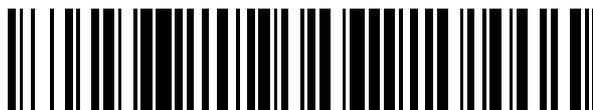


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 428**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2006 E 11075042 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2399991**

54 Título: **Aislamiento de células multipotenciales adultas por fosfatasa alcalina no específica de tejido**

30 Prioridad:

12.04.2005 US 670250 P

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**MESOBLAST, INC. (100.0%)
505 Fifth Avenue, Third Floor
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**GRONTHOS, STAN y
ZANNETTINO, ANDREW CHRISTOPHER WILLIAM**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 654 428 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aislamiento de células multipotenciales adultas por fosfatasa alcalina no específica de tejido

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a poblaciones celulares enriquecidas mediante procedimientos de la presente invención y a usos terapéuticos de estas células.

10 **Antecedentes de la invención*****Enriquecimiento de células multipotenciales adultas***

Numerosos estudios apoyan el concepto de que las células no hematopoyéticas de la médula ósea (MO), que incluyen fibroblastos, adipocitos, condroblastos, células de músculo liso, osteoblastos y otros elementos celulares del hueso, derivan de una población de células precursoras mesenquimáticas (MPC) de médula ósea multipotenciales que residen en algún lugar de los espacios de médula ósea y tejido conectivo circundante (Bianco y col., 2001; Gronthos y Simmons, 1996; Owen y Friedenstein, 1988; Prockop, 1997). Se cree que estas MPC dan lugar no solo a más células que son fenotípica y funcionalmente idénticas (un proceso de autorrenovación), sino también a progenie mesenquimática comprometida con linaje diferenciada. Debido a la falta de marcadores bien definidos, se sabe poco de los cambios de fenotipo precisos regulados por el desarrollo y los patrones de expresión génica que aparecen durante la diferenciación y maduración de MPC humanas en progenie comprometida con linaje. Los estudios que examinan el proceso de la osteogénesis han identificado uno de tales marcadores tempranos, el factor de transcripción CBFA1, que posibilita la identificación de MPC que se han comprometido con el linaje celular osteogénico (Ducy y col., 1997). Sin embargo, los marcadores tales como CBFA1 no pueden usarse para aislar y manipular células vivas en una población celular heterogénea. Esto representa una importante limitación, y se combina además con la escasez de anticuerpos monoclonales (AcM) que son capaces de identificar antígenos de superficie celular que son específicos de o restringidos al compartimento de MPC.

30 Hasta la fecha, el anticuerpo monoclonal STRO-1 representa el único reactivo que demuestra inmunorreactividad con todas las MPC formadoras de colonias (UFC-F: unidades formadoras de colonias-fibroblastos) a partir de aspirados de médula humana al tiempo que carece de reactividad con citoblastos hematopoyéticos (Dennis y col. al., 2002; Gronthos y col., 2003; Simmons y Torok-Storb, 1991).

35 Los estudios han mostrado que las MPC humanas expandidas *ex vivo* se diferencian rápidamente en presencia de suero y empiezan a expresar muchos de los marcadores asociados al compromiso con el linaje celular osteogénico y otros (Gronthos y col., 2003). El AcM STRO-1, que identifica todas las MPC (UFC-F) *in vivo*, está regulado negativamente después del cultivo *ex vivo* de MPC. De forma importante, una pequeña proporción de células cultivadas sigue expresando STRO-1 después de la expansión *ex vivo* y estas células son características de MPC no diferenciadas (Gronthos y col., 1999; Stewart y col., 1999).

Fosfatasas alcalinas

45 Las fosfatasas alcalinas (AP, EC 3.1.3.1) pertenecen a una familia ubicua de metaloenzimas diméricas que catalizan la hidrólisis de fosfomonoésteres bajo condiciones alcalinas con liberación de fosfato inorgánico (McComb y col., 1979). Puede distinguirse entre cuatro isoenzimas en seres humanos: i) AP específica de placenta, ii) AP específica de célula germinal (placentaria), iii) AP intestinal y iv) AP no específica de tejido (TNAP) (Harris, 1990). La producción de TNAP es más fuerte en el hígado (LAP), riñón (KAP) y huesos (BAP) (Moss, 1992) y es la isoforma de AP más frecuente en suero (Mulivor y col., 1985). Las diferencias entre LAP, KAP y BAP son debidas a diferentes patrones de O-glicosilación postraducciona (Miura y col., 1994) que también dan como resultado diferentes actividades específicas (Nosjean y col., 1997), aunque sus secuencias aminoácidas son esencialmente idénticas (Weiss y col., 1988). Además, Nosjean y col. (1997) mostraron que la N-glicosilación de tns-AP es esencial para su actividad enzimática. En consecuencia, la AP no específica de tejido es una mezcla de diferentes AP glicosiladas.

55 El gen de TNAP humana se clonó en 1986 (Weiss y col., 1986). Codifica una proteína consistente en 524 aminoácidos con una secuencia señal N-terminal larga de 17 aminoácidos y una secuencia de anclaje de GPI C-terminal con la que se ancla la proteína *in vivo* al exterior de la membrana plasmática (Hooper, 1997). Se ha reseñado la expresión de una enzima TNAP recombinante biológicamente activa en células eucarióticas tales como COS-1 (Fukushi y col., 1998) y células de insecto infectadas con baculovirus (Oda y col., 1999).

60 Aunque se ha descubierto hace más de siete décadas, la función exacta de la molécula de TNAP en hueso y médula

ósea no está clara. Se han propuesto varios papeles biológicos para la TNAP en mamíferos e incluyen: hidrólisis de ésteres fosfato para suministrar el resto no fosfato; acción transferasa para la síntesis de ésteres fosfato; regulación del metabolismo de fosfato inorgánico; mantenimiento de los niveles de estado estacionario de metabolitos de fosforilo; actúa como fosfoproteína fosfatasa (Whyte, 1994). La B/L/K-TNAP puede tener también un papel específico en la mineralización esquelética al hidrolizar un inhibidor de calcificación tal como pirofosfato inorgánico, que a altas concentraciones puede inhibir el crecimiento de cristales de hidroxiapatito (De Broe y Moss, 1992; Moss, 1992; Whyte, 1994). Como alternativa, se ha sugerido que la TNAP podría ser un transportador de membrana plasmática para fosfato inorgánico, una proteína de unión al ion de calcio extracelular que estimula la precipitación de fosfato de calcio y orienta la deposición mineral en osteoides.

10

La TNAP es conocida por ser un marcador de la diferenciación de osteoblastos. Sin embargo, a nuestro entender, no ha habido suficientes informes previos de expresión en superficie celular de TNAP por células multipotenciales inmaduras.

15 **Resumen de la invención**

Se ha generado recientemente un AcM novedoso (designado STRO-3) que identifica y aísla células multipotenciales adultas a partir de médula no fraccionada y tiene la capacidad de subdividir la población de STRO-1 tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha determinado que el STRO-3 se une a fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP). Los resultados muestran también que STRO-3 reacciona solo con una proporción minoritaria de células contenidas en aspirados de médula ósea de adulto, y no reacciona con citoblastos hematopoyéticos positivos de CD34 en aspirados de médula ósea adulta humana. Esto indica por primera vez que la TNAP es un marcador que puede usarse para el enriquecimiento en un solo reactivo de células multipotenciales adultas de diversas fuentes de tejido.

20

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una población enriquecida de células multipotenciales adultas TNAP+ donde al menos un 4 % de la población total son células multipotenciales TNAP+ STRO-1+ aptas para cultivarse *in vitro* produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos, donde el marcador TNAP+ es un marcador TNAP+ que se une al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.

30

La presente invención se refiere además a un procedimiento de generación de una población celular comprometida específica de tejido, comprendiendo el procedimiento

cultivar una población de células multipotenciales adultas de la presente invención en presencia de uno o más factores estimulantes; y someter dicha población cultivada a condiciones que sesgan la diferenciación de células multipotenciales adultas a un tipo de tejido específico.

35

La presente invención se refiere además a una composición que comprende una población de células multipotenciales adultas enriquecida de acuerdo con la presente invención.

40

La presente invención se refiere también a una población celular enriquecida de la presente invención para uso en la generación o reparación de tejido en un sujeto.

45 Se enseñan en la presente memoria otros procedimientos y usos para referencia.

Se divulga un procedimiento de enriquecimiento de células multipotenciales adultas, comprendiendo el procedimiento preparar una muestra celular a partir de una fuente de tejido y enriquecerla en células que expresan el marcador TNAP.

50

Se divulga un procedimiento de enriquecimiento de células multipotenciales adultas que comprende poner en contacto la muestra celular con un agente de unión a TNAP bajo condiciones que permitan la unión de TNAP al agente de unión a TNAP; y separar las células unidas al agente de unión a TNAP.

55 Se divulga además un procedimiento para identificar la presencia de una célula multipotencial adulta en una muestra celular, comprendiendo el procedimiento identificar células en la muestra que expresan el marcador TNAP.

Se divulga también un procedimiento para identificar la presencia de células multipotenciales adultas en una muestra celular, que comprende

60 poner en contacto la muestra celular con un agente de unión a TNAP en condiciones adecuadas para la unión de TNAP al agente de unión a TNAP; y

detectar la presencia del agente de unión a TNAP unido a células en la muestra, donde la presencia de células multipotenciales adultas se indica por células que se unen al agente de unión a TNAP.

5 Se apreciará que, en el contexto de la presente divulgación, la muestra celular puede derivar de cualquier fuente de tejido sospechosa de contener células multipotenciales adultas. Por ejemplo, la fuente de tejido puede ser tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, nódulo linfático, timo, ovario, páncreas, hueso, ligamiento, médula ósea, tendón o músculo esquelético. En un ejemplo preferido, la fuente de tejido es médula ósea.

10

La fuente preferida de células es humana, sin embargo, se espera que la divulgación sea también aplicable a otros animales, incluyendo animales agrícolas tales como vacas, ovejas, cerdos y similares, animales domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, hámsteres y conejos o animales que se usan para deportes tales como caballos.

15

El procedimiento puede incluir también la recolección de una fuente de células multipotenciales antes de la primera etapa de enriquecimiento. Esto puede implicar, por ejemplo, retirar quirúrgicamente tejido de un sujeto y separar las células del tejido formando una suspensión monocelular. Esta separación puede conseguirse por medios físicos o enzimáticos. En un ejemplo de la divulgación, esta etapa implica recolectar células de médula ósea usando técnicas conocidas.

20

El agente de unión a TNAP usado en los procedimientos enseñados en la presente memoria puede ser cualquier polipéptido o compuesto identificado por tener afinidad de unión a TNAP. Por ejemplo, el agente de unión a TNAP puede ser un anticuerpo o colágeno, preferiblemente colágeno de tipo I.

25

El agente de unión a TNAP puede unirse a una cualquiera o más de las isoformas LAP, KAP o BAP de TNAP. En un ejemplo preferido, sin embargo, el agente de unión a TNAP se une a BAP. En otro ejemplo preferido, el agente de unión a TNAP se une específicamente a BAP.

30 Se entiende por "se une específicamente a BAP" que el agente de unión a TNAP es capaz de unirse a BAP de forma selectiva en presencia de cantidades en exceso de otros materiales tales como KAP y LAP, y con suficiente fuerza, (es decir, con una afinidad suficientemente alta) para proporcionar una herramienta útil para el enriquecimiento selectivo de células que expresan BAP.

35 En un ejemplo preferido, el agente de unión a TNAP es un anticuerpo anti-TNAP (de origen natural o recombinante, de cualquier fuente). El anticuerpo anti-TNAP puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En un ejemplo preferido, el anticuerpo anti-TNAP es un anticuerpo monoclonal.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-TNAP para uso en la presente divulgación incluyen B4-78, 50 y B4-50 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa); ab17973 y ab17989 (Abcam Ltd, Cambridge, RU) y el AcM anti-TNAP al que se hace referencia en Magnusson y col. (2002).

40 En una realización particularmente preferida, el anticuerpo monoclonal anti-TNAP es un anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-7282, o un AcM que se une al mismo epitopo en TNAP que el anticuerpo STRO-3.

45 El procedimiento de enriquecimiento de células multipotenciales adultas enseñado en la presente memoria puede estar basado en la presencia del marcador TNAP solo. En otras palabras, el procedimiento de enriquecimiento puede implicar un solo reactivo (es decir, un agente de unión a TNAP).

50 Sin embargo, se entenderá que la divulgación no está limitada al enriquecimiento de células por su expresión de solo TNAP, y en algunas circunstancias, puede preferirse enriquecer células multipotenciales adultas basándose en la expresión de TNAP en combinación con dos, tres o más marcadores adicionales. Por consiguiente, el procedimiento de enriquecimiento de células multipotenciales adultas puede estar basado también en la presencia adicional de uno o más marcadores seleccionados de entre el grupo consistente en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R, (STRO-2= leptina-R), RANKL, STRO-1 (preferiblemente STRO-1^{bn}) y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

60

Por ejemplo, el procedimiento puede incluir la etapa de elaborar un primer agrupamiento parcialmente enriquecido de células enriqueciendo la expresión de un primer marcador específico de células multipotenciales adultas, seguido de una etapa de enriquecimiento de la expresión de TNAP a partir del agrupamiento parcialmente enriquecido de células. En otro ejemplo, el procedimiento puede incluir una etapa de enriquecimiento inicial basada en la selección de células que expresan TNAP, seguida de una etapa que implica enriquecer en un marcador de células multipotenciales adultas diferente. En aún otro ejemplo, el procedimiento implica seleccionar simultáneamente células que expresan TNAP y uno o más marcadores específicos de células multipotenciales adultas adicionales.

Se entenderá que el reconocimiento de células portadoras de TNAP que forma la base de la separación pueda efectuarse mediante una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, todos estos procedimientos se basan en algún punto en la unión de células al agente de unión a TNAP seguida de la separación de aquellas células que exhiben unión, sea unión de alto nivel o unión de bajo nivel o unión nula. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpo, siendo preferiblemente anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales debido a la especificidad de estos últimos agentes.

Los agentes de unión a TNAP pueden enlazarse con un soporte sólido para permitir una separación bruta. Las técnicas de separación maximizan preferiblemente la retención de viabilidad de la fracción para recoger. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente brutas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad e "inmunopurificación" con anticuerpo enlazado con una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, pero sin limitación, MACS, selección de perlas magnéticas Dynal y FACS.

En un ejemplo, se marca el agente de unión a TNAP. En otro ejemplo, se lleva a cabo la separación de células unidas al agente de unión a TNAP mediante un clasificador celular mecánico.

En un ejemplo adicional, se acopla el agente de unión a TNAP con un compuesto marcador fluorescente. En este caso, se lleva a cabo la separación de células unidas al agente de unión a TNAP preferiblemente usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS).

En un ejemplo adicional, se liga el agente de unión a TNAP a una partícula sólida. Preferiblemente, la partícula sólida es una partícula magnética. En este ejemplo, se lleva a cabo la separación de las células unidas al agente de unión a TNAP preferiblemente por separación de la fase particulada de la fase líquida. En un ejemplo preferido adicional, previamente a la etapa de separación se pone en contacto la muestra celular con un anticuerpo dirigido contra el agente de unión a TNAP ligado a una partícula sólida, y donde la separación de células unidas al agente de unión a TNAP se lleva a cabo separando la fase particulada de la fase líquida.

En un ejemplo adicional, las células de la muestra celular son células adherentes cultivadas sobre un soporte sólido, y la retirada de los agentes de unión a TNAP se lleva a cabo por aclarado.

En un ejemplo adicional, se cultivan las células de la muestra celular en suspensión y se lleva a cabo la retirada de los agentes de unión a TNAP no unidos por centrifugación de la muestra celular y separación del sobrenadante resultante.

En un ejemplo adicional, se somete la muestra celular a un procedimiento de clasificación celular adicional para enriquecer o disminuir la población celular en células que expresan al menos un marcador de células multipotenciales adicional. El marcador de células multipotenciales puede ser uno o más marcadores seleccionado de entre el grupo consistente en: LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombospondina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R, (STRO-2= leptina-R), RANKL, STRO-1 (preferiblemente STRO-1^{brl}) y CD 146 o cualquier combinación de estos marcadores.

La presente invención proporciona una población enriquecida en células multipotenciales adultas TNAP+ donde al menos un 4 % de la población celular total son células multipotenciales TNAP+ STRO-1+ aptas para cultivarse in vitro produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos, donde el marcador TNAP+ es un marcador TNAP+ que se une al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.

En una realización preferida de la presente invención, al menos un 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60

60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la población celular enriquecida total son células multipotenciales adultas que tienen el fenotipo TNAP+.

En una realización, la población enriquecida tiene al menos un 10 % de la población celular total que son TNAP+.

5 Las células multipotentes STRO-1+ son aptas para cultivarse in vitro, produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos.

En una realización, la población enriquecida tiene al menos un 20 % de la población celular total que son TNAP+.

10 Las células multipotentes STRO-1+ son aptas para cultivarse in vitro, produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos.

En una realización, las células STRO-1+ son células STRO-1^{bright}.

15 En un ejemplo, cultivar la población enriquecida de la divulgación da como resultado una mayor proporción de células que son STRO+ cuando se compara con células seleccionadas usando STRO-1 como marcador y cultivadas en las mismas condiciones. Preferiblemente, tal cultivo es durante aproximadamente 4 o aproximadamente 6 pases. Preferiblemente, las células se obtuvieron a partir de médula ósea.

20 En otro ejemplo, la población enriquecida de la divulgación comprende de aproximadamente 79 % a aproximadamente 99 %, más preferiblemente de aproximadamente 84 % a aproximadamente 94 % y aún más preferiblemente aproximadamente 89 % de células que son CD45+.

Preferiblemente, se obtuvo la población enriquecida de células multipotenciales adultas mediante un procedimiento divulgado en la presente memoria.

25

La presente divulgación proporciona también una población celular expandida obtenida cultivando una población enriquecida de células multipotenciales adultas de acuerdo con la invención.

30 En un ejemplo, la población celular enriquecida de la divulgación, o una población celular expandida de la invención, comprende al menos algunas células que están modificadas genéticamente.

La presente invención proporciona también un procedimiento de generación de una población celular comprometida específica de tejido, comprendiendo el procedimiento

35 cultivar una población de células multipotenciales adultas de la presente invención en presencia de uno o más factores estimulantes; y someter dicha población cultivada a condiciones que sesgan la diferenciación de células multipotenciales adultas a un tipo de tejido específico.

40 En un ejemplo de este procedimiento de la divulgación, se selecciona el tipo de tejido del grupo consistente en músculo cardiaco, tejido vascular, tejido óseo, tejido de cartílago, tejido graso, tejido neural, músculo liso y tejido endotelial.

45 Se entenderá que la divulgación también abarca una composición que comprende células multipotenciales adultas enriquecidas de la presente invención y/o una población celular expandida de la invención.

En un ejemplo preferido, la composición comprende además un factor estimulante. Tal composición es probable que sea terapéuticamente beneficiosa y por tanto se preparará en una forma farmacéuticamente aceptable.

