inc., Norcross, Estados Unidos.

La invención también concierne a la línea celular de hibridoma que tiene la capacidad de generar y liberar este anticuerpo, es decir, la línea celular de hibridoma W5C5, que se ha depositado oficialmente en la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, de acuerdo con el Tratado de Budapest.

5 Por primera vez, los inventores han producido anticuerpos monoclonales con los nuevos anticuerpos así como con líneas celulares de hibridoma, generando y liberando estos que permiten el reconocimiento selectivo de células madre mesenquimales. Consecuentemente los anticuerpos representan un medio hasta ahora inaudito para el médico e investigador para detectar en primer lugar estos tipos de células y en segundo lugar para manipular estas  
10 células, según sea necesario, mediante los propios anticuerpos o mediante reactivos acoplados a los mismos. El anticuerpo W5C5 se obtuvo por inmunización con la línea celular de retinoblastoma WERI-RB-1. Además, los anticuerpos HEK-3D6 y F9-3C2F1 se obtuvieron por inmunización con la línea celular de riñón embrionario HEK. El anticuerpo 58B1 se obtuvo por inmunización con la línea celular hematopoyética UT--7. Los anticuerpos 24D2 y 28D4 se obtuvieron por inmunización con células NIH-3T3 que se transfectaron con HER-2 o beta receptor de PDGF  
15 humano. El anticuerpo 9A3G2 se obtuvo por inmunización con la línea celular de carcinoma de mama DU.4475.

La invención también concierne a una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo como se reivindica en la invención, o fragmentos funcionales del mismo o derivados humanizados del mismo.

20 Dicha composición farmacéutica puede contener, además de uno o más anticuerpos, otras sustancias apropiadas, por ejemplo, diluyentes, disolventes, estabilizantes, etc. Entre estas se incluyen, por ejemplo, soluciones salinas fisiológicas, agua, alcoholes y otras sustancias adecuadas que se encuentran, por ejemplo, en A. Kibbe, "Hand-book of Pharmaceutical Excipients", 3ª ed. 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. La composición farmacéutica es adecuada para el tratamiento de enfermedades o daños que requieren, o que pueden  
25 tratarse con, la unión de los anticuerpos a células madre mesenquimales.

La invención también concierne a un kit que contiene al menos el nuevo anticuerpo, y un kit que, además del nuevo anticuerpo como se reivindica en la invención, tiene un anticuerpo anti-CD271.

30 La invención también concierne al uso de células madre mesenquimales homogéneas, obtenidas siguiendo el método como se reivindica en la invención, como un medicamento, es decir, para producir un producto medicinal para terapia génica o celular.

35 Las células madre mesenquimales homogéneas obtenidas como se reivindica en el método como se reivindica en la invención pueden usarse como ventaja en terapias celulares. En este caso las células deben reemplazar un tejido, o células, defectuosos o deteriorados de un paciente, por ejemplo, tejido óseo o cartilaginoso dañado. Después de introducirse, y si fuera necesario, de la administración de otros factores de diferenciación, las células madre mesenquimales se diferencian *in vivo* en los tipos de células que van a reemplazar. Siguiendo el método como se  
40 reivindica en la invención, las células madre mesenquimales aisladas pueden implantarse/administrarse directamente o aplicarse a implantes apropiados, donde mediante la adición de los factores relevantes también se diferencian antes del implante en las células deseadas.

De esta manera, ventajosamente, el tejido óseo y cartilaginoso que, por ejemplo, se ha deteriorado, puede regenerarse.

45 La invención también concierne al uso de células madre mesenquimales homogéneas, obtenidas siguiendo el método como se reivindica en la invención para la producción de osteoblastos, condrocitos, adipocitos o fibroblastos *in vitro*.

50 En este uso, las células madre mesenquimales, obtenidas siguiendo el método como se reivindica la invención, se diferencian en el tipo de células deseado antes de introducirse en un paciente.

Por consiguiente, las células madre mesenquimales aisladas pueden aislarse del paciente que va a tratarse o de otro donante.

55 En las figuras adjuntas y en la descripción se encuentran ventajas adicionales.

60 Debe entenderse que las características mencionadas anteriormente, y las que aún deben evocarse, pueden usarse no solo en la combinación respectiva indicada sino también en solitario o en otras combinaciones, sin que esto quede fuera del alcance de la presente invención.