50 Puede determinarse el nivel de factor o factores estimulantes presentes en la composición empíricamente, pero en la mayoría de casos es probable que sea del orden de nanogramos o décimas de nanogramos por mililitro.

55 El factor estimulante usado en un procedimiento de la divulgación, y/o presente en una composición de la divulgación, puede ser cualquier factor adecuado capaz de promover la división y/o diferenciación celular. Tales factores son bien conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25D), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) y factor derivado de estroma 1 α (SDF-1 α).

60 En otro ejemplo, la composición comprende además un factor para sesgar la diferenciación de las células multipotenciales adultas de la presente divulgación a un tipo de tejido específico. Preferiblemente, el tipo de tejido se selecciona de entre el grupo consistente en músculo cardiaco, tejido vascular, tejido óseo, tejido de cartílago, tejido

graso, tejido neural, músculo liso y tejido endotelial.

Las condiciones que sesgan la diferenciación de las células multipotenciales adultas de la presente divulgación a células precursoras óseas o hueso pueden implicar, por ejemplo, cultivar en α MEM suplementado con 10 % de FCS, 5 L-ascorbato-2-fosfato 100 μ M, dexametasona 10^{-7} M y fosfato inorgánico 3 mM. Se ha mostrado que estas condiciones inducen a las células estromales de médula ósea humana a desarrollar una matriz ósea mineralizada *in vitro* (Gronthos y col., 1994).

Las condiciones adecuadas para diferenciar las células multipotenciales adultas de la presente divulgación en 10 osteoblastos pueden implicar cultivar las células en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, osteocalcina u osteonectina. En un ejemplo particular, se cultivan las células en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno y fibrina. En un ejemplo alternativo, se cultivan las células en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, osteocalcina y osteonectina. En el contexto de este procedimiento, pueden usarse colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, osteocalcina u osteonectina solos 15 o en presencia de un factor de crecimiento. Se entenderá que está contemplada por la presente divulgación cualquier combinación de los compuestos enumerados anteriormente en este párrafo.

En un ejemplo adicional, una composición de la divulgación comprende además una cola de fibrina.

20 La presente invención proporciona también una población celular enriquecida de la presente invención para uso en la generación o reparación de tejido en un sujeto.

La población celular enriquecida o expandida de células multipotenciales obtenida puede usarse, por ejemplo, en la formación y reparación de huesos, y como tal puede introducirse una combinación de células multipotenciales, así 25 como un soporte adecuado, en un sitio que requiera la formación de hueso. Por tanto, por ejemplo, pueden repararse los defectos esqueléticos causados por lesión ósea o la retirada de secciones de hueso infectadas por tumores implantando células multipotenciales adultas cultivadas o expandidas contenidas en vehículos cerámicos de fosfato de calcio en el sitio de defecto. Para procedimientos y técnicas apropiados, véanse Caplan y col. en la patente de EE.UU. 5.226.914 y la patente de EE.UU. 5.837.539, usando ambas preparaciones más brutas de 30 citoblastos en comparación con la presente divulgación.

Además, la población o composición de células enriquecidas puede usarse para ayudar a anclar dispositivos protésicos. Por tanto, la superficie de un dispositivo protésico tal como los usados en reemplazos de cadera, rodilla y hombro pueden recubrirse con las células multipotenciales enriquecidas previamente a la implantación. Las células 35 multipotenciales pueden diferenciarse entonces en células osteogénicas para acelerar así el proceso de crecimiento óseo y la incorporación del dispositivo protésico (véanse Caplan y col. en la patente de EE.UU. 5.226.914 y la patente de EE.UU. 5.837.539).

La población o composición de células enriquecidas podría usarse también en terapia génica de modo que, por 40 ejemplo, una población enriquecida pueda transformarse con ácido nucleico exógeno, y entonces tal población pueda introducirse en el cuerpo del paciente para tratar una enfermedad o afección. Como alternativa, podría usarse para la liberación de productos terapéuticos. Para técnicas apropiadas, se hace referencia a la patente de EE.UU. 5.591.625 de Gerson y col., que usa preparaciones más brutas de citoblastos en comparación con la presente divulgación.

45 Como alternativa, la población o composición enriquecida puede usarse para acrecentar el trasplante de médula ósea, donde la composición que contiene células multipotenciales adultas puede inyectarse en un paciente que experimenta trasplante de médula antes de la introducción de la médula entera. De este modo, puede aumentarse la tasa de hemopoyesis, particularmente después de radiación o quimioterapia. La composición podría abarcar también 50 una mezcla de células multipotenciales y células hemopoyéticas que puede ser útil en radioterapia o quimioterapia.

Se proporciona también el uso de una población celular enriquecida o expandida de la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para generar o reparar tejido en un sujeto.

55 Se proporciona también el uso de una composición de la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para generar o reparar tejido en un sujeto.

Se divulga en la presente memoria una célula aislada que se ha obtenido mediante un procedimiento de la divulgación, o una célula de progenie de la misma, donde la célula está modificada genéticamente.

60 En un ejemplo preferido, la célula se modifica genéticamente para expresar una proteína heteróloga. La proteína

heteróloga puede ser cualquier proteína de interés. Por ejemplo, la proteína heteróloga puede ser un factor estimulante tal como $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1,25D$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina- 1β (IL- 1β) y factor derivado de estroma 1α (SDF- 1α).

- 5 En otro ejemplo, la proteína heteróloga es un factor bioactivo que acelera la diferenciación de la célula multipotencial adulta en tipos de tejido específicos. El factor bioactivo puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide sintético tal como dexametasona, o una proteína morfogénica ósea tal como BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 o BMP-7.

Se divulga también una línea celular de hibridoma [STRO-3] depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-7282.

Se divulga también un anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-7282.

15

Se divulga también un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo en células multipotenciales que el anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-7282.

- 20 Se divulga una composición que comprende un anticuerpo enseñado en la presente memoria. Preferiblemente, la composición comprende además uno o más portadores adecuados.

Se divulga también un kit que comprende una población celular enriquecida de la divulgación, una población celular expandida de la divulgación, una composición de la divulgación, una célula aislada enseñada en la presente memoria, un hibridoma enseñado en la presente memoria y/o un anticuerpo enseñado en la presente memoria.

25

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprendiendo" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa declarado, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

30

Los diversos rasgos y realizaciones de la presente invención, a los que se hace referencia en secciones individuales anteriores, se aplican según sea apropiado a otras secciones *con los cambios necesarios*. En consecuencia, los rasgos especificados en una sección pueden combinarse con rasgos especificados en otras secciones, según sea apropiado.

35

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis citométrico de flujo de células BAF-3 seleccionadas con STRO-3

- 40 Enriquecimiento progresivo de BAF-3 que expresan el Ag de superficie de STRO-3. Se inmunomarcaron células BAF-3 aisladas selectivamente por el procedimiento de perlas magnéticas/captura y enriquecimiento de AcM con el AcM STRO-3 y se analizaron por citometría de flujo después de una (A), dos (B) y tres (C) rondas de selección. Se llevaron a cabo la selección y enriquecimiento de perlas magnéticas hasta conseguir la homogeneidad de la expresión del Ag.

45

Figura 2. Recuperación por PCR de insertos de ADNc provírico a partir de ADN genómico aislado de células BAF-3 que expresan el Ag de superficie de STRO-3

- Se usó PCR de largo alcance para recuperar los insertos de ADNc a partir de ADN genómico (flecha) aislado de células BAF-3 que expresan el Ag de superficie celular de STRO-3. Los cebadores de PCR usados eran complementarios de las secuencias adyacentes al sitio de multiclonación en el vector retrovírico. Se practicó la amplificación como se detalla en los Procedimientos, después de lo cual se separaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,0 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

50

Figura 3. Análisis de alineamiento FASTA de productos de PCR derivados del antígeno de STRO-3

- 55 Después del análisis de secuencia parcial, se comparó la secuencia nucleotídica resultante con secuencias enviadas a la base de datos combinada Genbank/EMBL a través de "análisis de alineamiento FASTA" estándar, y reveló un 100 % de homología con la isoforma BLK de la secuencia de ADN complementario de ALP (nº de acceso a Genbank H37944).

- 60 Figura 4. El AcM STRO-3 reconoce la isoforma BLK de ALP en transfectantes de BAF-3

Se subclonó un fragmento de restricción *Bam*HI-*Xho*I de 1,7 kb del ADNc de BLK-ALP (que alberga tanto la

secuencia de codificación entera como las regiones no codificantes 5' y 3') en el vector pRUF.*neo* y se introdujo posteriormente en células BAF-3 por transducción retroviral (referencia a Materiales y Procedimientos). Se tiñó la población celular resistente a G418 resultante por inmunofluorescencia indirecta y se analizó por citometría de flujo. Se exhiben los datos como histogramas de fluorescencia de un parámetro (FITC) de 1×10^4 eventos activados por dispersión de luz, recogidos como datos en modo de lista: control de IgG1 (línea negra fina); (A) AcM STRO-3; (B) AcM B4-78; (C) AcM B4-50 y (D) AcM 8B6.

Figura 5. El AcM STRO-3 identifica una forma enzimáticamente activa de ALP

Se prepararon preparaciones de Cytospin de células BAF-3 no transfectadas (A) y positivas de STRO-3 (B) en portaobjetos de vidrio y se fijaron entonces con etanol al 70 %. Se incubaron entonces los portaobjetos con sustrato fosfatasa alcalina usando el kit de sustrato fosfatasa alcalina Sigma (AM0100) como se recomienda por el fabricante. Los resultados muestran que las células BAF-3 que expresan STRO-3 (B) contenían la forma activa de la enzima fosfatasa alcalina (color morado/rojo). Se contratiñeron las células con hematoxilina (azul).

15 Figura 6. PCR específica de ALP

Se empleó PCR-TI para identificar la isoforma de fosfatasa alcalina codificada por el ADNc usando el ARN total aislado de células BAF-3 que expresan el Ag de superficie celular de STRO-3 como se describe en los procedimientos. Los cebadores de PCR usados identificaban secuencias específicas de las isoformas de fosfatasa alcalina de hígado (L) (216 pb) o hueso (B) (215 pb), como se describe previamente por Sato y colaboradores (1994) (Sato y col., 1994). Después de la amplificación por PCR, se hicieron circular los productos por un gel de agarosa al 1,5 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Los resultados indicaban que las células BAF-3 que expresan antígeno de STRO-3 expresaban solo transcritos correspondientes a la isoforma de fosfatasa alcalina (B) específica de hueso.

Figura 7. Expresión del antígeno de STRO-3 en tejido óseo humano

25 Se valoró también la inmunoreactividad del AcM STRO-3 en secciones de revelado de médula ósea usando inmunohistoquímica como se describe en los procedimientos. Se tiñeron secciones de 5 micrómetros de miembro humano de 55 días de edad embebido en parafina con AcM STRO-3, como se describe en los procedimientos. Aunque la expresión del antígeno de STRO-3 (TNAP) era evidente en las células mesenquimáticas de los espacios de la médula ósea (MO), las regiones perivasculares (PV) y en la interfase de la región de placa de crecimiento, no se observó tinción en el periostio (P) ni el cartílago (C).

Figura 8. Las células clonogénicas están exclusivamente restringidas a la fracción positiva de AcM STRO-3 de MO humana

Se sembraron suspensiones monocelulares de MO no fraccionada (Pre) y MO humana positiva de TNAP (TNAP+) y negativa de TNAP (TNAP-) seleccionadas por MACS en medio de crecimiento regular (Gronthos y col., 2003) para valorar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular. Después de 12 días de cultivo, se tiñeron las colonias (agregados de 50 células o más) y se puntuaron como se describe en los Procedimientos. El gráfico de barras representa el número de colonias clonogénicas por 10^5 células sembradas para cada fracción celular promediado de dos experimentos separados. Los datos demuestran que las UFC-F están exclusivamente restringidas a la fracción de MO positiva de TNAP.

Figura 9. Coexpresión de TNAP y el marcador de células precursoras mesenquimáticas STRO-1 por BMMNC humanas adultas

Se practicó una inmunofluorescencia de color dual y citometría de flujo por incubación de BMMNC de STRO-1 seleccionadas por MACS y marcadas indirectamente con un anticuerpo de IgM de cabra antimurino acoplado con FITC (eje x) y AcM STRO-3 (IgG1 de murino) marcado indirectamente con una IgG de cabra antimurino acoplada con PE (eje y). El histograma de gráfico de puntos representa 5×10^4 eventos recogidos como datos en modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0 % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población minoritaria de células STRO-1 bright coexpresaban TNAP (cuadrante superior derecho), mientras que el resto de células STRO-1+ no conseguían reaccionar con el AcM STRO-3. Se ensayó posteriormente en las células aisladas por FACS de los cuatro cuadrantes la incidencia de UFC-F (Tabla 2).

55 Figura 10. Coexpresión de CD45, CD34, 3G%, CC9 y STRO-1 con TNAP por células enriquecidas por AcM STRO-3.

Figura 11. Las células seleccionadas por AcM STRO-3 mantienen altos niveles de expresión de STRO-1 después de múltiples pases.

60 Figura 12. Expresión de STRO-1 en células derivadas de médula ósea seleccionadas usando un anticuerpo que se une al mismo

Figura 13. Características fenotípicas del pase temprano (P2) y tardío (P5) de células multipotenciales expandidas en cultivo seleccionadas con AcM STRO-3

Las células multipotenciales adultas seleccionadas con STRO-3 (P1) son una población con un fenotipo de superficie caracterizado por altos niveles de expresión de antígeno de CC9, STRO-1 y STRO-3. Después de 5 pases en cultivo, la población celular (P5) demuestra una retención significativa de la expresión de STRO-1.

Figura 14. Diferenciación de células seleccionadas con AcM STRO-3 en adipocitos

Se ensayó en dos lotes de células seleccionadas con AcM STRO-3, 2242A y 2070C, la capacidad diferenciadora. Las gráficas representan las unidades de fluorescencia relativa media (UFR media) para células inducidas con medio de inducción adipogénica frente a células no inducidas de control.

Figura 15. Diferenciación de células seleccionadas con AcM STRO-3 en osteocitos

Se generó una curva patrón tomando la DO a 550 nm de muestras que tienen concentraciones de calcio conocidas. Se indujeron dos lotes de células seleccionadas con AcM STRO-3, 2242A y 2070C, con medio de inducción de la osteogénesis. Se prepararon extractos celulares de células inducidas y no inducidas y se midió la DO a 550 nm.

Figura 16. Diferenciación de células seleccionadas con AcM STRO-3 en osteoblastos funcionales

A- Se cultivaron células multipotenciales adultas seleccionadas con AcM STRO-3 durante 3 semanas en α MEM suplementado con 10 % de FCS, L-ascorbato-2-fosfato 100 μ M, dexametasona 10⁻⁷ M y fosfato inorgánico 3 mM y se tiñeron los depósitos minerales con rojo de alizarina. B- Células teñidas con aceite rojo O después del cultivo de células multipotenciales adultas seleccionadas con AcM STRO-3 en presencia de metilisobutilmetilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 0,5 μ M e indometacina 60 μ M. C- Cultivos celulares tratados con TGF- β 3 10 ng/ml y teñidos con azul alcian para identificar la síntesis de proteoglicano. D- Examen histológico de células multipotenciales adultas seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas en cultivo después de implantación.

Figura 17. Tasa de fusión espinal después de la administración de células seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas en cultivo

Figura 18. Fusión espinal robusta en ovejas tratadas con células seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas en cultivo

Figura 19. Células multipotenciales adultas alogénicas expandidas en cultivo seleccionadas con AcM STRO-3 en un modelo de fijación de tornillo transpedicular ovino

Figura 20. Crecimiento óseo dependiente de la dosis por células seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas en cultivo alogénico de oveja en defecto tibial segmentario de tamaño crítico

Figura 21. Mayor tasa de unión en grupos tratados con células seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas en cultivo con defecto tibial segmentario de tamaño crítico

Figura 22. Las células seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas en cultivo mejoran significativamente la función cardíaca 2 semanas después de infarto de miocardio en rata

Figura 23. Efectos de células seleccionadas con STRO-3 expandidas en cultivo alogénico en oveja (pase 5) inyectadas directamente en corazones de oveja inmediatamente después de ligamiento agudo de ambas arterias diagonal y coronaria A- % de reducción de la fracción de eyección, B- % de cambio del volumen diastólico y C- % de cambio del volumen sistólico en oveja.

Figura 24. Supervivencia celular aumentada cuando se suministra en cola de fibrina en comparación con solución salina.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

55 Detalles del depósito de microorganismos

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal designado STRO-3 se depositó el 19 de diciembre de 2005 en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-7282.

Se realizó este depósito bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes y los reglamentos según el mismo. Esto

asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años desde la fecha del depósito. Los organismos se pondrán a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, que asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo al público tras la emisión de la patente pertinente.

- 5 El cesionario de la presente solicitud ha accedido a que si el depósito de cultivo muriera o se perdiera o destruyera cuando se cultiva en condiciones adecuadas, será rápidamente reemplazado tras notificación con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de una cepa depositada no ha de considerarse como una licencia para la práctica de la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

10

Técnicas generales

- A menos que específicamente se defina de otro modo, debe entenderse que todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entendería un especialista en la materia cualquiera (p.ej. en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química proteica y bioquímica).

- A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándares, bien conocidos por los especialistas en la materia. Tales técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes tales como J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel y col. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan y col. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

Células multipotenciales adultas

- Se entiende por "células multipotenciales adultas" células derivadas de tejido adulto que son capaces de dar lugar a cualquiera de varios tipos de células maduras. Como se usa en la presente memoria, esta frase abarca citoblastos adultos y células progenitoras, tales como células precursoras mesenquimáticas (MPC) y la progenie multipotencial de estas células.

- Las células precursoras mesenquimáticas (MPC) son células encontradas en médula ósea, sangre, dermis y periostio; y son capaces de diferenciarse en tipos específicos de tejidos mesenquimáticos o conectivos incluyendo tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conectivo fibroso. El compromiso con un linaje específico y la ruta de diferenciación con estas células depende enteramente de diversas influencias, desde influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos hospedadores. Las células precursoras mesenquimáticas se definen como células que no están diferenciadas terminalmente; que pueden dividirse sin límite y que se dividen procurando células hija que son citoblastos o son células progenitoras que, con el tiempo, se diferenciarán irreversiblemente procurando una célula fenotípica. Las MPC son células progenitoras no hematopoyéticas que son capaces de formar un gran número de células multipotenciales.

- Los términos "enriquecido", "enriquecimiento" o variaciones de los mismos se usan en la presente memoria para describir una población de células en que la proporción de un tipo celular particular o la proporción de una serie de tipos celulares particulares aumenta en comparación con la población no tratada.

- En una realización preferida de la presente invención, al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la población celular enriquecida total son células multipotenciales adultas que tienen el fenotipo TNAP+ y son capaces de unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.

- En otra realización, la población enriquecida de la invención comprende de aproximadamente 79 % a aproximadamente 99 %, más preferiblemente de aproximadamente 84 % a aproximadamente 94 % e incluso más preferiblemente aproximadamente 89,2 % de células que son CD45+.

En otra realización, la población enriquecida de la invención comprende menos de aproximadamente un 2 %, más preferiblemente menos de aproximadamente un 1 %, de células que son CD34+. En otra realización, la población enriquecida no comprende células que sean CD34+.

- 5 En otra realización, la población enriquecida de la invención comprende menos de aproximadamente un 6 %, más preferiblemente menos de aproximadamente un 3,5 % de células que son CC9+.

En una realización adicional, la población enriquecida de la invención comprende de aproximadamente 23 % a aproximadamente 3 %, más preferiblemente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 18 % e incluso más
10 preferiblemente aproximadamente un 13,2 % de células que son 3G5+.

En todavía una realización adicional, la población enriquecida de la invención comprende de aproximadamente 12 % a aproximadamente 3 %, más preferiblemente de aproximadamente 10 % a aproximadamente 6 % e incluso más
15 preferiblemente aproximadamente un 7,8 % de células que son STRO-1+.

En una realización adicional, una población celular enriquecida de la invención no se ha cultivado *in vitro*.

Además, en una realización preferida, la población celular enriquecida de la invención es capaz de dar lugar a UFC-
20 F clonogénicas.

En una realización, cultivar la población enriquecida de la invención da como resultado una mayor proporción de células que son STRO+ cuando se compara con células seleccionadas usando STRO-1 como marcador y cultivadas en las mismas condiciones. Preferiblemente, tal cultivo es durante aproximadamente 4 o aproximadamente 6 pases. Preferiblemente, las células se obtuvieron a partir de médula ósea.

25 En una realización adicional, cultivar la población enriquecida de la invención da como resultado un aumento del número de células de progenie que son STRO+ en comparación con la población celular de partida, por ejemplo después de 2, 4 o 6 pases. En comparación, cultivar células enriquecidas en STRO-1 da como resultado un número disminuido de células de progenie que son STRO+ cuando se compara con la población celular de partida
30 (seleccionada con STRO-1), por ejemplo después de 4 o 6 pases.

En otra realización, la población celular enriquecida es homogénea en células TNAP+.

Se divulgan células de progenie (a las que se hace referencia también en la presente memoria como células
35 expandidas) que se producen a partir del cultivo *in vitro* de células multipotenciales adultas de la invención. Las células expandidas pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pases y similares.

En una realización, tales células expandidas (al menos después de 5 pases) pueden ser TNAP-, CC9+, HLA de clase I+, HLA de clase II-, CD14-, CD19-, CD3-, CD11a-c, CD31-, CD86- y/o CD80-. Sin embargo, es posible que, en condiciones de cultivo diferentes a las descritas en la presente memoria, la expresión de los diferentes marcadores pueda variar. También, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población celular expandida, no significa que no haya una proporción minoritaria de las células que no tengan este fenotipo o fenotipos (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9-). En una realización preferida, las células
45 expandidas tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares.

En una realización, una población celular expandida comprende células donde al menos un 25 %, más preferiblemente al menos un 50 % de las células, son CC9+.

50 En otra realización, una población celular expandida comprende células donde al menos un 40 %, más preferiblemente al menos un 45 %, de las células son STRO-1+.

En una realización adicional, cultivar la población enriquecida de la invención da como resultado células multipotenciales adultas que pueden expresar también marcadores seleccionados de entre el grupo consistente en
55 LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R, (STRO-2= leptina-R), RANKL, STRO-1^{bright} y CD 146 o cualquier combinación de estos marcadores.

60 Se prefiere que una proporción significativa de las células multipotenciales adultas sea capaz de diferenciación en al menos dos tipos celulares comprometidos. Los ejemplos no limitantes de linajes con los que pueden estar

comprometidos las células multipotenciales adultas incluyen células precursoras óseas; progenitores hepatocíticos, que son pluripotentes para células epiteliales de conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que evolucionan hasta oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que evolucionan hasta neuronas; precursores de músculo cardíaco y cardiomiocitos y líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero sin limitación, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos y células precursoras de las siguientes: células epiteliales de pigmento retinal, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocíticas y oligodendrocíticas. En una realización preferida, las células multipotenciales adultas son al menos aptas para cultivarse *in vivo* o *in vitro* produciendo adipocitos, osteocitos y/o condrocitos.

En otra realización, las "células multipotenciales adultas" de la invención no son capaces de dar lugar, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

El término "adulto" se usa en su sentido más amplio para incluir un sujeto posnatal. En una realización preferida, el término "adulto" hace referencia a un sujeto que es pospuberal. El término "adulto", como se usa en la presente memoria, puede incluir también sangre de cordón tomada de una mujer. El término "adulto" no incluye células obtenidas de un embrión y/o feto. Por tanto, las "células multipotenciales adultas" de la invención pueden considerarse también como "células multipotenciales no embrionarias".

Cuando se hace referencia a una célula como "positiva" de un marcador dado, puede ser que tenga una expresión baja (lo o dim) o alta (bright, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia u otro color usado en el proceso de clasificación por color de las células. La distinción de lo (o dim o dull) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población celular particular que se está clasificando. Cuando se hace referencia en la presente memoria a una célula que es "negativa" de un marcador dado, no significa que el marcador no se exprese en absoluto en esa célula. Significa que el marcador se expresa a un nivel relativamente muy bajo por esa célula, y que genera una señal muy baja cuando se marca detectablemente.

El término "bright", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca detectablemente. Aunque no se desea limitarse a una teoría, se propone que las células "bright" expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una mayor señal de fluorescencia cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC, como se determina por análisis de FACS, que las células no bright (STRO-1^{dull/dim}). Preferiblemente, las células "bright" constituyen al menos aproximadamente un 0,1 % de las células mononucleares de médula ósea más fuertemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En otras realizaciones, las células "bright" constituyen al menos aproximadamente un 0,1 %, al menos aproximadamente un 0,5 %, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 1,5 % o al menos aproximadamente un 2 % de las células mononucleares de médula ósea marcadas fuertemente contenidas en la muestra de partida. En una realización preferida, las células STRO-1^{bright} tienen una expresión 2 órdenes de magnitud superior de expresión en superficie de STRO-1. Esto se calcula respecto al "fondo", a saber las células que son STRO-1⁻. En comparación, las células STRO-1^{dim} y/o STRO-1^{intermediate} tienen una expresión menos de 2 órdenes de magnitud mayor de expresión en superficie de STRO-1, típicamente 1 orden de magnitud o menos que el "fondo".

Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)

Cuando se usa en la presente memoria el término "TNAP", pretende abarcar todas las isoformas de la proteína. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En una realización preferida, la TNAP es BAP. En una realización particularmente preferida, la TNAP como se usa en la presente memoria hace referencia a una molécula que puede unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.

En el contexto de la presente invención, la TNAP es preferiblemente TNAP humana. Por ejemplo, la TNAP puede ser TNAP humana que comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Sin embargo, se entenderá que el término "TNAP" no está limitado a la secuencia humana, sino que incluye también secuencias homólogas obtenidas de cualquier fuente, por ejemplo homólogos, particularmente ortólogos (es decir,

homólogos obtenidos de especies distintas de seres humanos), variantes alélicas así como fragmentos y péptidos sintéticos o derivados los mismos como se discute a continuación.

Son ya conocidos una serie de ortólogos de TNAP e incluyen TNAP de ratón (SEQ ID NO:2) y TNAP de rata (SEQ ID NO:3).

En una realización preferida, es una secuencia homóloga una secuencia aminoacídica que es al menos un 70, 80 o 90 % idéntica, preferiblemente al menos un 95 o 98 % idéntica, a nivel de aminoácidos, sobre al menos 20, preferiblemente 50 o 100 aminoácidos, a una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

Aunque la homología puede considerarse también en la materia en términos de similitud (es decir, residuos aminoacídicos que tienen similares propiedades/funciones químicas), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia. El % de identidad de un polipéptido se determina por análisis FASTA (Pearson y Lipman, 1988) (programa GCG) usando los ajustes por defecto y una secuencia de consulta de al menos 50 aminoácidos de longitud, con lo que el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 250 aminoácidos. Incluso más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 350 aminoácidos.

Los términos "*variante*" o "*derivado*" con relación a las secuencias aminoacídicas y/o para uso en la presente memoria incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia, proporcionando una secuencia aminoacídica resultante que preferiblemente tiene al menos de 25 a 50 % de la actividad biológica de una TNAP de origen natural, más preferiblemente al menos sustancialmente la misma actividad. La actividad biológica relevante incluye la capacidad del variante o derivado de unirse a ligandos de TNAP naturales.

En general, se alteran preferiblemente menos de un 20 %, 10 % o 5 % de los residuos aminoacídicos de una variante o derivado en comparación con la región correspondiente de la TNAP de origen natural, siendo el porcentaje típicamente menor cuanto más corta es la secuencia aminoacídica, p.ej. menor de 5 % para secuencias aminoacídicas de 20 aminoácidos o menos.

El término "TNAP" abarca también fragmentos de los polipéptidos completos mencionados anteriormente y variantes de los mismos, incluyendo fragmentos de las secuencias presentadas en el listado de secuencias de la presente memoria. Los fragmentos preferidos incluyen aquellos que incluyen un epítipo. Los fragmentos adecuados será de al menos aproximadamente 6 o 7 aminoácidos de longitud, p.ej. de al menos 10, 12, 15 o 20 aminoácidos de longitud. Pueden ser también menores de 200, 100 o 50 aminoácidos de longitud. Los fragmentos polipeptídicos de los polipéptidos representados en el listado de secuencias y las variantes alélicas y de especie de los mismos pueden contener uno o más (p.ej. 2, 3, 5 o 10) sustituciones, delecciones o inserciones, incluyendo sustituciones conservadas. Cuando se han realizado sustituciones, delecciones y/o inserciones, por ejemplo mediante tecnología recombinante, se alteran preferiblemente menos de un 20 %, 10 % o 5 % de los residuos aminoacídicos representados en el listado de secuencias.

En una realización, el término TNAP no abarca AP placentaria.

Agentes de unión a TNAP

Quando se usa en la presente memoria, la frase "agente de unión a TNAP" hace referencia a un resto que reconoce y/o se une a TNAP.

Los agentes de unión a TNAP preferidos son polipéptidos o compuestos identificados por tener afinidad de unión por TNAP. Por ejemplo, la TNAP se ha caracterizado por tener un bucle de unión a colágeno (Mornet y col., 2001). Por consiguiente, el agente de TNAP puede ser colágeno, preferiblemente colágeno de tipo I.

Los agentes de unión a TNAP particularmente preferidos son anticuerpos anti-TNAP (de origen natural o recombinante, de cualquier fuente).

El término "anticuerpo" como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse al determinante epítipo. Estos fragmentos de anticuerpo retienen cierta capacidad de unirse selectivamente a su antígeno o receptor y se definen como sigue:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína, procurando una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

5 (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo, puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, procurando una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) (Fab')₂, el fragmento de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab)₂ es un dímero de los dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces
10 disulfuro;

(4) Fv, definido como un fragmento genomanipulado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y

(5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), definido como una molécula genomanipulada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, ligadas por un ligador polipeptídico adecuado en forma
15 de una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Los procedimientos de elaboración de estos fragmentos son conocidos en la materia. (Véase por ejemplo Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York (1988).

20 Los anticuerpos pueden prepararse usando células que expresan TNAP, TNAP completa o fragmentos de la misma como antígeno inmunizante. Un péptido usado para inmunizar un animal puede derivar de ADNc traducido o síntesis química y se purifica y conjuga con una proteína portadora, si se desea. Tales portadores usados comúnmente que se acoplan químicamente con el péptido incluyen hemocianina de lapa bocallave (KLH), tiroglobulina, seroalbúmina bovina (BSA) y toxoide del tétanos. El péptido acoplado puede usarse entonces para inmunizar el animal (p.ej., un
25 ratón o un conejo).

Si se desea, los anticuerpos policlonales pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por unión a y elución de una matriz a la que se une el péptido ante el que se crearon los anticuerpos. Los especialistas en la materia conocerán diversas técnicas comunes en la materia de la inmunología para la purificación y/o concentración de
30 anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (véase por ejemplo Coligan y col., *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991).

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo tales como, por ejemplo, la técnica de hibridoma, la
35 técnica de hibridoma de linfocitos B humanos y la técnica de hibridoma de EBV (Kohler y col., 1975; Kozbor y col., 1985; Cote y col., 1983; Cole y col., 1984).

Los procedimientos conocidos en la materia permiten también identificar anticuerpos que exhiben unión a TNAP y aislarlos de colecciones de expresión de anticuerpo.
40

Pueden identificarse anticuerpos con una especificidad epitópica que es la misma o similar a la del AcM STRO-3 por su capacidad de competir con ese AcM particular por la unión a TNAP (p.ej., a células portadoras de TNAP tales como MPC, o a proteína TNAP aislada o fragmentos de la misma). Usando receptores quiméricos (Rucker y col., 1996) u otras técnicas conocidas por los especialistas en la materia, puede cartografiarse el sitio de unión del AcM
45 STRO-3.

También es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que el AcM STRO-3 verificando si el primero previene que el último se una a TNAP. Si el anticuerpo monoclonal que se ensaya compete con el AcM STRO-3, como se muestra por una disminución de la unión por AcM
50 STRO-3, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o uno estrechamente relacionado.

Es todavía otro modo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad del AcM STRO-3 preincubar el anticuerpo monoclonal que se está ensayando con TNAP, y añadir entonces AcM STRO-3 para determinar si se inhibe la capacidad del AcM STRO-3 de unirse a TNAP. Si se inhibe la unión del AcM STRO-3, entonces, muy
55 probablemente, el anticuerpo monoclonal que se está ensayando tenga la misma especificidad epitópica, o funcionalmente equivalente, que el AcM STRO-3.

Los anticuerpos monoclonales pueden genomanipularse para cambiar el isotipo del anticuerpo. Por ejemplo, puede genomanipularse un isotipo IgG2A como un IgG1, IgG2B u otros isotipos.
60

Se apreciará que un agente de unión a TNAP tal como un anticuerpo puede estar conjugado con un compuesto que

- sea útil, por ejemplo, en separación celular, aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. En un ejemplo, se conjuga un anticuerpo de la invención con un marcaje. El marcaje puede ser cualquier entidad cuya presencia pueda detectarse fácilmente. Por ejemplo, el marcaje puede ser un marcaje directo, tal como los descritos con detalle en May y col., patente de EE.UU. n.º 5.656.503. Los marcajes directos son entidades que, en su estado natural, son fácilmente visibles a simple vista, o con la ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, p.ej. luz UV para promover la fluorescencia. Los ejemplos incluyen compuestos radiactivos, quimioluminiscentes, electroactivos (tales como marcajes rédox) y fluorescentes. Los marcajes particulados directos, tales como soles de tinte, soles metálicos (p.ej. oro) y partículas de látex coloreadas, son también muy adecuados, y se prefieren junto con los compuestos fluorescentes. De estas opciones, son las más preferidas las partículas de látex coloreadas y los compuestos fluorescentes. La concentración del marcaje en una zona o volumen pequeño debería dar lugar a una señal fácilmente detectable, p.ej. un área fuertemente coloreada. Pueden usarse también marcajes indirectos, tales como enzimas, p.ej. fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante, aunque estos requieren habitualmente la adición de uno o más reactivos de revelado tales como sustratos antes de poder detectar una señal visible.
- 15 La conjugación de un marcaje con un agente de unión tal como un anticuerpo de la invención puede ser mediante unión covalente o no covalente (incluyendo hidrófoba) o mediante adsorción. Las técnicas para tal conjugación son corrientes en la materia y pueden adaptarse fácilmente para los reactivos particulares empleados.

Un agente de unión para uso en los procedimientos divulgados en la presente memoria, tal como un anticuerpo divulgado en la presente memoria, puede estar también recubierto sobre un soporte sólido. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar recubierto sobre un material plástico sintético, partícula magnética, placa de ensayo de microvaloración, chip de micromatriz, perla de látex, filtro que comprende un material polimérico celulósico o sintético, portaobjetos de vidrio o plástico, varilla de medición, dispositivo de relleno capilar y similares.

Un agente de unión para uso en los procedimientos divulgados en la presente memoria, tal como un anticuerpo divulgado en la presente memoria, puede incorporarse también a un dispositivo para separación celular. Por ejemplo, el dispositivo puede ser un dispositivo de selección celular automatizada basada en la tecnología MACS. Tal dispositivo posibilita una selección celular por magnetismo a gran escala en un sistema cerrado y estéril. Por ejemplo, el dispositivo puede comprender un ordenador integrado, una unidad de separación por magnetismo, una bomba peristáltica y diversas válvulas de manguito. El ordenador integrado controla preferiblemente todos los componentes del instrumento y dirige el sistema a practicar procedimientos en una secuencia estándar. La unidad de separación por magnetismo incluye preferiblemente un imán permanente móvil y una montura para la columna de selección. La bomba peristáltica controla preferiblemente el caudal a través del conjunto de tuberías. Las válvulas de manguito pueden usarse para controlar el flujo de tampón y suspensión celular. Antes de la selección, se marcan magnéticamente las células usando un anticuerpo de la presente invención. Puede enlazarse entonces con el dispositivo un conjunto de tuberías de un solo uso y puede conectarse la bolsa de preparación de células, que contiene las células marcadas, con el conjunto de tuberías. Después de iniciar el programa de selección, el sistema aplica automáticamente la muestra celular a la columna de separación, practica una serie de etapas de lavado dependiendo del programa elegido y finalmente eluye las células diana purificadas.

40

Técnicas de clasificación celular

La capacidad de reconocer células multipotenciales adultas con agentes de unión a TNAP tales como anticuerpos anti-TNAP permite no solo la identificación y cuantificación de estas células en muestras de tejido, sino también su separación y enriquecimiento en suspensión. Esto puede conseguirse mediante una serie de técnicas de clasificación celular mediante las cuales se separan físicamente las células por referencia a una propiedad asociada al complejo de célula-anticuerpo, o un marcaje enlazado con el anticuerpo. Este marcaje puede ser una partícula magnética o una molécula fluorescente. Los anticuerpos pueden reticularse de tal modo que formen agregados de múltiples células, que son separables por su densidad. Como alternativa, los anticuerpos pueden enlazarse con una matriz estacionaria a la que se adhieren las células deseadas.

Son conocidos diversos procedimientos de separación de células unidas a anticuerpo de células no unidas. Por ejemplo, puede marcarse el anticuerpo unido a la célula (o un anticuerpo antiisotópico) y separarse entonces las células por un clasificador celular mecánico que detecta la presencia del marcaje. Los clasificadores celulares activados por fluorescencia son bien conocidos en la materia. En una realización, el anticuerpo anti-TNAP está enlazado con un soporte sólido. Son conocidos diversos soportes sólidos por los especialistas en la materia incluyendo, pero sin limitación perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibra hueca, polímeros y placas de Petri plásticas. Las células que están unidas por el anticuerpo pueden retirarse de la suspensión celular simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular.

60

Pueden usarse micropartículas superparamagnéticas para separaciones celulares. Por ejemplo, las micropartículas

pueden recubrirse con anticuerpos anti-TNAP. Las micropartículas superparamagnéticas marcadas con anticuerpo pueden incubarse entonces con una solución que contiene las células de interés. Las micropartículas se unen a las superficies de las células multipotenciales adultas deseadas, y estas células pueden recogerse entonces en un campo magnético.