En los dibujos adjuntos se presentan ejemplos de realizaciones y se analizan más meticulosamente en la descripción. Las figuras muestran lo siguiente:

65 Figura 1 Análisis FACS de células de médula ósea que se han marcado con CD271-APC (Miltenyi Biotech, Alemania) y con los anticuerpos generados por las líneas celulares de hibridoma 28D4, W8B2, W1C3,

W7C6, 24D2, HEK-3D6, W5C5, 39D5, (Fig. 1a) y 9A3G2 (indicada como "9A3G2"), 58B1, F9-3C2 (indicada como "F9-3C2F1"), W3D5, W4A5 o W5C4 (Fig. 1b) (marcaje indirecto con ficoeritrina anti-ratón). Únicamente la fracción positiva de anticuerpo (simultáneamente positiva para CD271) contiene CMM con la capacidad de formar UFC-F;

5  
Figura 2 Gráfico de barras que muestra la actividad de UFC-F de células de médula ósea CD271+W8B2±, CD271+CD140b±, CD271+HEK3D6± (Fig. 2a) y CD271+CD56 ± (Fig. 2b) separadas;

10  
Figura 3 preparación de citospina de CMM CD271+W8B2+ separadas de médula ósea. Después de la preparación las células se tiñeron con solución May-Grünwald-Giemsa;

Figura 4a Imágenes al microscopio de células de médula ósea CD271-positivas y W8B2-positivas/negativas; y

15  
Figura 4b Imágenes al microscopio de células de médula ósea CD271-positivas y CD140b- positivas/negativas.

### Ejemplo

#### Materiales y métodos

20 Se obtuvieron células mononucleares de médula ósea (CMN-MO) del eje femoral de pacientes que recibieron implantes de cadera. Se recogieron aprox. 25 ml de células de médula ósea y se mezclaron con 5000 U de heparina (Sigma-Aldrich). Las células mononucleares se recuperaron por fraccionamiento en gradiente de densidad Ficoll Histopac (750 x g, 20 min. a temperatura ambiente) y los eritrocitos restantes se lisaron en solución de cloruro de amonio durante 10 min a 4 °C.

25  
30 Para los análisis fluorométricos se usaron anticuerpos monoclonales o conjugados de anticuerpos que se producían de las siguientes líneas celulares de hibridoma: W8B2, W1C3, W7C6, W5C4, 24D2, 28D4, HEK-3D6, W4A5, W3D5, W5C5, 9A3G2, 58B1, F9-3C2F1, 39D5. La línea celular de hibridoma 24D2 produce anticuerpos dirigidos contra HER-2 (CD340), la línea celular de hibridoma 28D4 produce anticuerpos dirigidos contra CD140b y la línea celular de hibridoma 39D5 produce anticuerpos dirigidos contra CD56. Las líneas celulares de hibridoma W1C3, W3D5 (denominada también W3D5A9), W4A5, W5C4 (denominada también W5C4W5), W5C5, W7C6 y W8B2 (denominada también W8B2B10) que producen anticuerpos se obtuvieron por inmunización con la línea celular retinoblastoide WERI-RB-1. Las líneas celulares de hibridoma HEK-3D6 y F9-3C2F1 (denominada también F9-3C2) se obtuvieron por inmunización con la línea celular renal embrionaria HEK. La línea celular de hibridoma 58B1 (denominada también 58B1A2) se obtuvo por inmunización con la línea celular hematopoyética UT-7. Las líneas celulares de hibridoma 24D2 y 28D4 se obtuvieron por inmunización con células NIH-3T3 que se transfectaron con HER-2 o beta receptor de PDGF humano. La línea celular de hibridoma 9A3G2 se obtuvo por inmunización con la línea celular de carcinoma de mama DU.4475.

40 Se usó otro anticuerpo con especificidad conocida, CD271-(LNGFR)-APC, obtenible como un conjugado APC en el kit con MicroPerlas anti-APC de Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania.