5

En otro ejemplo, se deja entrar físicamente en contacto la muestra celular, por ejemplo, con un anticuerpo monoclonal anti-TNAP ligado a una fase sólida. La ligadura con fase sólida puede comprender, por ejemplo, adsorción de los anticuerpos en nitrocelulosa plástica u otra superficie. Los anticuerpos pueden adsorberse también sobre las paredes de poros grandes (suficientemente grandes para permitir la circulación de células) de una membrana de fibra hueca. Como alternativa, los anticuerpos pueden ligarse covalentemente con una superficie o perla, tal como macroperlas Sepharose 6 MB de Pharmacia. Las condiciones exactas y duración de la incubación de los anticuerpos ligados con fase sólida con la suspensión que contiene células multipotenciales adultas dependerán de varios factores específicos del sistema empleado. La selección de las condiciones apropiadas, sin embargo, está dentro de las habilidades del especialista en la materia.

10

15

Se eluyen entonces las células no unidas o se arrastran por lavado con tampón fisiológico después de dejar un tiempo suficiente para que se unan las células multipotenciales adultas. Las células no unidas pueden recuperarse y usarse para otros fines o desecharse después de realizar los ensayos apropiados para asegurar que se ha conseguido la separación deseada. Se separan entonces las células unidas de la fase sólida mediante cualquier procedimiento apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y el anticuerpo. Por ejemplo, las células unidas pueden eluirse de una placa Petri de plástico por agitación vigorosa. Como alternativa, las células unidas pueden eluirse por "corte" enzimático o digestión de una secuencia "espaciadora" sensible a enzima entre la fase sólida y el anticuerpo. Los espaciadores unidos a perlas de agarosa están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Pharmacia.

20

25

La fracción enriquecida eluida de células puede lavarse entonces con un tampón por centrifugación y puede criopreservarse dicha fracción enriquecida o la fracción no unida en un estado viable para uso posterior de acuerdo con tecnología convencional o introducirse en el receptor de trasplante.

30 **Producción de células modificadas genéticamente**

Se divulgan en la presente memoria células modificadas genéticamente, particularmente células multipotenciales adultas modificadas genéticamente. Preferiblemente, las células se modifican genéticamente para producir una proteína heteróloga. Típicamente, las células se modificarán genéticamente de tal modo que la proteína heteróloga se secrete de las células. Sin embargo, en una realización, las células pueden modificarse para expresar un polinucleótido que codifica una no proteína funcional tal como ARNbc (típicamente para silenciamiento de ARN), un oligonucleótido anticodificante o un ácido nucleico catalítico (tal como una ribozima o ADNzima).

35

Las células modificadas genéticamente pueden cultivarse en presencia de al menos una citocina en una cantidad suficiente para soportar el crecimiento de las células modificadas. Las células modificadas genéticamente así obtenidas pueden usarse inmediatamente (p.ej. en trasplante), cultivarse y expandirse *in vitro* o almacenarse para usos posteriores. Las células modificadas pueden almacenarse mediante procedimientos bien conocidos en la materia, p.ej. congeladas en nitrógeno líquido.

40

Modificación genética como se usa en la presente memoria abarca cualquier procedimiento de modificación genética que implique la introducción de un polinucleótido exógeno o extraño en una célula multipotencial adulta o la modificación de un gen endógeno en una célula multipotencial adulta. La modificación genética incluye, pero sin limitación, transducción (transferencia mediada por virus de ADN hospedador desde un hospedador o donante a un receptor, *in vitro* o *in vivo*), transfección (transformación de células con genomas de ADN vírico aislados), transferencia mediada por liposoma, electroporación, transfección con fosfato de calcio o coprecipitación y otras. Los procedimientos de transducción incluyen el cocultivo directo de células con células productoras (Bregni y col., 1992) o el cultivo con sobrenadante vírico solo con o sin factores de crecimiento y policlones apropiados (Xu y col., 1994).

45

50

Se introduce preferiblemente un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora en un vector. El vector incluye preferiblemente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Los procedimientos usados para construir tales vectores son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, se describen con detalle las técnicas para construir vectores de expresión adecuados en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (3ª Ed., 2000); y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999).

55

60

Los vectores pueden incluir, pero sin limitación, vectores víricos tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus simple; cósmidos; vectores de plásmido; vectores sintéticos y otros vehículos recombinantes usados típicamente en la materia. Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en que puede ligarse operativamente un polinucleótido son bien conocidos en la materia. Tales vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están comercialmente disponibles en fuentes tales como Stratagene (La Jolla, Calif.) y Promega Biotech (Madison, Wis.). Los ejemplos específicos incluyen pSG, pSV2CAT, pXtl de Stratagene y pMSG, pSVL, pBPV y pSVK3 de Pharmacia.

Los vectores preferidos incluyen vectores retrovíricos (véase Coffin y col., "Retroviruses", capítulo 9, pág. 437-473, Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1997). Los vectores útiles en la invención pueden producirse recombinantemente mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, los documentos WO94/29438, WO97/21824 y WO97/21825 describen la construcción de plásmidos de empaquetamiento retrovírico y líneas celulares de empaquetamiento. Los vectores ejemplares incluyen los vectores de expresión de mamífero pCMV, tales como pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp.), pSFFV-Neo y pBluescript-Sk+. Son ejemplos no limitantes de vectores retrovíricos útiles aquellos derivados de retrovirus de murino, ave o primate. Los vectores retrovíricos comunes incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (vector MoMLV). Otros vectores derivados de MoMLV incluyen Lmily, LINGFER, MINGFR y MINT. Los vectores adicionales incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia de gibón (GALV) y virus de sarcoma murino de Moloney (MOMSV) y el virus formador de focos en bazo (SFFV). Los vectores derivados del virus de citoblasto murino (MESV) incluyen MESV-MiLy. Los vectores retrovíricos incluyen también vectores basados en lentivirus, y los ejemplos no limitantes incluyen vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).

En la producción de constructos de vector retrovírico, pueden retirarse las secuencias gag, pol y env víricas del virus, creando espacio para la inserción de secuencias de ADN extraño. Los genes codificados por ADN extraño se expresan habitualmente bajo el control de un promotor vírico fuerte en la repetición terminal larga (LTR). La selección de las secuencias reguladoras de control apropiadas depende de la célula hospedadora usada y la selección está dentro de las habilidades del especialista en la materia. Son conocidos numerosos promotores además del promotor de la LTR. Los ejemplos no limitantes incluyen el promotor del fago lambda PL, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), el promotor de la región U3 del virus de sarcoma murino de Moloney (MMSV), virus de sarcoma de Rous (RSV) o virus formador de focos en bazo (SFFV); el promotor de granzima A y el promotor de granzima B. Pueden usarse adicionalmente elementos de control inducibles o múltiples. La selección de un promotor adecuado será evidente para aquellos especialistas en la materia.

Tal constructo puede empaquetarse en partículas víricas eficientemente si se proporcionan las funciones gag, pol y env en trans por una línea celular de empaquetamiento. Por lo tanto, cuando se introduce el constructo de vector en la célula de empaquetamiento, las proteínas gag-pol y env producidas por la célula se ensamblan con el ARN de vector produciendo viriones infecciosos que se secretan al medio de cultivo. El virus así producido puede infectar e integrarse en el ADN de la célula diana, pero no produce partículas víricas infecciosas puesto que carece de secuencias de empaquetamiento esenciales. La mayoría de las líneas celulares de empaquetamiento actualmente en uso se han transfectado con plásmidos separados, conteniendo cada uno una de las secuencias de codificación necesarias, de modo que son necesarios múltiples eventos de recombinación antes de poder producir un virus competente de replicación. Como alternativa, la línea celular de empaquetamiento alberga un provirus. El provirus se ha incapacitado de modo que, aunque puede producir todas las proteínas requeridas para ensamblar virus infecciosos, su propio ARN no puede empaquetarse en virus. En cambio, se empaqueta el ARN producido a partir del virus recombinante. Por lo tanto, la solución madre de virus liberada de las células de empaquetamiento contiene solo virus recombinantes. Los ejemplos no limitantes de líneas de empaquetamiento retrovíricas incluyen PA12, PA317, PE501, PG13, PSLCRIP, RDI 14, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6) y PT67. Se hace referencia a Miller y col., 1986; Miller y col., 1989; Danos y col., 1988; Pear y col., 1993 y Finer y col., 1994.

Otros vectores adecuados incluyen vectores adenovíricos (véanse Frey y col., 1998 y WO 95/27071) y vectores víricos adenoasociados. Estos vectores son todos bien conocidos en la materia, p.ej. como se describe en Chatterjee y col., 1996 y Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds. Quesenberry y col., John Wiley & Sons, 1998 y las patentes de EE.UU. nº 5.693.531 y 5.691.176). El uso de vectores derivados de adenovirus puede ser ventajoso en ciertas situaciones, porque no son capaces de infectar células no en división. Al contrario que el ADN retrovírico, el ADN adenovírico no se integra en el genoma de la célula diana. Además, la capacidad de portar ADN extraño es mucho mayor en vectores adenovíricos que vectores retrovíricos. Los vectores víricos adenoasociados son otro sistema de suministro útil. El ADN de este virus puede integrarse en células no en división y se han introducido exitosamente una serie de polinucleótidos en diferentes tipos celulares usando vectores víricos adenoasociados.

En algunas realizaciones, el constructo o vector incluirá dos o más secuencias polinucleotídicas heterólogas. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico adicional es un polinucleótido que codifica un marcador selectivo, un

gen estructural, un gen terapéutico o un gen de citocina/quimiocina.

Puede incluirse un marcador selectivo en el constructo o vector con fines de monitorizar la modificación genética exitosa y para la selección de células en que se ha integrado el ADN. Los ejemplos no limitantes incluyen marcadores de resistencia a fármacos, tales como G148 o higromicina. Puede usarse selección negativa adicionalmente, por ejemplo donde el marcador es el gen HSV-tk. Este gen hará a las células sensibles a agentes tales como aciclovir y ganciclovir. El gen NeoR (resistencia a neomicina/G148) se usa comúnmente, pero puede usarse cualquier gen marcador conveniente cuyas secuencias génicas no estén ya presentes en la célula diana. Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR), proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen bacteriano hisD, CD24 de murino (HSA), CD8a(lyt) de murino, genes bacterianos que confieren resistencia a puromicina o fleomicina y β -galactosidasa.

La secuencia o secuencias polinucleotídicas adicionales pueden introducirse en la célula hospedadora en el mismo vector o pueden introducirse en las células hospedadoras en un segundo vector. En una realización preferida, se incluirá un marcador selectivo en el mismo vector que el polinucleótido.

Se divulga en la presente memoria la modificación genética de la región promotora de un gen endógeno de tal modo que la expresión del gen endógeno se regule positivamente, dando como resultado una producción aumentada de la proteína codificada en comparación con células multipotenciales adultas de tipo silvestre.

Administración de factores estimulantes

Los procedimientos de la presente invención pueden implicar el uso de uno o más factores estimulantes. Además, las composiciones de la invención pueden comprender uno o más factores estimulantes.

En una realización, un procedimiento de la invención puede implicar administrar uno o más factores estimulantes tales como $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1,25D$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina- 1β (IL- 1β) y factor derivado de estroma 1α (SDF- 1α) por vía tópica, sistémica o local, tal como en un implante o dispositivo.

En realizaciones particulares, puede ser un intervalo preferido de factores estimulantes 0,1 nM-0,1 M, 0,1 nM-0,05 M, 0,05 nM-15 μ M o 0,01 nM-10 μ M. Ha de señalarse que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección para aliviar. Para cualquier sujeto particular, pueden ajustarse regímenes de dosificación específicos con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son solo ejemplares y no limitan los intervalos de dosificación que pueden seleccionarse por facultativos médicos.

La cantidad de factor estimulante en la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de unidad de dosificación" como se usa en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias a los sujetos para tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

Se apreciará que el factor estimulante puede administrarse en forma de una composición que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye todos y cada uno los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. En una realización, el portador es adecuado para administración parenteral. Como alternativa, el portador puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que un medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones

farmacéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

- Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral pueden incluir liposomas. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro o portadores que son especialmente útiles para fármacos hidrófobos. Dependiendo de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales de estabilización de proteína. Además, puede administrarse el fármaco en un sistema de suministro de fármaco orientado, por ejemplo en un liposoma recubierto con anticuerpo específico de diana. Los liposomas se unirán a la proteína diana y se captarán selectivamente por la célula que exprese la proteína diana.
- 10 Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, el factor estimulante puede administrarse en una formulación de liberación con el tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico-poliglicólico (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los especialistas en la materia.

Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de factores estimulantes en forma de suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácido graso sintético tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se usan para inyección pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

35 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante incorporación del compuesto activo, en la cantidad requerida, al disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente enumerados, según sea necesario, seguida de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución previamente esterilizada por filtración. De acuerdo con un aspecto alternativo de la invención, el factor estimulante puede formularse con uno o más compuestos adicionales que potencien su solubilidad.

45 Si las composiciones son para administrar por inhalación, pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverizador en aerosol a partir de paquetes a presión o un nebulizador; junto con el uso de un propelente adecuado, p.ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de gelatina, por ejemplo para uso en un inhalador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como almidón o lactosa.

Composiciones celulares

55 Las composiciones celulares de la presente invención, tales como aquellas que comprenden células multipotenciales adultas, son útiles para la regeneración de tejido de diversos tipos, incluyendo hueso, cartílago, tendón, ligamento, músculo, piel y otro tejido conectivo así como tejidos nervioso, cardíaco, hepático, pulmonar, renal, pancreático, cerebral y de otros órganos.

60 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en combinación con

una matriz apropiada, por ejemplo para soportar las células y proporcionar una superficie para el crecimiento de hueso, cartílago, músculo, nervio, epidermis y/u otro tejido conectivo. La matriz puede estar en forma de biomateriales de matriz tradicionales. La matriz puede proporcionar una liberación lenta de células y/o el entorno apropiado para la presentación de las mismas. En algunas realizaciones, se espera que diversas proteínas colagenosas y no colagenosas estén reguladas positivamente y secretadas por las células. Este fenómeno acelera la regeneración de tejido al potenciar la deposición de matriz. Las proteínas de matriz pueden expresarse también en células genomanipuladas y potenciar el injerto y adhesión de las células trasplantadas en el área de trasplante.

La elección del material de matriz está basada en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones de base celular definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatito, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Matrices adicionales comprenden proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos anteriormente mencionados de material, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. Puede alterarse la composición de biocerámicas, tal como en aluminato-fosfato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

Las composiciones celulares de la invención pueden usarse para tratar pacientes que requieran la reparación o reemplazo de tejido de cartílago o hueso como resultado de enfermedad o traumatismo o insuficiencia del tejido para desarrollarse normalmente, o para proporcionar una función cosmética, tal como acrecentar los rasgos faciales u otros del cuerpo. Los tratamientos pueden conllevar el uso de las células de la invención para producir nuevo tejido de cartílago o tejido óseo. Por ejemplo, pueden usarse composiciones que comprenden células precursoras indiferenciadas o inducidas a la diferenciación condrogénica para tratar una afección de cartílago, por ejemplo artritis reumatoide o artrosis o una lesión traumática o quirúrgica del cartílago. Como otro ejemplo, pueden usarse composiciones que comprenden células precursoras óseas para tratar afecciones óseas, incluyendo enfermedades óseas metabólicas y no metabólicas. Los ejemplos de afecciones óseas incluyen desgarros de menisco, fusión espinal, retirada de disco espinal, reconstrucción espinal, fracturas óseas, deformación ósea/espinal, osteosarcoma, mieloma, displasia ósea, escoliosis, osteoporosis, enfermedad periodontal, pérdida de hueso dental, osteomalacia, raquitismo, osteítis fibrosa, distrofia ósea renal y enfermedad de Paget del hueso.

Las composiciones celulares de la invención pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, otras células multipotentes o pluripotentes o condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, citoblastos o células de médula ósea. Pueden mezclarse células de diferentes tipos con una composición de la invención inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un periodo de tiempo previamente a la administración.

Las composiciones celulares de la invención pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas (factores de crecimiento, factores tróficos) beneficiosos. Cuando se administran las células multipotenciales adultas con otros agentes, pueden administrarse conjuntamente en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente a los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (p.ej., EPO, mimeticuerpos de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (p.ej., inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMÚS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; p.ej., TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (p.ej., inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina, tacrolimús; inhibidores de mTOR (p.ej., SIROLIMÚS, EVEROLIMÚS); antiproliferativos (p.ej., azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (p.ej., prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (p.ej., basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (p.ej., anti-globulina de timocito (ATG); anti-globulina de linfocito (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (p.ej., heparina, derivados de heparina, urocina, PPACK (dextrofenilalanina, prolina, arginina, clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptor de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (p.ej., probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína) así como anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden coadministrarse con un factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.827.735.

En una realización, se administran las composiciones celulares de la invención en forma de células indiferenciadas, es decir, como se cultivan en medio de crecimiento. Como alternativa, las composiciones celulares pueden administrarse después de exposición en cultivo a condiciones que estimulen la diferenciación hacia un fenotipo deseado, por ejemplo un fenotipo osteogénico.

5

Las composiciones celulares de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, suministrarse (p.ej., mediante un catéter o jeringa) o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio necesitado de reparación o acrecentamiento. Las células pueden administrarse mediante una matriz (p.ej., un andamiaje tridimensional). Las células pueden administrarse con portadores farmacéuticamente aceptables convencionales.

10 Las vías de administración de las células de la invención o composiciones o componentes (p.ej., MEC, lisado celular, medio acondicionado) de las mismas incluyen administración intramuscular, oftálmica, parenteral (incluyendo intravenosa), intraarterial, subcutánea, oral y nasal. Las vías particulares de administración parenteral incluyen, pero sin limitación, la vías de administración intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o periespinal.

15

Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una localización precisa del cuerpo es típicamente un medio adecuado de administración. Las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, sin embargo, pueden administrarse en una localización más general (p.ej., a lo largo de un área afectada difusamente, por ejemplo) de la cual migran a una localización particular, p.ej. respondiendo a

20 señales químicas.

Otras realizaciones abarcan procedimientos de tratamiento mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares (p.ej., lisados celulares o componentes de los mismos) productos (p.ej., matriz extracelular, factores tróficos y otros biológicos producidos mediante modificación genética).

25

Las formas y regímenes de dosificación para administrar las composiciones celulares descritas en la presente memoria se desarrollan de acuerdo con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la afección del paciente individual, p.ej. la naturaleza y extensión de la afección que se esté tratando, la edad, sexo, peso corporal y estado médico general, y otros factores conocidos por los facultativos médicos. Por tanto, se determina la cantidad efectiva de una composición farmacéutica para administrar a un paciente mediante estas consideraciones como es conocido en la materia.

30

En algunas realizaciones de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir un paciente previamente al inicio de la terapia con composiciones celulares de la presente invención. Por consiguiente, el trasplante con células multipotenciales adultas alogénicas, o incluso xenogénicas, puede tolerarse en algunos aspectos.