45 Para caracterizar y aislar CMM, primero se incubaron células de médula ósea con los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma W8B2, W1C3, W7C6, W5C4, 24D2, 28D4, HEK-3D6, W4A5, W3D5, W5C5, 9A3G2, 58B1, F9-3C2F1 y 39D5 y posteriormente se marcaron con un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con FE (ficoeritrina). Después, las células se incubaron con un exceso de IgG de ratón (para saturar valencias libres) y finalmente se tiñeron con colorante de contraste con un conjugado de CD271-APC. Después de teñir las células se analizaron por FACS o se fraccionaron.

50 Después de teñir, las células se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson) y se evaluaron. La Fig. 1 muestra las representaciones gráficas respectivas (CD271-APC frente a anticuerpo de ensayo conjugado con FE). Las células positivas a anticuerpo se aislaron después y se determinó la capacidad para formar UFC-F. Como puede observarse de las representaciones gráficas en la Fig. 1, pudieron aislarse y/o identificarse subpoblaciones de las células madre mesenquimales CD271-positivas que también fueron positivas para el anticuerpo particular usado. A partir de estas subpoblaciones pudo mostrarse en ensayos posteriores que la actividad de UFC-F clonogénica se encontraba cada vez en la fracción positiva de anticuerpo, mientras que la fracción negativa de anticuerpo, CD271 positiva era negativa o solamente contenía algunas UFC-F.

60 Para realizar este ensayo las células aisladas en las etapas previas se cultivaron en matraces T-25 en condiciones de suero+gelatina-, suero+gelatina+, suero-gelatina- o suero-gelatina+. Después de 14 días de cultivo las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol (5 min. a temperatura ambiente) y posteriormente se secaron al aire. Para visualizar las CMM UFC-F y contarlas, las células se tiñeron con Giemsa (solución Giemsa 1:20 diluida con agua desionizada; 5 min. a temperatura ambiente), se lavaron dos veces con agua desionizada y se secaron al aire. Las colonias UFC-F tenían típicamente un diámetro entre 1 y 8 mm y se evaluaron macroscópicamente.

65

Además también existía la posibilidad de diferenciar las células de una manera alternativa, por ejemplo en adipocitos, condrocitos u osteoblastos. En este caso se dio prioridad a las instrucciones relevantes del fabricante (por ejemplo, Miltenyi Biotec). Para diferenciar las CMM en células adipocitarias y osteoblásticas, las células se cultivaron en presencia de medio AdipoDiff NK o medio OsteoDiff NK (ambos de Miltenyi Biotect) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, las CMM ( $12 \times 10^4$  células para la adipogénesis;  $4,5 \times 10^4$  células para la osteogénesis) se resuspendieron en 1,5 ml del medio apropiado y se transfirieron a placas de 6 pocillos (Falcon, Heidelberg, Alemania). El medio se renovó cada tres días. La formación de adipocitos se evaluó el día 18 del cultivo fijando las células con metanol durante 5 min. a  $-20^\circ\text{C}$  y tiñendo posteriormente los lípidos intracelulares con tinción de Aceite Rojo O (Sigma-Aldrich) durante 30 min. a temperatura ambiente. La formación de células osteogénicas se analizó el día 10 del cultivo tiñendo la actividad fosfatasa alcalina de las células fijadas con metanol ( $-20^\circ\text{C}$ , 5 min.) con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul de tetrazolio (sustrato FAST™ BCPI/NBT; Sigma Aldrich) durante 10 min. a temperatura ambiente.

La Fig. 2 muestra los resultados de los ensayos de UFC-F para las poblaciones separadas. Como puede deducirse de la Fig. 2a (aquí se evaluaron 5000 células), ni las células CD271+CD140b- ni las células CD271+W8B2- tenían actividad de UFC-F significativa. A diferencia de esto, las células CD271+CD140b+, CD271+HEK-3D6+ y CD271+W8B2+ tuvieron actividad de UFC-F fuertemente potenciada en comparación con las células no separadas. Aprox. cada 50-100 células en las fracciones positivas era una CMM con capacidad de UFC-F. De la Fig. 2b (aquí se evaluaron 500 células), puede deducirse que la capacidad de UFC-F es claramente mayor en la fracción CD271+CD56+ que en la fracción CD271+CD56-. En la fracción doble positiva, cada 10 células es una UFC-F.