35

Sin embargo, en otros aspectos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente un paciente previamente al inicio de la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse suministrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células adultas multipotenciales pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y a factores terapéuticos, pero la célula es impermeable a factores humorales inmunitarios y células. Preferiblemente, el encapsulante es hipoalergénico, se sitúa fácil y establemente en un tejido diana y proporciona una protección añadida a la estructura implantada. Son conocidos en la materia estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria ante las células trasplantadas. Como alternativa, las células multipotenciales adultas pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

45

Puede determinarse la supervivencia de células trasplantadas en un paciente vivo mediante el uso de una variedad de técnicas de exploración, p.ej. exploraciones por tomografía axial computerizada (TAC), imagenología de resonancia magnética (IRM) o tomografía de emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante puede hacerse también post mortem retirando el tejido diana y examinándolo visualmente o mediante un microscopio. Como alternativa, las células pueden tratarse con tintes que sean específicos de células de un linaje específico. Las células trasplantadas pueden identificarse también mediante la incorporación previa de tintes trazadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, azul Fast, bisbenzamida, micropartículas férricas o productos génicos indicadores introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

50

55

La integración funcional de células trasplantadas a un sujeto puede valorarse examinando la restauración de la función que estaba dañada o afectada, por ejemplo, la restauración de la función articular u ósea o el acrecentamiento de la función.

60

Las composiciones celulares de la invención pueden incluir uno o más factores bioactivos, por ejemplo pero sin limitación, un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia celular tal como un inhibidor de caspasa o un agente antiinflamatorio tal como inhibidor de cinasa p38.

- 5 Como alternativa, las células para trasplantar pueden genomanipularse para expresar tales factores de crecimiento, antioxidantes, agentes antiapoptóticos o agentes antiinflamatorios.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de células, matriz extracelular o lisado celular de las mismas, o medio acondicionado de las mismas en un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables para las células de la invención incluyen sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas adecuadas que no reaccionan nocivamente con las células de la invención o composiciones o componentes de las mismas. En la medida en que sean biocompatibles, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (tal como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácido graso, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorantes. Los portadores farmacéuticos adecuados para uso en la presente invención son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences* (17^a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa.) y WO 96/05309.

20 Pueden añadirse uno o más de otros componentes a células trasplantadas, incluyendo componentes de matriz extracelular seleccionados tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la materia y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos. Como alternativa, las células de la invención pueden genomanipularse para expresar y producir factores de crecimiento. Se proporcionan en la presente memoria detalles de la genomanipulación de las células de la invención.

En una realización no limitante, se prepara una formulación que comprende las células de la invención para administración directamente al sitio donde se desea la producción de nuevo tejido, tal como tejido óseo. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células pueden suspenderse en una solución de hidrogel para inyección. Los ejemplos de hidrogeles adecuados para uso en la invención incluyen péptidos autoensamblantes tales como RAD16. Como alternativa, la solución de hidrogel que contiene las células puede dejarse endurecer, por ejemplo en un molde, formando una matriz que tiene células dispersadas en la misma previamente a la implantación. O, una vez se endurece la matriz, pueden cultivarse las formaciones celulares de modo que las células se expandan mitóticamente previamente a la implantación. El hidrogel es un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno creando una estructura de rejilla abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua formando un gel. Los ejemplos de materiales que pueden usarse para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales de los mismos, péptidos, polifosfazina y poliácridatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el soporte de las células es biodegradable.

En algunas realizaciones de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ*, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth y col., 2002 y Wang y col., 2003.

45 En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones acuosas de alcohol que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Son ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes los poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados tales como poliestireno sulfonado. Pueden usarse también copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formado por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de viniléter. Son ejemplos de grupos ácidos grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenado (preferiblemente fluorado), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

55 Los ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinilpiridina), poli(vinilimidazol) y algunos polifosfazenos sustituidos con imino. La sal de amonio o cuaternaria de los polímeros puede formarse también a partir de los nitrógenos del esqueleto o grupos imino pendientes. Son ejemplos de grupos laterales básicos los grupos amino e imino.

60 El alginato puede reticularse iónicamente con cationes divalentes en agua, a temperatura ambiente, formando una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones suaves, el alginato ha sido el polímero más comúnmente usado para

encapsulación de células de hibridoma, como se describe por ejemplo en la patente de EE.UU. nº 4.352.883 de Lim. En el proceso de Lim, se suspende una solución acuosa que contiene los materiales biológicos para encapsular en una solución de un polímero hidrosoluble, se conforma la suspensión en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes y se reticula entonces la superficie de las microcápsulas con 5 poliaminoácidos, formando una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

Los polifosfazenos son polímeros con esqueletos consistentes en nitrógeno y fósforo separados por enlaces sencillos y dobles alternados. Cada átomo de fósforo está unido covalentemente a dos cadenas laterales.

- 10 Los polifosfazenos adecuados para reticulación tienen una mayoría de grupos de cadena lateral que son ácidos y son capaces de formar puentes salinos con cationes divalentes o trivalentes. Son ejemplos de grupos laterales ácidos grupos ácido carboxílico y grupos ácido sulfónico. Los polifosfazenos hidrolíticamente estables están formados por monómeros que tienen grupos laterales ácido carboxílico que se reticulan por cationes divalentes o trivalentes tales como Ca^{2+} o Al^{3+} . Pueden sintetizarse polímeros que se degradan por hidrólisis incorporando 15 monómeros que tienen grupos laterales imidazol, éster de aminoácido o glicerol. Por ejemplo, puede sintetizarse un poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfazeno (PCPP) que se reticula con cationes multivalentes disueltos en medios acuosos a temperatura ambiente o por debajo, formando matrices de hidrogel.

Los polifosfazenos biodegradables tienen al menos dos tipos diferentes de cadenas laterales, grupos laterales ácidos capaces de formar puentes salinos con cationes multivalentes y grupos laterales que hidrolizan en condiciones *in vivo*, p.ej., grupos imidazol, ésteres de aminoácido, glicerol y glucosilo.

La hidrólisis de la cadena lateral da como resultado la erosión del polímero. Son ejemplos de cadenas laterales hidrolizantes imidazoles no sustituidos y sustituidos y ésteres de aminoácido en que el grupo está unido al átomo de 25 fósforo a través de una ligadura amino (los polímeros de polifosfazeno en que ambos grupos R están enlazados de esta manera son conocidos como poliaminofosfazenos). Para los poliimidazolfosfazenos, algunos de los grupos "R" en el esqueleto de polifosfazeno son anillos de imidazol, enlazados con el fósforo en el esqueleto a través de un átomo de nitrógeno de anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no participan en la hidrólisis, tales como grupos metilfenoxi u otros grupos mostrados en el artículo científico de Allcock y col. (1977). Son conocidos en 30 la materia procedimientos de síntesis de los materiales de hidrogel, así como procedimientos para preparar tales hidrogel.

Pueden incluirse también otros componentes en la formulación incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de los siguientes: (1) tampones para proporcionar pH e isotonicidad apropiados; (2) lubricantes; (3) materiales viscosos 35 para retener las células en o cerca del sitio de administración incluyendo, por ejemplo, alginatos, agares y gomas vegetales y (4) otros tipos celulares que pueden producir un efecto deseado en el sitio de administración tales como, por ejemplo, potenciación o modificación de la formación de tejido o sus características fisicoquímicas, o como soporte para la viabilidad de las células, o inhibición de la inflamación o del rechazo. Las células pueden cubrirse con una cobertura de herida apropiada para prevenir que las células abandonen el sitio. Tales coberturas de herida 40 son conocidas por los especialistas en la materia.

Cola de fibrina

Las colas de fibrina son una clase de sellantes quirúrgicos que se han usado en diversos ambientes quirúrgicos. 45 Como será consciente el destinatario especialista, son útiles numerosos sellantes en las composiciones de la invención.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "cola de fibrina" hace referencia a la matriz insoluble formada por la reticulación de polímeros de fibrina en presencia de iones de calcio. La cola de fibrina puede formarse a partir de 50 fibrinógeno, o un derivado o metabolito del mismo, fibrina (monómeros o polímeros solubles) y/o complejos de la misma derivados de tejido o fluido biológico que forma una matriz de fibrina. Como alternativa, la cola de fibrina puede formarse a partir de fibrinógeno, o un derivado o metabolito del mismo, o fibrina, producida por tecnología de ADN recombinante.

55 La cola de fibrina puede formarse también mediante la interacción de fibrinógeno y un catalizador de la formación de cola de fibrina (tal como trombina y/o factor XIII). Como se apreciará por los especialistas en la materia, el fibrinógeno se escinde proteolíticamente en presencia de un catalizador (tal como trombina) y se convierte en un monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina pueden formar entonces polímeros que pueden reticular, formando una matriz de cola de fibrina. La reticulación de los polímeros de fibrina puede potenciarse por la presencia de un 60 catalizador tal como factor XIII. El catalizador de la formación de cola de fibrina puede derivar de plasma sanguíneo, crioprecipitado u otras fracciones plasmáticas que contienen fibrinógeno o trombina. Como alternativa, el catalizador

puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante.

La tasa a la que se forma el coágulo depende de la concentración de trombina mezclada con fibrinógeno. Al ser una reacción dependiente de enzima, cuanto mayor es la temperatura (hasta 37 °C) más rápida es la tasa de formación de coágulo. La resistencia a la tracción del coágulo depende de la concentración de fibrinógeno usada.

Se describen el uso de cola de fibrina y procedimientos para su preparación por Hirsh y col. en la patente de EE.UU. n.º 5.643.192. Hirsh divulga la extracción de los componentes fibrinógeno y trombina de un solo donante, y la combinación de solo estos componentes para uso como cola de fibrina. Marx, patente de EE.UU. n.º 5.651.982, describe otra preparación y procedimiento de uso de cola de fibrina. Marx proporciona una cola de fibrina con liposomas para uso como sellante tópico en mamíferos. La preparación y uso de un complejo de fibrinógeno tópico (CFT) para la curación de heridas son conocidos en el campo. La publicación PCT n.º PCT/LTS95/15876 y la publicación PCT n.º WO96/17633, de la Cruz Roja Americana, discuten preparaciones de CFT que contienen fibrinógeno, trombina y cloruro de calcio, por ejemplo, en las páginas 16-18 de la publicación PCT n.º WO96/17633.

Varias publicaciones describen el uso de cola de fibrina para el suministro de agentes terapéuticos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.983.393 divulga una composición para uso como inserto intravaginal que comprende agarosa, agar, solución salina, glicosaminoglicanos, colágeno, fibrina y una enzima. Además, la patente de EE.UU. 3.089.815 divulga una preparación farmacéutica inyectable compuesta por fibrinógeno y trombina y la patente de EE.UU. 6.468.527 divulga una cola de fibrina que facilita el suministro de diversos agentes biológicos y no biológicos a sitios específicos en el cuerpo.

Formulación de un parche de tejido óseo

El cultivo o cocultivo de células de la invención en un pocillo preconformado posibilita la fabricación de un parche de tejido de grosor y volumen predeterminados. El volumen del parche de tejido resultante depende del volumen de pocillo y del número de células multipotenciales adultas en el pocillo. El tejido de volumen predeterminado óptimo puede prepararse por experimentación rutinaria alterando cualquiera o ambos de los parámetros anteriormente mencionados.

La superficie en contacto con la célula del pocillo puede recubrirse con una molécula contraria a la adhesión de células multipotenciales adultas a la superficie en contacto con la célula. Los reactivos de recubrimiento preferidos incluyen reactivos basados en silicona, es decir, reactivos basados en diclorodimetilsilano o politetrafluoroetileno, es decir TEFLÓN. Los procedimientos para recubrir materiales con reactivos basados en silicona, específicamente diclorodimetilsilano, son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se aprecia que otros reactivos biocompatibles que previenen la adhesión de células con la superficie del pocillo puedan ser útiles en la práctica de la presente invención.

Como alternativa, el pocillo puede fundirse de un material biocompatible maleable o moldeable que no permita la adhesión de células per se. Los materiales preferidos que previenen tal adhesión celular incluyen, pero sin limitación, agarosa, vidrio, plástico de cultivo celular no tratado y politetrafluoroetileno, es decir TEFLÓN. Están comercialmente disponibles plásticos de cultivo celular no tratados, es decir plásticos que no se han tratado con ni están compuestos por materiales que tienen una carga electrostática, y pueden adquirirse, por ejemplo, en Falcon Labware, Becton-Dickinson, Lincoln Park, N.J. Sin embargo, no se pretende que los materiales anteriormente mencionados sean limitantes. Se aprecia que puede ser útil en la práctica de la presente invención cualquier otro material biocompatible maleable o moldeable inherentemente contrario a la adhesión de células multipotenciales adultas.

Las células de la invención en suspensión pueden sembrarse y cultivarse en el pocillo preconformado. Las células pueden inducirse a diferenciar en un fenotipo condrogénico u osteogénico en cultivo en el pocillo o pueden haberse inducido a diferenciar previamente a la siembra en el pocillo. Las células pueden diluirse por la adición de medio de cultivo a una densidad celular de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^9 células por mililitro.

Las células pueden formar un tapón cohesivo de células. El tapón cohesivo de células puede retirarse del pocillo e implantarse quirúrgicamente en el defecto de tejido. Se prevé que cualquier célula indiferenciada, tal como células multipotenciales adultas de la invención, pueda diferenciarse *in situ* formando así tejido *in vivo*.

Los defectos óseos pueden identificarse por inferencia usando tomografía informatizada (exploración por TAC); examen de rayos X, imagenología de resonancia magnética (IRM), análisis de fluido sinovial o marcadores séricos o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la materia. Los defectos en mamíferos son también fácilmente

identificables visualmente durante el examen artroscópico o durante la cirugía abierta de la articulación. El tratamiento de los defectos puede efectuarse durante un procedimiento artroscópico o quirúrgico abierto usando los procedimientos y composiciones divulgados en la presente memoria.

- 5 Por consiguiente, una vez se ha identificado el defecto, puede tratarse el defecto mediante las siguientes etapas de (1) implantar quirúrgicamente en el sitio predeterminado un parche de tejido preparado mediante las metodologías descritas en la presente memoria y (2) permitir al parche de tejido integrarse en el sitio predeterminado.

El parche de tejido tiene óptimamente un tamaño y una forma tales que, cuando el parche se implanta en el defecto, los bordes del tejido implantado entran en contacto directo con los bordes del defecto. Además, el parche de tejido puede fijarse en su lugar durante el procedimiento quirúrgico. Esto puede efectuarse por fijación quirúrgica del parche en el defecto con suturas biodegradables y/o aplicando un bioadhesivo a la región de interfase del parche y el defecto.

- 15 En algunos aspectos, el tejido dañado puede extirparse quirúrgicamente previamente a la implantación del parche de tejido.

Trasplante de células usando andamiajes

- 20 Las composiciones celulares de la invención o cocultivos de las mismas pueden sembrarse sobre o en un andamiaje tridimensional e implantarse *in vivo*, donde las células sembradas proliferarán en el armazón y formarán un tejido de reemplazo, tal como tejido óseo, *in vivo* en cooperación con las células del paciente.

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el andamiaje puede diseñarse de tal modo que la estructura de andamiaje: (1) soporte las células sembradas sin degradación posterior; (2) soporte las células desde el momento de la siembra hasta que se remodela el trasplante de tejido por el tejido hospedador; (2) permita adherirse a las células sembradas, proliferar y desarrollarse hasta una estructura de tejido que tenga suficiente integridad mecánica para soportarse a sí misma *in vitro*, en cuyo punto se degrada el andamiaje. Se proporciona una revisión del diseño de andamiaje por Hutmacher (2001).

- 30 Los andamiajes de la invención pueden administrarse en combinación con uno o cualquiera o más factores de crecimiento, células, por ejemplo citoblastos, células de médula ósea, condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo o sus precursores, fármacos u otros componentes descritos anteriormente que estimulen la formación de tejido o potencien o mejoren de otro modo la práctica de la invención. Las células de la invención para sembrar sobre los andamiajes pueden genomanipularse para expresar factores de crecimiento o fármacos.

Las células de la invención pueden usarse para producir tejido nuevo *in vitro*, que puede implantarse entonces o insertarse de otro modo en un sitio que requiera reparación, reemplazo o acrecentamiento de tejido en un paciente.

- 40 En una realización no limitante, las células de la invención se usan para producir un constructo de tejido tridimensional *in vitro* que se implanta entonces *in vivo*. Como ejemplo de la producción de constructos de tejido tridimensionales, véase la patente de EE.UU. n° 4.963.489. Por ejemplo, las células de la invención pueden inocularse o "sembrarse" sobre un armazón o andamiaje tridimensional y proliferar o crecer *in vitro*, formando un tejido vivo que puede implantarse *in vivo*.

Las células de la invención pueden crecer libremente en un recipiente de cultivo hasta subconfluencia o confluencia, sacarse del cultivo e inocularse sobre un armazón tridimensional. La inoculación del armazón tridimensional con una alta concentración de células, p.ej. aproximadamente 10^6 a 5×10^7 células por mililitro, dará como resultado el establecimiento del soporte tridimensional en periodos relativamente más cortos de tiempo.

Los ejemplos de andamiajes que pueden usarse en la presente invención incluyen alfombrillas no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblantes. Las alfombrillas no tejidas, por ejemplo, pueden formarse usando fibras que comprenden un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA) vendido con el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Las espumas, compuestas por ejemplo por copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico)(PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como liofilización o liofilizadas como se discute en la patente de EE.UU. n° 6.355.699, son también andamiajes posibles. Pueden usarse también hidrogeles tales como péptidos autoensamblantes (p.ej., RAD16). Estos materiales se usan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido.

- 60 El armazón tridimensional puede estar compuesto por materiales cerámicos incluyendo, pero sin limitación, fosfato

de mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri y tetra-calcio, hidroxiapatito, fluoroapatitos, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de magnesio y calcio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS (Universidad de Florida, Gainesville, Fla.) y mezclas de los mismos. Existe una serie de materiales cerámicos biocompatibles porosos adecuados actualmente disponibles en el mercado comercial tales como

5 SURGIBON (Unilab Surgibone, Inc., Canadá), ENDOBON (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS (Mathys, A. G., Bettlach, Suiza) e INTERPORE (Interpore, Irvine, Calif., Estados Unidos), y productos de injerto óseo de colágeno mineralizado tales como HEALOS (Orquest, Inc., Mountain View, Calif.) y VITOSS, RHAKOSS, y CORTOSS (Orthovita, Malvern, Pa.). El armazón puede ser una mezcla, combinación o material compuesto de

10 realizaciones preferidas, el andamiaje está en forma de una jaula. En una realización preferida, el andamiaje está recubierto con colágeno.

De acuerdo con una realización preferida, el armazón es un fieltro que puede estar compuesto por un hilo multifilamento compuesto por un material bioabsorbible, p.ej. copolímeros o combinaciones de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico. El hilo se transforma en un fieltro usando técnicas de procesamiento textil estándares consistentes

15 en ondulado, corte, cardado y punción.

En otra realización preferida, se siembran las células de la invención sobre andamiajes de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, el armazón tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como la de la porción externa de una oreja, un hueso, articulación u otra estructura específica en el cuerpo para reparar,

20 reemplazar o acrecentar.

En otra realización preferida, se siembran las células sobre un armazón que comprende un dispositivo protésico para implantación en un paciente, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.200.606. Como se describe en la misma, se han desarrollado una variedad de dispositivos protésicos clínicamente útiles para uso en procedimientos

25 de injerto de hueso y cartílago (véase, p.ej. Bone Grafts and Bone Substitutions. Ed. M. B. Habal & A. H. Reddi, W. B. Saunders Co., 1992). Por ejemplo, se han usado y continúan usándose ampliamente en el entorno clínico dispositivos de reemplazo de rodilla y cadera efectivos. Muchos de estos dispositivos se fabrican usando una variedad de materiales inorgánicos que tienen baja actividad inmunogénica, que funcionan con seguridad en el cuerpo. Los ejemplos de materiales sintéticos que se han intentado y probado incluyen aleaciones de titanio, fosfato

30 de calcio, hidroxiapatito cerámico y una variedad de aleaciones de acero inoxidable y cobalto-cromo. Estos materiales proporcionan soporte estructural y pueden formar un andamiaje en que pueden ocurrir vascularización del hospedador y migración celular.

El armazón puede tratarse previamente a la inoculación de las células de la invención para potenciar la adhesión

35 celular. Por ejemplo, previamente a la inoculación con las células de la invención, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. Podría tratarse similarmente el poliestireno usando ácido sulfúrico.

Además, las superficies externas del armazón tridimensional pueden modificarse para mejorar la adhesión o

40 crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como por recubrimiento plasmático del armazón o adición de una o más proteínas (p.ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p.ej., sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratina) una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros.

En algunas realizaciones, el andamiaje comprende o se trata con materiales que lo vuelven no trombogénico. Estos

45 tratamientos y materiales pueden promover y mantener también el crecimiento endotelial, migración y deposición en matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitación, materiales naturales tales como proteínas de membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos

50 tales como ePTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). Estos materiales pueden tratarse además para volver el andamiaje no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes antitrombóticos tales como heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material tales como recubrimiento plasmático.

En algunas realizaciones, la superficie del andamiaje está texturada. Por ejemplo, en algunos aspectos de la

55 invención, el andamiaje se proporciona con un patrón de surcos y rebordes. Los surcos son preferiblemente menores de aproximadamente 500 micrómetros, más preferiblemente menores de aproximadamente 100 micrómetros y lo más preferiblemente entre aproximadamente 10 nanómetros y 10 micrómetros. Tales "microsurcos" permiten a las células alinearse y/o migrar guiadas por los surcos de superficie.

En algunas realizaciones, es importante recrear en cultivo el microentorno celular encontrado *in vivo*, de tal modo

60

que puede variar la medida en que las células de la invención crecen antes de la implantación *in vivo* o el uso *in vitro*. Además, pueden añadirse al medio de cultivo factores de crecimiento, agentes inductores de la diferenciación condrogénica, agentes inductores osteogénicos y factores angiogénicos previamente a, durante o después de la inoculación de las células para desencadenar la diferenciación y formación de tejido por las células o progenie de las mismas.

El armazón tridimensional puede modificarse de modo que se potencie el crecimiento de las células y la producción de tejido en las mismas, o de modo que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por tanto, pueden añadirse al armazón uno o más compuestos biológicamente activos incluyendo, pero sin limitación antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

15

Ejemplo 1: Generación del AcM STRO-3

Materiales y procedimientos

20 *Cultivos de MPC humanas*

Se establecieron cultivos estromales esencialmente como se describe previamente (Gronthos y col., 2003). El uso de células de médula ósea (MO) normales para estos estudios se aprobó por el Comité de ética humana del Hospital Royal Adelaide, Australia. Después de lavar tres veces con "HHF" (solución salina tamponada de Hanks (HBSS) suplementada con HEPES 20 mM y 5 % de FCS), se resuspendieron $1-5 \times 10^7$ células mononucleares de médula ósea (BMMNC) en 10 ml de la modificación alfa de medio de Eagles (α -MEM: Flow Laboratories, Irvine, Escocia) suplementado con ácido fólico (0,01 mg/ml), mioinositol (0,4 mg/ml) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), 2-mercaptoetanol 50 mM/l, succinato de hidrocortisona de sodio 1 mM/l (Sigma), 12,5 % de FCS y 12,5 % de suero equino (CSL, Melbourne, Australia) y se cultivaron en matraces de 25 cm² (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Tras el desarrollo de una capa estromal confluyente, se despegaron las células usando tripsina-EDTA al 0,05 % (p/v) en PBS (Gibco) y se sembraron en el mismo medio a aproximadamente $1-2 \times 10^4$ células por cm² en 2 matraces de cultivo de tejido de 75 cm² (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ).

35 Resultados y discusión

Se generó un panel de anticuerpos monoclonales de ratón reactivos con MPC humanas después de la fusión de esplenocitos derivados de ratones inmunizados con células estromales de MO humanas cultivadas. Se diseñaron los cribados preliminares para identificar AcM que reaccionen con células óseas humanas normales (NHBC) y MPC, pero que exhiban una reactividad limitada con la mayoría de BMMNC. Se seleccionó inicialmente un AcM, STRO-3, para análisis adicional debido a su patrón único de reactividad con diferentes líneas celulares. Se aislaron clones terciarios del hibridoma STRO-3 por dilución limitante en placas de 96 pocillos y se cribaron posteriormente como se describe anteriormente. Se resumen en la Tabla 1 los patrones de distribución de STRO-3 con diversos tipos celulares estromales. El AcM STRO-3 exhibía reactividad con una proporción de NHBC y MPC y con solo una proporción minoritaria de BMMNC. Se determinó que el isotipo de inmunoglobulina de STRO-3 de sobrenadantes de hibridoma terciario era IgG₁ usando un kit de detección de isotipo (Roche).

Tabla 1: Inmunorreactividad de sobrenadantes de STRO-3 de hibridomas clonados terciarios en diferentes tipos celulares usando inmunofluorescencia *in situ* como se describe en los procedimientos.

| Tipo celular | Tinción con inmunofluorescencia <i>in situ</i> |
|---|--|
| Células mononucleares de sangre periférica | NS |
| Células mononucleares de médula ósea | +/- (neutrófilos) |
| MPC expandidas <i>ex vivo</i> | +/- |
| Células óseas humanas normales cultivadas | ++/- |
| Fibroblastos de prepucio humano | +/- |
| Células endoteliales de vena umbilical humana | NS |
| Línea estromal de médula ósea de murino BMS2 | NS |
| Línea celular de osteosarcoma humano SAOS-2 | ++ |
| Línea celular de osteosarcoma humano MG63 | NS |

| | |
|---|----|
| Línea celular de osteosarcoma humano HOS | ++ |
| (+) Tinción de baja fluorescencia en todas las células | |
| (++) Tinción de alta fluorescencia en todas las células | |
| (NS) Sin tinción de fluorescencia en las células | |
| (+/-), (++)/- Tinción de fluorescencia en una subpoblación de células | |

Ejemplo 2: Caracterización molecular del antígeno de STRO-3

Materiales y procedimientos

5

Clonación de expresión de ADNc que codifica al antígeno de STRO-3

Se aisló el ADNc que codifica el antígeno de superficie celular identificado por el AcM STRO-3 a partir de una colección de ADNc de células estromales de médula ósea humana en el vector retrovítico pRUFneo como se describe en (Zannettino y col., 1996). Brevemente, se clonó el ADNc sintetizado a partir de ARNm a partir de cultivos de HBMSC en el vector retrovítico pRUFneo. Se usó ADN de plásmido de la colección para transfectar una línea de empaquetamiento vírico (PA317). Se usó sobrenadante que contiene virus de estas células para infectar la línea celular de empaquetamiento ψ 2, que a su vez se usó para infectar la línea celular dependiente de factor de murino BAF-3. Se seleccionaron las células infectadas por resistencia a G418, se marcaron con anticuerpo STRO-3 y se aislaron las células que se unen específicamente por selección de perlas inmunomagnéticas (Dynabead, Dynal, Oslo, Suecia). Después de la expansión de las células seleccionadas inicialmente en cultivo, se repitió la selección por perlas inmunomagnéticas dos veces más. Las células BAF-3 que demostraron unión específica de anticuerpo STRO-3 (aproximadamente un 60 %) se purificaron por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y se aislaron los clones después del cultivo en medios semisólidos como previamente (Zannettino y col., 1996). Para recuperar los insertos de ADNc provírico correspondientes al antígeno de STRO-3, se practicó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos retrovíticos en ADN genómico preparado a partir de tres clones de BAF-3 que expresan STRO-3 como se describe previamente (Zannettino y col., 1996).

Secuenciación parcial de clones de ADNc rescatados por PCR y análisis informático:

25

Como se describe previamente (Zannettino y col., 1996), se purificaron en gel los clones de ADNc generados por PCR y se subclonaron en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI) como se recomienda por el fabricante. Se preparó ADN bicatenario por el procedimiento "mini-prep" de lisis alcalina estándar (kit miniprep de Qiagen) y se usaron 1-2 μ g por reacción de secuenciación. Se prepararon las reacciones usando el kit de secuenciación Ready Reaction Cycle PRISM™ (Applied Biosystem, Foster City, CA) como se recomienda por el fabricante. Se realizaron reacciones que analizan ambas hebras de ADNc en un analizador de secuencia automatizado Applied Biosystems 373 y se obtuvieron rutinariamente 500-600 pb de datos de secuencia 5' y 3' por clon. Se analizaron entonces los datos de secuencia por acceso a la bases de datos Genbank y European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en el National Centre for Biotechnological Information (NCBI).

35

Reclonación del clon de ADNc de antígeno de STRO-3 en pRUFneo y validación de la expresión del antígeno de superficie

Después de la recuperación por PCR de insertos de ADNc províricos a partir de ADN genómico, se utilizaron los sitios de restricción Bam HI y Xho I únicos presentes en las regiones flanqueantes 5' y 3', respectivamente, para "reclonar" el ADNc en el MCS del vector retrovítico pRUFneo. Se transformaron células *E. coli* DH10B y se aisló ADN de plásmido usando columnas Qiagen-tip 100 (Qiagen, Victoria, Australia) como se recomienda por el fabricante. Se produjeron líneas celulares productoras del virus ψ 2 resistentes a G418 y estables por transfección con fosfato de calcio y se usaron para infectar células BAF-3 por cocultivo, como se describe previamente (Zannettino y col., 1996). Se analizó entonces en las células FDC-P1 resistentes a G418 la expresión de antígeno por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR-TI)

Se preparó ARN celular total a partir de clones de células BAF-3 de antígeno de STRO-3 usando el procedimiento de extracción RNazolB (Biotech Lab. Inc., Houston, TX) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó entonces ARN aislado de cada subpoblación como molde para la síntesis de ADNc, preparado usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se valoró la expresión de la isoforma ósea y hepática/renal de transcritos de ALP por amplificación por PCR usando un protocolo estándar como se describe previamente (Gronthos y col., 1999). Los conjuntos de cebadores de fosfatasa alcalina usados en este estudio se han descrito previamente (Sato y col., 1994). Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de

reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se valoró la integridad del ARN mediante la expresión de GAPDH (Gronthos y col., 1999).

Resultados y discusión

5 Usando una estrategia de colección de expresión retroviral liderada por el laboratorio de los inventores, se identificó posteriormente el gen que codifica la proteína identificada por el AcM STRO-3 (Zannettino y col., 1996). Brevemente, se infectó la línea celular de murino BAF-3 con partículas retrovirales construidas a partir de una colección de ADNc derivados de MPC humanas cultivadas. Se aislaron los clones de BAF-3 reactivos con STRO-3 mediante selección
10 con perlas inmunomagnéticas usando perlas magnéticas de IgG de oveja anti-ratón.

Como se muestra en la Figura 1, se encontró por análisis citométrico de flujo que las células que se recuperaron después de varias rondas de selección de perlas expresan el antígeno de STRO-3 a niveles apreciables. Se prepararon posteriormente clones de células BAF-3 que expresan STRO-3 sembrando el agrupamiento de células
15 seleccionadas con perlas inmunomagnéticas a baja densidad en metilcelulosa semisólida, como se describe en los procedimientos. Se aisló entonces una selección aleatoria de colonias de BAF-3 y se expandió en cultivo líquido suplementado con IL-3 de murino y G418. Se expandieron entonces en cultivo clones seleccionados que demuestran una alta reactividad con STRO-3 y se preparó el ADN genómico como se describe en los procedimientos. Se rescataron posteriormente los insertos de ADNc del provirus por amplificación por PCR de largo
20 alcance como se describe previamente (Zannettino y col., 1996).

Se muestra en la Figura 2 la amplificación por PCR de un clon representativo de STRO-3. Después de electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, se purificaron en gel los productos de PCR correspondientes de tres clones diferentes usando un kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, EE.UU.) y se
25 clonaron en el vector pGEM-T como se recomienda por el fabricante. Se derivó la secuencia nucleotídica de los productos de PCR por secuenciación con el kit de secuenciación PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, EE.UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se realizaron las reacciones en un analizador de secuencia automatizado Applied Biosystems 373 y se obtuvieron varios cientos de pares de bases de datos de secuencia de ácido nucleico para cada clon. Se compararon las
30 secuencias nucleotídicas parciales resultantes con las entradas remitidas a las bases de datos Genbank/EMBL a través de análisis de alineamiento FASTA estándar. Se dan las secuencias de ADN parciales para ambos antígenos (Figuras 3). Las comparaciones con las secuencias en la base de datos EMBL/Genbank combinada identificaron al antígeno de STRO-3 como correspondiente a la forma ósea/hepática/renal de fosfatasa alcalina, a saber TNAP.

35 Se obtuvo posteriormente la confirmación independiente de la especificidad del AcM STRO-3 después de inmunofluorescencia y análisis citométrico de flujo de clones de BAF-3 que expresan TNAP con los anticuerpos específicos de fosfatasa alcalina B4-78 y 50 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa), que reconocen un epítipo conservado entre cada una de las isoformas ósea, hepática y renal de ALP (Figura 4).

40 Además, el AcM B4-50 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa), que se había mostrado previamente que era específico de la enzima AP ósea, exhibía también inmunoreactividad con los transfectantes de TNAP. En contraposición, no se observó reactividad detectable después de la tinción de los transfectantes de TNAP con el AcM 8B6 (DAKO), que identifica un epítipo presente en solo el antígeno de AP placentaria humana. Además, se encontró que las células BAF-3 retransfectadas con el inserto de ADNc de TNAP-BAF-3 expresan una forma
45 activa de fosfatasa alcalina, como se demuestra por la reactividad positiva en presencia del sustrato fosfatasa alcalina (Figura 5). El análisis de PCR usando cebadores específicos de las formas ósea y hepática de fosfatasa alcalina (Sato y col., 1994) identificaba a los transcritos como específicos de hueso (Figura 6).

Ejemplo 3: Detección inmunohistoquímica de TNAP por el AcM STRO-3 en secciones de trefina de MO.

50 Materiales y procedimientos

Se cortaron secciones de 5 micrómetros de hueso posnatal normal embebido en parafina sobre portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltriethoxisilano y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena por incubación con H₂O₂
55 al 3 %/metanol. Se practicó entonces la recuperación de antígeno por microondas en presencia de tampón de EDTA 1 mM, pH 8,0. Se dejaron enfriar los portaobjetos a 40 °C y se bloqueó la unión no específica incubando secciones con suero equino normal al 3 % durante 1 h a TA. Se incubaron entonces los portaobjetos durante una noche con un AcM de control no de unión de isotipo coincidente (1B5, IgG₁) o el AcM STRO-3. Se reveló el anticuerpo unido usando un procedimiento de inmunoperoxidasa de tres etapas (Gronthos y col., 2000; Gronthos y col., 2003) en que se incubaron secuencialmente los portaobjetos con (a) anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP purificado
60 por afinidad (Dako, Botany, NSW, Australia), seguido de (b) inmunoglobulina de cerdo anti-cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Tago, Burlingame, CA, EE.UU.) y (c) peróxido de hidrógeno como sustrato y

aminoetilcarbazol (AEC, Sigma, St. Louis, MO) como tinte. Se contratiñeron brevemente los portaobjetos con solución de hematoxilina y se montaron en Gurr Aquamount (BDH, Poole, RU).

Resultados y discusión

5 Se valoró la inmunorreactividad del AcM STRO-3 en secciones de revelado de médula ósea derivadas de miembro humano de 55 días de edad. No se observó tinción en el periostio ni en el cartílago (Figura 7). Sin embargo, había una notable expresión de TNAP en las células mesenquimáticas de los espacios de médula ósea, regiones perivasculares y en la interfase de la región de placa de crecimiento.

Ejemplo 4: Aislamiento de células de médula ósea humana usando el AcM STRO-3

Se recoge médula ósea (MO) de voluntarios adultos normales sanos (20-35 años de edad) de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Comité ético institucional del Hospital Royal Adelaide. Brevemente, se aspiran 40 ml de MO de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de litio-heparina. Se preparan BMMNC mediante separación por gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) como se describe previamente (Zannettino y col., 1998). Después de centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, se retira la capa leucocítica con una pipeta de transferencia y se lava 3 veces con "HHF" compuesto por solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene un 5 % de suero fetal de ternero (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

Se aislaron posteriormente las TNAP+ por clasificación celular activada por magnetismo como se describe previamente (Gronthos y col., 2003; Gronthos y col., 1995). Brevemente, se incuban aproximadamente 1-3 x 10⁸ BMMNC en tampón de bloqueo, consistente en suero de conejo normal al 10 % (v/v) en HHF durante 20 minutos en hielo. Se incuban las células con 200 µl de una solución 10 µg/ml de AcM STRO-3 en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Se lavan posteriormente las células dos veces con HHF por centrifugación a 400 x g. Se añade una dilución 1/50 de γ-biotina de cabra anti-ratón (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) en tampón HHF y se incuban las células durante 1 hora en hielo. Se lavan las células dos veces con tampón de MACS (PBS exento de Ca²⁺ y Mn²⁺ suplementado con 1 % de BSA, EDTA 5 mM y 0,01 % de azida de sodio) como anteriormente y se resuspenden en un volumen final de 0,9 ml de tampón de MACS.

Se añaden 100 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuban en hielo durante 15 minutos. Se lava la suspensión celular dos veces, se resuspende en 0,5 ml de tampón de MACS, se carga posteriormente en una columna mini MACS (columnas de MS, Miltenyi Biotec) y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón de MACS para recuperar las células que no se unen al AcM STRO-3. Después de la adición de 1 ml adicional de tampón de MACS, se retira la columna del imán y se aíslan las células positivas de TNAP por presión positiva. Puede teñirse una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y valorarse la pureza por citometría de flujo. Se encontró que el AcM STRO-3 identifica una subpoblación minoritaria de BMMNC (<1 %).

Se establecen cultivos primarios de las células TNAP+ aisladas por MACS sembrando en α-MEM suplementado con 20 % de suero fetal de ternero, L-glutamina 2 mM y L-ascorbato-2-fosfato 100 µM como se describe previamente (Gronthos y col., 1995).