Como puede deducirse de la Fig. 2, las células CD271 positivas aunque CD140b negativas no mostraron, o solo mostraron, actividad de UFC-F no significativa, al igual que las células CD271 positivas/W8B2-negativas. Por otro lado, las células CD271 positivas/CD140b-positivas o W8B2-positivas mostraron actividad de UFC-F que las diferenciaba como células madre mesenquimales “genuinas”.

La Fig. 3 muestra, por primera vez en la bibliografía, hasta donde son conscientes los autores de la invención, la morfología de CMM separadas de médula ósea. Por consiguiente, las CMM se diferencian por tener una proporción de citoplasma relativamente alta, en la que además parece haber gotas lipídicas. Las imágenes se realizaron con un microscopio Zeiss Axiovert usando el programa informático Axiovision y se evaluaron. Aumento: x 100.

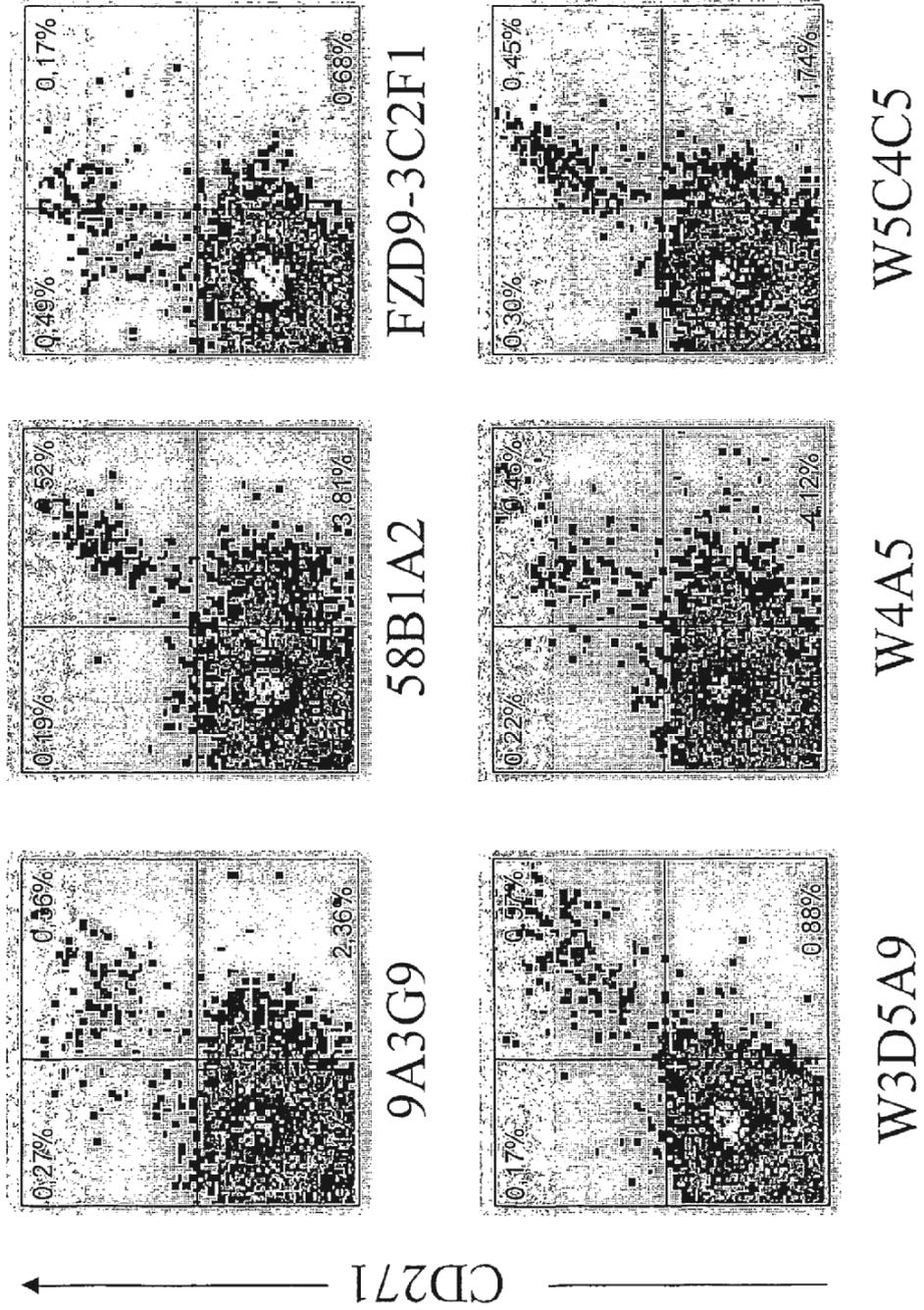
Las Figs. 4a y. 4b muestran imágenes aumentadas de células separadas obtenidas 10 días después de la diferenciación *in vitro*. En cada caso, en las dos figuras, las células fueron CD271-positivas. En la imagen izquierda, la Fig. 4a muestra células que además se aislaron usando W8B2, y que por consiguiente expresaban el antígeno correspondiente. Como puede observarse en las figuras, las CMM solo pudieron producirse en cultivos de células de la fracción positiva doble (CD271+W8B2+), no de la fracción CD271+W8B2-. La Fig. 4, al igual que la Fig. 4a, muestra un comportamiento de crecimiento análogo para las células de la fracción CD271+CD140b+.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo, o de fragmentos funcionales del mismo, para aislar y/o identificar, de tejido primario, células madre mesenquimales homogéneas, mediante el cual el anticuerpo es el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813.
- 10 2. Uso de un anticuerpo, o de fragmentos funcionales del mismo, para aislar y/o identificar, de tejido primario, células madre mesenquimales homogéneas, en el que se usa un anticuerpo que compite por el mismo antígeno que el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813.
- 15 3. Uso de un anticuerpo, o de fragmentos funcionales del mismo, para aislar y/o identificar, de tejido primario, células madre mesenquimales homogéneas, en el que se usa un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813.
- 20 4. El uso como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tejido primario se selecciona del grupo que incluye médula ósea, placenta, tejido adiposo.
- 25 5. Un método para aislar y/o identificar, de tejido primario, células madre mesenquimales homogéneas, que incluye las siguientes etapas:  