Ejemplo 5: Las células de médula ósea humana seleccionadas con el AcM STRO-3 dan lugar a UFC-F

Materiales y procedimientos

Clasificación celular activada por magnetismo (MACS)

50 Para evaluar el potencial de crecimiento de UFC-F de células TNAP+, se usó la clasificación MACS para separar células TNAP+ y TNAP- de la médula ósea. Esto se practicó generalmente como se describe previamente (Gronthos y Simmons, 1995; Gronthos y col., 2003), pero usando el AcM STRO-3. Brevemente, se incubaron aproximadamente 1-3 x 10⁸ células mononucleares de médula ósea humana normales con sobrenadante de STRO-3, anti-IgG-biotina, microperlas de estreptavidina y finalmente estreptavidina-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) antes de separar en una columna magnética Mini MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)

60 Se examinó también la capacidad de crecimiento de UFC-F en células seleccionadas con STRO-3 clasificadas

basándose en la expresión +ve o -ve de STRO-1.

Se practicó esto como se describe previamente (Gronthos y Simmons, 1995; Gronthos y col., 2003). Brevemente, se incubaron secuencialmente $1-3 \times 10^8$ células mononucleares de médula ósea humanas normales con sobrenadante de STRO-1, anti-IgM-biotina, microperlas de estreptavidina y finalmente estreptavidina-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) antes de separar en una columna magnética Mini MACS (Milteny Biotec Inc., Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Se marcaron las células aisladas por MACS STRO-1⁺ con FITC conjugado con estreptavidina y se incubaron entonces con AcM STRO-3 purificado o 1B5 de control isotípico (10 µg/ml) durante 30 minutos en hielo, se lavaron y se incubaron con anticuerpo de IgG de cabra anti-ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (1/50; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) durante 20 minutos adicionales en hielo. Se clasificaron las células usando un citómetro de flujo FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Se cultivaron las células STRO-1^{bri}/STRO-3⁺ o STRO-1^{bri}/STRO-3⁻ en modificación alfa de medio de Eagle suplementado con 20 % de suero fetal de ternero, L-glutamina 2 mM, ascorbato-2-fosfato (100 µM), iniciando el cultivo primario en 5 % de CO₂ a 37 °C de atmósfera humidificada.

Resultados y discusión

Se diseñaron los experimentos para examinar el potencial de uso del AcM STRO-3 como reactivo único para el aislamiento de células con crecimiento de UFC-F (Figura 8). El aislamiento por MACS basado en la expresión de TNAP reveló que las UFC-F clonogénicas se detectaban solo en la fracción de BMMNC TNAP⁺.

Dado que el de STRO-3 (IgG₁) es un isotipo diferente al de STRO-1 (IgM), se valoró la capacidad de STRO-3 de identificar UFC-F clonogénicas mediante análisis FACS de dos colores basado en su coexpresión con células STRO-1⁺ aisladas usando el procedimiento de MACS (Figura 9). El AcM STRO-3 demostraba un patrón de unión único, reaccionando con un subconjunto de la fracción de BMMNC STRO-1⁺ que expresaban el antígeno de STRO-1 a altos niveles (fracción STRO-1^{bright}), aislando y enriqueciendo efectivamente la población de MPC (Tabla 2). Además, el AcM STRO-3 no conseguía reaccionar con citoblastos hematopoyéticos CD34 positivos en aspirados de médula ósea adulta humana (datos no mostrados).

Tabla 2: Enriquecimiento de células de médula ósea humanas por análisis FACS de color dual basado en la coexpresión de los marcadores de superficie celular STRO-1 y TNAP (con referencia a la Figura 9). Se cultivaron células clasificadas por FACS en condiciones clonogénicas estándares en alfa-MEM suplementado con 20 % de FCS. Los datos representan el número medio de células formadoras de colonias (UFC-F) el día 14 por 10^5 células sembradas ± EE (n= 3 aspirados de médula ósea diferentes). Estos datos sugieren que las MPC humanas están exclusivamente restringidas a la fracción TNAP⁺ de MO que coexpresa el antígeno de STRO-1 fuertemente.

| Fracción de médula ósea | Frecuencia de UFC-F/ 10^5 células | Enriquecimiento (aumento en veces) |
|---|-------------------------------------|------------------------------------|
| BMMNC no fraccionadas | 11,0 ± 2,2 | 1,0 |
| TNAP ⁺ /STRO-1 ^{bright} | 4.511 ± 185 | 410 |
| TNAP ⁺ /STRO-1 ^{dull/int} | 0,0 | 0,0 |

Ejemplo 6: Fenotipo de células seleccionadas con AcM STRO-3 antes y después de la expansión en cultivo

Materiales y procedimientos

Se practicó la citometría de flujo de un color esencialmente como se describe por Gronthos y col. (1999). Brevemente, se liberaron cultivos de células en cada pase por tripsina/EDTA y se incubaron posteriormente durante 30 min en hielo en tampón de bloqueo. Se lavaron aproximadamente 1×10^5 células como se describe anteriormente y se resuspendieron en 200 µl de anticuerpo o anticuerpos primarios durante 1 h en hielo. El anticuerpo primario consistía en concentraciones saturantes del anticuerpo monoclonal de IgM de ratón STRO-1 y/o se usaron un anticuerpo monoclonal de IgG de ratón contra CC9 humana y STRO-3. Otros anticuerpos usados incluían AcM que se unen a CD45, CD34 y 3G5.

Se trataron los AcM de control negativo de IgM e IgG isotípicos de ratón en condiciones idénticas. Después de lavar las células, se añadieron un segundo o segundos marcajes a un volumen final de 100 µl consistentes en la cadena µ de IgM de cabra anti-ratón específica de FITC (dilución 1/50) e IgG γ de cabra anti-ratón específica de PE (dilución 1/50) o Ig anti-conejo específica de PE (dilución 1/50) (Southern Biotechnology Associates). Se incubaron las células

durante 45 min en hielo, se lavaron dos veces y se fijaron con FACS FIX (PBS suplementado con 1 % (v/v), 2 % (p/v) de D-glucosa y 0,01 % de azida de sodio). Se analizaron entonces las células en un citómetro de flujo Epics®-XL-MCL (Beckman Coulter, Hialeah, FL). El histograma de gráfico de puntos representa 5×10^4 eventos recogidos como datos en modo de lista.

5

Resultados y discusión

Como puede verse en la Figura 10, la inmunoselección de células mononucleares de médula ósea humana usando un AcM STRO-3 marcado magnéticamente da como resultado el aislamiento de una población de células caracterizadas por altos niveles de expresión TNAP y el antígeno de superficie CD45 (Figura 10), con aproximadamente un 90 % de las células TNAP+ que coexpresan CD45. En contraposición, menos de un 1 % de las células enriquecidas en TNAP+ aisladas usando el AcM STRO3 expresaban el marcador de citoblastos hematopoyéticos CD34. Además, no más del 5 % de las células TNAP+ enriquecidas usando procedimientos de la invención coexpresaban ninguno de los marcadores usados previamente para aislar MPC, incluyendo STRO-1, CC9/CD146 y 3G5.

Después de la expansión en cultivo, las células TNAP+ enriquecidas usando procedimientos de la invención demostraban un fenotipo estable que difería de las células enriquecidas y recién aisladas, Figura 11. Se encontró que las células seleccionadas con STRO-3 expandidas en cultivo en pases tanto tempranos (pase 2) como tardíos (pase 5) expresaban niveles homogéneamente altos de CC9/CD146 y moléculas de HLA de clase I, pero eran uniformemente negativas de CD45, HLA de clase II, CD14, CD19, CD3, CD11a-c, CD31, CD86 y CD80. Sorprendentemente, aunque la expresión en superficie de TNAP como se detectaba por el AcM STRO-3 era uniformemente positiva en los pases de cultivo tempranos (pase 2), esta era negativa en pases de cultivo tardíos (pase 5).

20

En contraposición con la pérdida progresiva de reactividad por STRO-3 después de la expansión en cultivo, estas células TNAP+ enriquecidas por selección con STRO-3 demostraban un aumento progresivo de la expresión en superficie del antígeno de STRO-1, Figuras 11 y 13. En el pase 2, aproximadamente un 84 % de las células eran positivas de STRO-1 en comparación con el control isotípico de IgM, y aproximadamente la mitad (52 %) expresaba STRO-1 fuertemente (como se define por una expresión mayor en 2 órdenes de magnitud de la expresión en superficie de STRO-1 que las células negativas de STRO-1). En el pase 5, aunque la mayoría de células seguían siendo positivas de STRO-1 (aprox. 69 %), una menor proporción de células expresaban STRO-1 fuertemente (aprox. 21 %). Esto indica que el cultivo inicial de células TNAP+ seleccionadas con STRO-3 da como resultado la regulación positiva del antígeno de STRO-1, reflejando presuntamente la proliferación sin diferenciación espontánea, mientras que el cultivo continuo da como resultado la regulación negativa de la densidad de antígeno de STRO-1 de expresión fuerte a intermedia.

En notable contraposición, la inmunoselección de células mononucleares de médula ósea humana usando un AcM STRO-1 marcado magnéticamente da como resultado el aislamiento de una población de células caracterizadas por una alta expresión de STRO-1 (aproximadamente 50 %) y la ausencia de expresión de CD45 (Figura 12) y WO/2004/085630). A pesar de este alto nivel de expresión inicial de STRO-1, la expansión en cultivo de células seleccionadas con STRO-1 da como resultado una disminución progresiva de la expresión de STRO-1 en los pases 4 a 6. Estos niveles reducidos de STRO-1 después de expansión en cultivo se reducen significativamente respecto tanto a la población de partida como de las células enriquecidas TNAP+ expandidas en cultivo por selección con STRO-3 en los mismos pases 4 a 6 (Figura 11).

En conjunto, estos resultados muestran que la población enriquecida en TNAP+ por selección con STRO-3 es distinta de la población enriquecida en STRO-1+ en términos de características fenotípicas, tanto cuando se aíslan inicialmente recientes como después de expansión por cultivo.

50

Ejemplo 7: Diferenciación de células TNAP+. Adipogénesis

Materiales y procedimientos

Procedimiento de ensayo adipogénico

Preparación del medio de inducción adipogénico: El medio de inducción adipogénico debería usarse una vez las células se han vuelto 100 % confluentes (aproximadamente 5-13 días). Preparar el medio antes de que las células se vuelvan confluentes.

60

1. Descontaminar las superficies externas del medio de inducción adipogénico (PT-3102B) y de los siguientes

SingleQuots® con etanol o isopropanol al 70 % v/v:

- a. h-Insulina (recombinante)
 - b. L-Glutamina
 - c. MCGS
 - 5 d. Dexametasona
 - e. Indometacina
 - f. IBMX (3-isobutil-1-metilxantina)
 - g. Pen/Strep
- 10 2. Abrir asépticamente los SingleQuots anteriores y añadir los contenidos de 175 ml de medio de inducción adipogénico.
3. Aclarar cada vial de SingleQuot con el medio.
- 15 4. Usar medio suplementado para la inducción adipogénica de células solo. Almacenar a 2 a 8 °C en la oscuridad hasta que sea necesario.

Preparar medio de mantenimiento adipogénico como sigue:

- 20 1. Descontaminar las superficies externas del medio de inducción adipogénico (PT-3102A) y de los siguientes SingleQuots® con etanol o isopropanol al 70 % v/v:
- a. h-Insulina (recombinante)
 - b. L-Glutamina
 - c. MCGS
 - 25 d. Pen/Strep
2. Abrir asépticamente los SingleQuots anteriores y añadir los contenidos de 175 ml de medio de mantenimiento adipogénico.
- 30 3. Aclarar cada vial de SingleQuot con el medio.
4. Almacenar el medio de mantenimiento adipogénico suplementado a 2 a 8 °C en la oscuridad hasta que sea necesario.
- 35 Protocolo de cultivo de adipogénesis:
1. Sembrar $2,1 \times 10^4$ células seleccionadas con el AcM STRO-3 por cm^2 de área de superficie de cultivo de tejido en 0,2 a 0,3 ml de MSCGM por cm^2 de área superficial de cultivo de tejido. Por ejemplo: 2×10^5 células en 2 ml de medio por pocillo de $9,6 \text{ cm}^2$ de una placa de 6 pocillos. Incubar las células a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO_2 .
 - 40 2. Alimentar las células cada 2-3 días reemplazando completamente el medio por MSCGM reciente hasta que los cultivos alcanzan la confluencia (5-13 días). Las células deben ser confluentes o posconfluentes para una diferenciación adipogénica óptima.
 3. A 100 % de confluencia, tres ciclos de inducción/mantenimiento estimularán una diferenciación adipogénica
 - 45 óptima. Cada ciclo consiste en alimentar las células con medio de inducción de la adipogénesis suplementado y cultivar durante 3 días (37 °C, 5 % de CO_2), seguido de 1-3 días de cultivo en medio de mantenimiento adipogénico suplementado. Alimentar las células de control no inducidas con solo medio de mantenimiento adipogénico suplementado con el mismo calendario. Las células adipogénicas son delicadas y debería tenerse cuidado para evitar romper las numerosas vacuolas lipídicas en las células. No dejar que las células se sequen al cambiar el
 - 50 medio.
 4. Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, cultivar las células durante 7 días más en medio de mantenimiento adipogénico suplementado, reemplazando el medio cada 2-3 días.
 5. La medida de la diferenciación adipogénica puede señalarse por observación microscópica de las vacuolas lipídicas en las células inducidas. Para documentar la diferenciación adipogénica, los cultivos pueden teñirse con
 - 55 AdipoRed. Las células no inducidas tendrán pocas, o ninguna, vacuolas lipídicas.
 6. Los cultivos de células no fijadas pueden usarse para ensayos que requieran adipocitos.

Ensayo AdipoRed™ para adipogénesis in vitro

- 60 Protocolo para placas de 6, 12, 24 y 48 pocillos:

1. Sembrar células a 30.000/cm² y cultivar y diferenciar las células como se describe anteriormente, usando volúmenes apropiados de medios de cultivo celular.
2. Inmediatamente antes del ensayo, aclarar cada placa con PBS y añadir AdipoRed, usando los volúmenes de la Tabla 3.

5

Tabla 3: Volúmenes para el ensayo *AdipoRed*TM

| | Volumen de aclarado/pocillo | Volumen final de PBS/pocillo | Volumen de AdipoRed/pocillo |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Placa de 6 pocillos | 2 ml | 5 ml | 140 µl |
| Placa de 12 pocillos | 1 ml | 2 ml | 60 µl |
| Placa de 24 pocillos | 1 ml | 1 ml | 30 µl |
| Placa de 48 pocillos | 0,4 ml | 0,4 ml | 12 µl |
| Placa de 96 pocillos | 0,2 ml | 0,2 ml | 5 µl |

3. Después de la adición de AdipoRed, se obtiene el mejor mezclado del reactivo pipeteando un 50 % de los contenidos de cada pocillo fuera y dentro dos veces (tres veces para placas de 6 pocillos). Es importante obtener una dispersión homogénea del reactivo AdipoRed azul. Mucho cuidado con no tocar con la punta de la pipeta la monocapa celular o retirar células de la superficie del pocillo.
4. Después de 10 minutos, disponer la placa en el fluorímetro y medir la fluorescencia con excitación a 485 nm y emisión a 572 nm. Si el fluorímetro no tiene los filtros apropiados, pueden usarse los ajustes usados para el fluoróforo fluoresceína común (excitación 485 nm; emisión 535).

15

Resultados y discusión

Se ensayó en dos lotes de células la capacidad diferenciativa. Se marcaron las amp de las células:

| | |
|---------------|---------------|
| 2242A | 2070C |
| P.2o | P.2o |
| ~30E6 células | ~30E6 células |
| 02NOV2005 | 08NOV2005 |

- 20 Los resultados se proporcionan en la Figura 14 y muestran que las células seleccionadas con el AcM STRO-3 son capaces de diferenciarse en adipocitos.

Ejemplo 8: Diferenciación de células TNAP+. Osteogénesis

25 Materiales y procedimientos

Procedimiento de ensayo osteogénico

Preparar medio de inducción osteogénico como sigue:

30

1. Descontaminar las superficies externas del medio basal de diferenciación osteogénico y de los siguientes SingleQuots con etanol o isopropanol al 70 % v/v:

35

- a. Dexametasona
- b. L-Glutamina
- c. Ascorbato
- d. Pen/Strep
- e. MCGS
- f. β-Glicerofosfato

40

2. Abrir asépticamente los SingleQuots anteriores y añadir los contenidos a los 185 ml de medio basal de diferenciación osteogénico.

3. Aclarar cada vial de SingleQuot con el medio.

4. Almacenar el medio de diferenciación osteogénico suplementado a 2 a 8 °C en la oscuridad hasta ser necesario.

Protocolo de cultivo de osteogénesis:

- 5 1. Sembrar $3,1 \times 10^3$ células seleccionadas con el AcM STRO-3 por cm^2 de área de superficie de cultivo de tejido en 0,2-0,3 ml de MSCGM por cm^2 de área de cultivo de tejido. Por ejemplo: 3×10^4 células en 2 ml de medio por pocillo de $9,6 \text{ cm}^2$ de una placa de 6 pocillos.
2. Dejar adherir las células a la superficie de cultivo durante 4 a 24 horas en MSCGM a 37 °C en una atmósfera
10 humidificada de 50 % de CO_2 .
3. Inducir la osteogénesis reemplazando el MSCGM por medio de inducción de la osteogénesis.
4. Alimentar las células inducidas cada 3-4 días durante 2-3 semanas reemplazando completamente el medio por
15 medio de inducción de la osteogénesis reciente. Alimentar células de control no inducidas con MSCGM con el mismo calendario.
5. Las células inducidas osteogénicas mostrarán cambios en la morfología celular, de forma de huso a forma cúbica,
a medida que se diferencian y mineralizan. Pueden formarse huecos en la capa celular posconfluente y pueden
20 empezar a deslaminarse las células de la superficie de cultivo. Si se observa deslaminación, proceder inmediatamente al análisis de la diferenciación osteogénica como se indica por la deposición de calcio, o usar las células inducidas para otros ensayos que requieran osteocitos.
6. Para ensayos de deposición de calcio, recolectar células aclarándolas en PBS exento de calcio y raspar entonces
25 las células de la superficie de cultivo en presencia de HCl 0,5 M. Ensayar en los extractos de cultivos inducidos osteogénicos el contenido de calcio y comparar con extractos de células de control no inducidas.