 a) poner en contacto una muestra de células en suspensión obtenida de tejido primario y que incluye células madre mesenquimales, con un anticuerpo, o con fragmentos funcionales del mismo, mediante lo cual el anticuerpo es el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813.  
 b) identificar y/o aislar aquellas células en la muestra a las que se ha unido un anticuerpo, o fragmentos del mismo, de la etapa a).
- 30 6. Un método para aislar y/o identificar, de tejido primario, células madre mesenquimales homogéneas, que incluye las siguientes etapas:  
 a) poner en contacto una muestra de células en suspensión obtenida de tejido primario y que incluye células madre mesenquimales, con un anticuerpo anti-CD271;  
 b) poner en contacto la muestra de la etapa a) con un anticuerpo, o con fragmentos funcionales del mismo, en el que el anticuerpo es el anticuerpo W5C5, que se produce por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813; y  
 c) identificar y/o aislar aquellas células en la muestra a las que se ha unido el anticuerpo de la etapa a), y un anticuerpo de la etapa b) o fragmentos funcionales del mismo.
- 35 7. El método como se reivindica en la reivindicación 6, en el que las etapas a) y b) se realizan de manera simultánea, sucesivamente o en orden inverso.
- 40 8. El método como se reivindica en una de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el tejido primario se selecciona del grupo que incluye médula ósea, placenta, tejido adiposo.
- 45 9. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo W5C5, o fragmentos funcionales del mismo, producido por la línea celular de hibridoma que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813.
- 50 10. Un kit que contiene al menos un anticuerpo, o fragmentos funcionales del mismo, producido a partir de la línea celular de hibridoma W5C5 que está depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número DSM ACC 2813.
- 55 11. El kit como se reivindica en la reivindicación 10, que además incluye un anticuerpo anti-CD271.
- 60 12. Células madre mesenquimales homogéneas W5C5<sup>+</sup> obtenidas siguiendo el método como se reivindica en una de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso como un medicamento.
13. Células madre mesenquimales homogéneas W5C5<sup>+</sup> obtenidas siguiendo el método como se reivindica en una de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso en el tratamiento de tejido óseo o cartilaginoso deteriorado.
- 65 14. El uso de células madre mesenquimales homogéneas W5C5<sup>+</sup> obtenidas siguiendo el método como se reivindica en una de las reivindicaciones 5 a 8 para producir *in vivo* osteoblastos, condrocitos, adipocitos o fibroblastos.



Fig. 1b



Capacidad UFC-F de las células de médula ósea CD140b+, W8B2+ y HEK3D6+

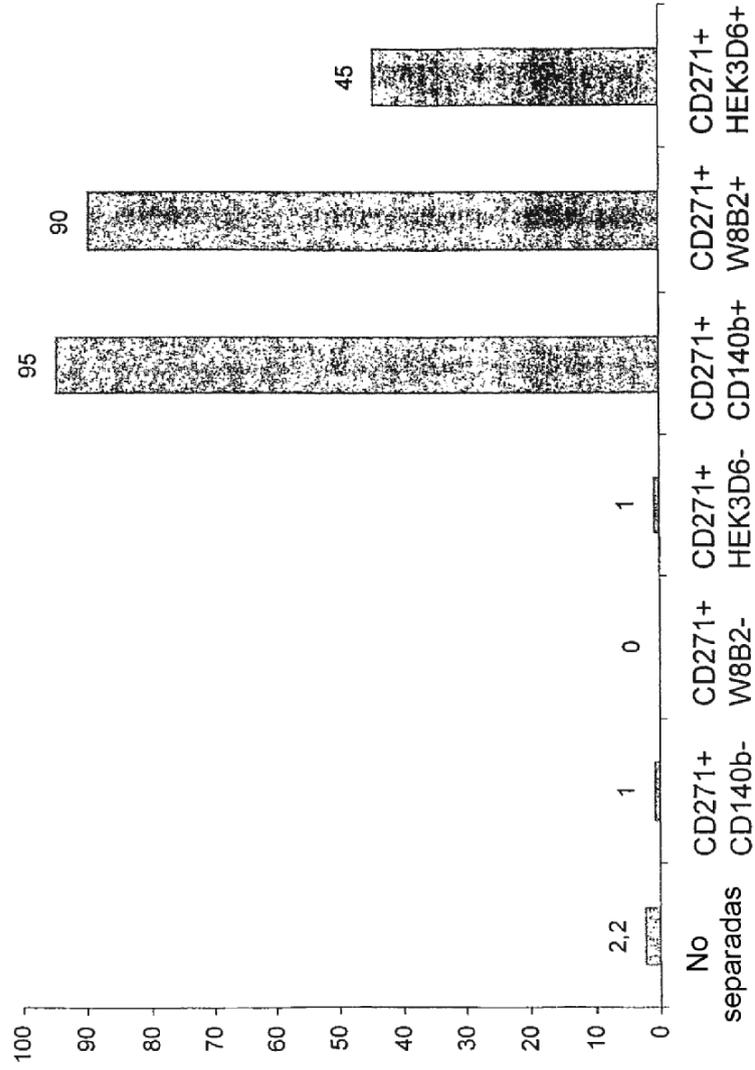
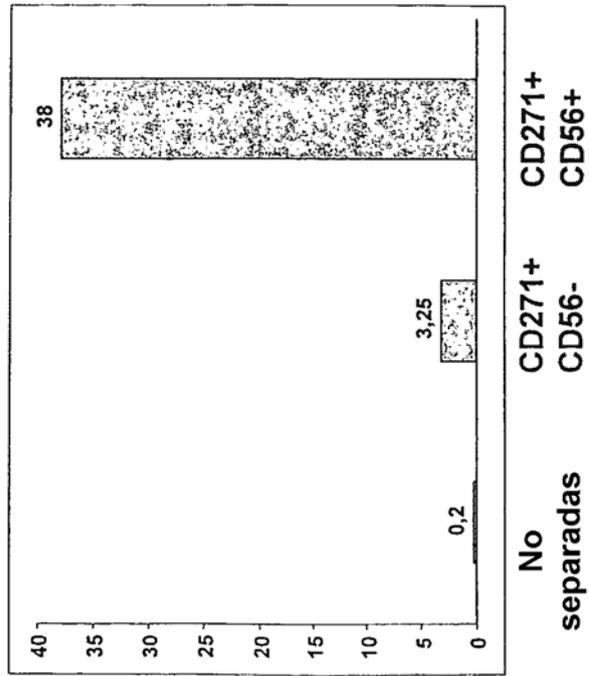
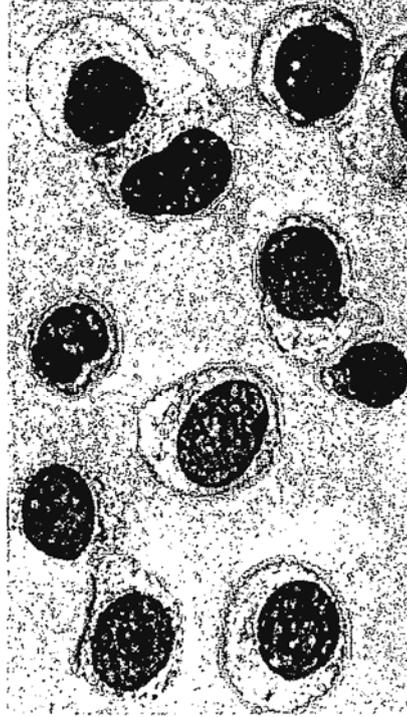


Fig. 2a



**Fig. 2b**

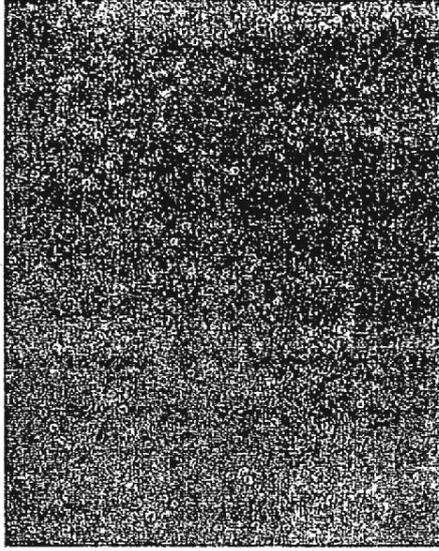


**Fig. 3**

**Morfología de células de médula ósea  
W8B2B10+ el día 10 del cultivo**



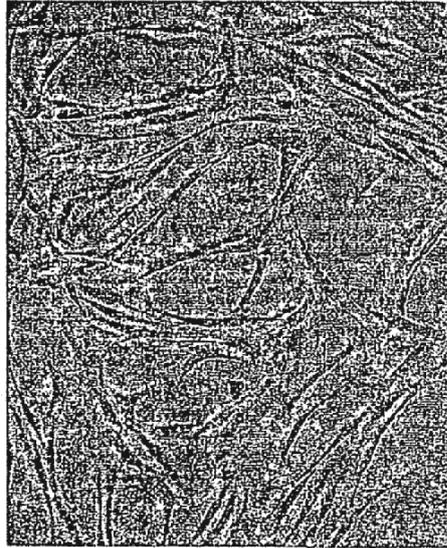
CD271+  
W8B2+



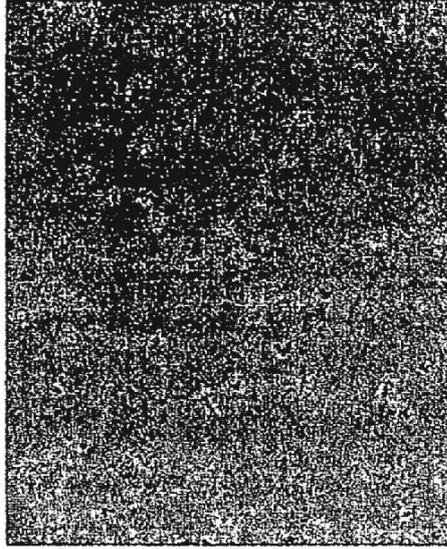
CD271+  
W8B2-

**Fig. 4a**

**Morfología de células de médula ósea CD140b+  
el día 10 del cultivo**



CD271+  
CD140+



CD271+  
CD140 -

**Fig. 4b**