Ensayo de deposición de calcio para osteogénesis in vitro

30 Materiales:

DPBS, sin calcio ni magnesio, nº de catálogo Cambrex 17-516Q

- HCl 0,5 N
- 35 • Kit Liquicolor de calcio (CPC)- nº de catálogo de Stanbio Laboratory 0150-250
- Cultivos osteogénicos inducidos
- Lector de placa o espectrofotómetro

Procedimiento:

- 40 • Aspirar todo el medio de cultivo de cada pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos que contiene células inducidas o de control para ensayar.
- Aclarar las células en la placa añadiendo 1 ml de PBS por el lado de cada pocillo, teniendo cuidado de no desalojar las células.
- 45 • Aspirar el PBS y reaclorar como anteriormente.
- Aspirar el segundo lavado y añadir 0,5 ml de HCl 0,5 N a cada pocillo.
- Raspar las células de la superficie usando una espátula celular y transferir las células y HCl a un tubo de polipropileno (tubo Eppendorf de 1,5 ml o cualquier tubo de polipropileno de 2-5 ml con un tapón de ajuste hermético).
- 50 • Añadir 0,5 ml adicionales de HCl 0,5 N a cada pocillo para recuperar cualquier célula restante en el pocillo, y transferir esto al tubo apropiado.
- Las muestras pueden taparse herméticamente y almacenarse a -20 °C durante un mes si no se van a ensayar inmediatamente.
- Extraer el calcio de las células agitando los tubos en un agitador orbital durante 3-24 horas a 4 °C. Si se usan
55 muestras congeladas, permitir un tiempo adicional para que las muestras se descongelen.
- Centrifugar los tubos de muestra a 500 g durante 2 minutos.
- Recoger cuidadosamente el sobrenadante con el calcio extraído, sin romper el sedimento, y transferir a un tubo nuevo.
- Siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit Liquicolor de calcio (CPC) de Stanbio Laboratory, preparar
60 una curva patrón con el patrón de calcio y determinar la cantidad de calcio en cada control y muestra osteoinducida.
- Los volúmenes de muestra y reactivo de ensayo pueden ajustarse para caber en placas de microvaloración (200

µl) o cubetas de espectrofotómetro (2 ml).

• Se usan 10 µl-100 µl de muestra para cada determinación de calcio. El extracto de muestra no usado puede congelarse para un futuro reensayo.

5 **Resultados y discusión**

Los resultados se proporcionan en la Figura 15 y muestran que las células seleccionadas con AcM STRO-3 son capaces de diferenciarse en osteocitos.

10 **Ejemplo 9: Diferenciación de células TNAP+. Condrogénesis, adipogénesis y osteogénesis**

Se valoró la diferenciación condrogénica en cultivos agregados tratados con TGF-β3 10 ng/ml como se describe previamente (Gronthos y col., 2003). Con azul Alcian, se demostró que las células seleccionadas con AcM STRO-3 son capaces de producir proteoglicano (Figura 16C) y por tanto condrocitos.

15

Se diferenciaron también células seleccionadas con AcM STRO-3 en osteoblastos funcionales, después de 3 semanas de cultivo en αMEM suplementado con 10 % de FCS, L-ascorbato-2-fosfato 100 µM, dexametasona 10⁻⁷ M y fosfato inorgánico 3 mM. Se identificaron los depósitos minerales por tinción positiva con rojo de alizarina (Figura 16A).

20

De forma similar, se indujo la adipogénesis en presencia de metilisobutilmetilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 0,5 µM e indometacina 60 µM como se describe previamente (Figura 16B). La tinción con aceite rojo O demostró la presencia de células grasas cargadas con lípido.

25 **Ejemplo 10: El trasplante de células seleccionadas con AcM STRO-3 humanas expandidas induce la formación de hueso nuevo *in vivo*.**

Se mezclaron aproximadamente 5,0x10⁶ células expandidas *ex vivo* derivadas de células de médula ósea seleccionadas con AcM STRO-3 con 40 mg de polvo cerámico de hidroxapatito/fosfato de tricalcio (HA/TCP) (Zimmer Inc, Warsaw, IN) y se trasplantaron entonces por vía subcutánea a la superficie dorsal de ratones NOD/SCID inmunocomprometidos de 6 semanas de edad (ARC, Perth, WA, Australia) durante 8 semanas como se describe previamente (Gronthos y col., 2003). Se practicaron estos procedimientos de acuerdo con las especificaciones de un protocolo animal aprobado (University of Adelaide Ethics, número M19/2005). Se fijaron los implantes recolectados en paraformaldehído al 4 % y luego descalcificación con solución de EDTA al 10 % antes de embeber en parafina. Se muestra una sección transversal representativa de un trasplante de 8 semanas de edad teñido con H y E. El examen histológico demostró la presencia de formación de hueso nuevo (Figura 16D).

Ejemplo 11: Las células seleccionadas con AcM STRO-3 son útiles en la reparación ósea

40 **Materiales y procedimientos**

Defecto de tamaño crítico en tibia

Con la oveja en decúbito supino, se retiró la lana y pelo desde por encima del miembro trasero izquierdo (fémur medio) hasta el pie. Se preparó la piel sobre la tibia para cirugía aséptica usando desinfecciones alternadas de povidona-yodo (Betadine) y alcohol. Se cubrió el miembro para cirugía aséptica. Empezó en este punto la profilaxis antibiótica perioperatoria (Ancef 1 g perioperatorio, 1 g a mitad de la cirugía y 1 g después del cierre de la herida, intravenoso). Se realizó una incisión en la piel de 6 cm que se extiende a través del periostio sobre la diáfisis media de la tibia. Se elevaron periféricamente el periostio y tejidos blandos subyacentes de forma directa. Se creó un defecto segmentario de 5 cm a mitad de diáfisis con dos osteotomías usando una sierra oscilante con enfriamiento constante con solución salina.

Se reparó el defecto usando un clavo intermedular acerrojado. Para inserción del clavo, se realizó una incisión longitudinal justo en medio de la línea media sobre la articulación de la rodilla izquierda (babilla) con la rodilla en posición flexionada. Se partió la cápsula de la articulación, se retrajo lateralmente el tendón rotuliano y se disecó el centro de la meseta tibial libre de tejido adiposo en la articulación. Se creó un puerto de entrada de 6 mm con un taladro y se escarió la diáfisis de la tibia con escariadores manuales hasta que el clavo pudo insertarse ajustado a presión. Si es necesario, se escarió la metáfisis tibial distal con un taladro de 8 mm, de modo que la parte distal del clavo pudiera insertarse manualmente. Se insertó el clavo con el uso de un mango de inserción y se conectó el cabezal impulsor con el extremo proximal del clavo. Se practicó un enclavamiento proximal y distal con dispositivos orientadores proximal y distal.

Administración de células seleccionadas con el AcM STRO-3 expandidas en cultivo y portador HA/TCP a defecto de tamaño crítico de tibia de oveja

- 5 Se rellenó el defecto con un portador HA/TCP o HA/TCP+células expandidas en cultivo seleccionadas con AcM STRO-3 y se ensayó a concentraciones variables dependiendo del grupo de tratamiento (25M, 75M o 225M) después de una breve incubación en entorno OR. Se cerraron entonces los tejidos blandos sobre el defecto para asegurar la contención de portador y células.
- 10 Se tomaron a los animales radiografías simples lateral y craneocaudal (AP) con anestesia general. Se tomaron las radiografías en los siguientes puntos temporales: Día 0 (cirugía) y 1, 2 y 3 meses.

Se interpretaron las radiografías de acuerdo con los siguientes criterios:

El % de puente calloso era la medida sumada de la cantidad de tejido mineralizado extendido en el área de defecto

- 15 tanto proximal como distal dividida entre la longitud de defecto total. La fusión se caracterizó por el sistema de puntuación siguiente:
- 0 (sin fusión);
 - 1 (fusión moderada);
 - 2 (masa de fusión interconectada robusta).

20

Procedimiento de fusión espinal

Se anestesiaron las ovejas, se retiró la lana de la región dorsal-lumbar de las ovejas y se colocaron en decúbito supino sobre la mesa de operación. Se preparó la región lumbar para cirugía aséptica con múltiples desinfecciones con povidona-yodo alternadas con alcohol isopropílico. Se cubrió el área y se infiltró anestesia local (lidocaína) a lo largo del abordaje dorsal a L4 y L5 dorsal a las apófisis espinosas.

25

Abordaje a las apófisis transversas: Se realizó una incisión en la piel de 20 cm y se disecaron los músculos paraespinales de las apófisis espinosas y láminas. Se expusieron las articulaciones facetarias y apófisis transversas entre L3 y L4.

30

Instrumentación y técnica de fusión espinal: Se decorticaron bilateralmente las apófisis transversas de L3 y L4. Se colocó el sustituto de injerto de HA/TCP (portador) o portador + células alogénicas o autoinjerto entre las apófisis transversas. En este punto de la cirugía, las ovejas experimentaron fijación de tornillo transpedicular usando tornillos y varillas (Medtronic-Sofamor-Danek; CD-Horozon, sistema de cabezal de tornillo fijo M8). Se cerró rutinariamente el sitio quirúrgico.

35

Después de 4 meses, se sacrificaron humanitariamente las ovejas, e inmediatamente después de la retirada de las varillas conectoras, se sometieron las espinas extraídas a exploraciones por TAC y radiografías simples y análisis Faxitron.

40

Ensayo mecánico espinal

Inmediatamente después de la eutanasia, se recolectaron las espinas lumbares intactas y se prepararon inmediatamente para ensayo mecánico. Se aisló de la espina lumbar un constructo de 4 vértebras consistente en las dos vértebras afectadas (fusionadas) así como un nivel vertebral adicional por encima y por debajo del nivel de fusión. Se despojaron estos especímenes aislados de todo tejido blando periespinal, teniendo cuidado de conservar cualquier arquitectura ligamentosa y de cápsula facetaria. Se taladraron varios tornillos por la placa terminal superior de la mayoría de vértebras cefálicas y se acopló la placa terminal inferior de las vértebras caudales con accesorios de anclaje metálicos, con el constructo de tornillo-vértebras sujetado usando poli(metacrilato de metilo)(PMMA). Se mantuvieron los especímenes húmedos durante toda la preparación y el procedimiento de ensayo.

45

50

Análisis cinético. Aplicación de carga y determinación del intervalo de movimiento

Se enlazó el espécimen con un accesorio de ensayo espinal diseñado a medida. Se acopló el accesorio de ensayo con un marco de ensayo servohidráulico estándar (MTS) que, usando un sistema de poleas y alambres tensionados, aplica momentos puros al espécimen en flexión/extensión, torsión lateral derecha e izquierda y rotación axial derecha e izquierda. Se aplicaron las cargas hasta un máximo de 5 N-m. Se preconditionaron los especímenes durante 3 ciclos y se recogerán los datos en el 4º ciclo.

60

Se calcularon los desplazamientos tridimensionales dependientes de carga usando los principios de la

estereofotogrametría. Se enlazarán tres marcadores no colineales con ambos accesorios de anclaje inferior y superior y los dos niveles que están implicados en la fusión. Se usaron tres cámaras de alta resolución (Vicon Peak, Centennial, CO, EE.UU.) para detectar la luz reflejada por estos marcadores, y se procesaron los datos recogidos con software diseñado a medida (Software de ensayo de flexibilidad espinal, MFLEX) para determinar los ángulos intervertebrales adecuados a través de la masa de fusión. Los datos resultantes proporcionaban tanto una zona neutra como un intervalo de datos de movimiento a través de los niveles implicados y los segmentos adyacentes para los tres planos de torsión.

Análisis estadístico

10 Se practica la significación estadística en los parámetros anteriormente mencionados entre grupos de tratamiento usando ANOVA de un factor estándar con prueba *post hoc* de la menor diferencia significativa PLSD de Fisher para comparaciones múltiples (StatView, SAS Institute Inc. Cary, NC, EE.UU.). Los valores de p menores de 0,05 serán considerados estadísticamente significativos.

15 Se tomaron a los animales radiografías simples lateral y craneocaudal (AP) bajo anestesia general. Se tomaron las radiografías en los siguientes puntos temporales: Día 0 (cirugía) y a los 1, 2, 3 y 4 meses. Adicionalmente, se practicó el análisis Faxitron en el momento del sacrificio usando película de mamografía.

20 Se interpretaron las radiografías de acuerdo con los siguientes criterios:
 0 (sin fusión);
 1 (fusión moderada);
 2 (masa de fusión interconectada robusta).

25 Resultados y discusión

La Figura 17 muestra que las células multipotenciales adultas alogénicas expandidas en cultivo seleccionadas con AcM STRO-3 dan como resultado una fusión espinal significativa después de administración con un portador HA/TCP en un modelo ovino de espina con fijación de tornillo transpedicular en comparación con control solo o autoinjerto como se determina por análisis de rayos X. Se observó una fusión espinal significativa tan temprano como a los 3 meses y siguió aumentando a los 4 meses. Este efecto no parecía ser dependiente de la dosis ya que incluso la dosis menor daba como resultado una fusión espinal significativa en comparación con el portador de control y autoinjerto.

35 La Figura 18 muestra que las células multipotenciales adultas alogénicas expandidas en cultivo seleccionadas con AcM STRO-3 administradas con un portador HA/TCP en un modelo ovino de espina de fijación de tornillo transpedicular demuestran una fusión espinal robusta en comparación con controles portadores en el momento del sacrificio, cuando se ha retirado la instrumentación y se ha valorado el área por análisis Faxitron usando película de mamografía. Todas las dosis de células multipotenciales demuestran una densidad de fusión espinal comparable
 40 con el tratamiento de referencia de autoinjerto.

La Figura 19 muestra que las células multipotenciales adultas alogénicas expandidas por cultivo seleccionadas con AcM STRO-3 administradas con un portador HA/TCP en un modelo espinal ovino de fijación de tornillo transpedicular demuestran una fusión que es mecánicamente comparable con los controles de autoinjerto. Todas las
 45 dosis de células multipotenciales daban como resultado el intervalo de flexión, extensión lateral y torsional de cargas mecánicas de movimiento característico de hueso fusionado.

La Figura 20 muestra que las células multipotenciales adultas alogénicas expandidas por cultivo seleccionadas con AcM STRO-3 administradas con un portador HA/TCP en un modelo ovino de defecto tibial de tamaño crítico de 5 cm
 50 daban como resultado un crecimiento óseo temprano de manera dependiente de la dosis. Las células 225M combinadas con el portador HA/TCP daban como resultado más de un 60 % de formación ósea de callo tan temprano como 3 meses después de la lesión.

La Figura 21 muestra que las células multipotenciales adultas alogénicas expandidas en cultivo seleccionadas con
 55 AcM STRO-3 administradas con un portador HA/TCP en un modelo ovino de defecto tibial de tamaño crítico de 5 cm daban como resultado tasas de unión aumentadas en comparación con el control de portador solo. Solo las dosis de células 75M y 225M daban como resultado unión como se define por análisis de rayos X a los 3 meses.

Estos resultados muestran que las células expandidas de la invención son capaces de potenciar la reparación ósea.

60 **Ejemplo 12: Las células multipotenciales adultas seleccionadas con AcM STRO-3 mejoran la función**

cardiaca**Materiales y procedimientos****5 Procedimiento de toracotomía**

Para ovejas, se graparon el pecho y el abdomen superior, se prepararon con jabón y agua y se pintaron con solución de Betadine que se deja secar. Se cubrieron los campos quirúrgicos con paños estériles y todas las personas en la mesa de operación llevaban bata, máscara, guantes y gorro. Se realizaron todas las operaciones torácicas mediante toracotomía izquierda. Se usó la incisión menor posible y se entró por el 3°, 4° o 5° interespacio. Se realizaron las incisiones en la piel con escalpelo. El tejido cutáneo y los músculos se dividen habitualmente con cauterización para mejorar la hemostasia. Se abrió el pericardio y se apoyó el corazón en una cuna pericárdica. Se practicó un ecocardiograma epicárdico con técnicas estériles. Se usaron suturas de polipropileno (n° 0) para ligar las arterias coronarias apropiadas. El modelo de infarto anteroapical está bien establecido previamente en este modelo animal.

10 Brevemente, el ligamiento de sutura del tercio distal de la arteria descendente anterior izquierda (DAI) junto con el ligamiento de la segunda rama de la arteria coronaria diagonal (D2) creará uniformemente un infarto anteroapical que comprende aproximadamente un 20-25 % del ventrículo izquierdo; esta técnica produce consistente y fiablemente una lesión que conduce con el tiempo a remodelación ventricular e insuficiencia cardiaca congestiva (ICC). Se cerraron las heridas de toracotomía con sutura de Vicryl 3-0 continua. Se cerró la piel con una sutura subcuticular de Vicryl 3-0. Previamente al cierre del pecho, se practicó un bloqueo nervioso intercostal en el sitio quirúrgico con bupivacaína (5 cc de solución al 0,25 %). Se dispuso un tubo torácico en el espacio pleural izquierdo y se dispuso con drenaje por succión de agua de 20 cm hasta que se extubó el animal.

Se monitorizaron completamente los animales bajo anestesia durante el procedimiento (p.ej., PS-vía arterial, gasto cardiaco, catéter de Swan-Ganz/conductancia). Se observaron cuidadosamente los animales en el laboratorio durante varias horas después de la extubación hasta que estuvieron completamente despiertos y en pie. Se observó estrechamente durante las siguientes 6-24 horas cualquier arritmia o signo de bajo gasto cardiaco y se monitorizaron y se trataron por control de dolor, retención de líquidos o falta de apetito si era necesario.

30 Se practicó una toracotomía adicional en ratas atímicas. Se practicó el ligamiento de la arteria anterodescendente izquierda bajo anestesia general, se inyectaron posteriormente en los animales células en la región periinfarto, pericardio y heridas suturadas y se dejaron sobrevivir los animales durante 2 semanas, en cuyo momento se sacrificaron.

35 Administración de células multipotenciales adultas

Para ovejas, se descongelaron células de médula ósea seleccionadas con AcM STRO-3 expandidas *in vitro* medios Profreeze de control en un baño de agua de 37 °C. Se limpió entonces el vial de 4 ml con alcohol y se usó entonces una jeringa de aguja Angiocath para aspirar volúmenes de 1 ml y transportar a 4 jeringas de 1 ml. Se recuperaron un total de aproximadamente 3,5 ml de los 4 ml. Se ajustó entonces en cada jeringa de 1 ml una aguja de calibre 27 y se inyectaron 0,2 ml alrededor de la zona límite periinfarto mediante aproximadamente 16-20 inyecciones.

Para ratas, se inyectaron 0,2 ml de medios que contenían 1 millón de células por aguja de calibre 27 en la zona límite periinfarto.

45

Ecocardiografía**Laparotomía para ecocardiografía cuantitativa transdiafragmática**

50 Para ovejas, aproximadamente en el valor basal, inmediatamente después del infarto y 4 semanas después del infarto, cada animal experimentó laparotomía bajo anestesia general completa (isoflurano) para practicar una ecocardiografía cuantitativa transdiafragmática. Se requiere una laparotomía debido a que no es posible conseguir imágenes ecocardiográficas transtorácicas o transesofágicas adecuadas para análisis cuantitativo en ovejas. Estos animales tienen pulmones enormes que envuelven completamente el corazón. El aire en los pulmones degrada sustancialmente las imágenes. Durante estos estudios, se monitorizó cuidadosamente la hemodinámica, tal como presión sanguínea, ritmo cardiaco y gasto cardiaco.

Específicamente, se grapó el abdomen superior, se preparó con jabón y agua y se pintó con solución de Betadine, que se dejó secar. Se cubrió el campo quirúrgico con paños estériles y todas las personas en la mesa de operación llevaban bata, máscara, guantes y gorro. Debido a los pulmones superpuestos, se tomaron los ecocardiogramas con una vista subdiafragmática. Se realizó la incisión inicial con un escalpelo en la línea media y se llevó a través de las

60

capas subcutánea y muscular con cauterización. Se abrió la cavidad peritoneal. Se introdujo la sonda ecográfica bajo el diafragma en una bolsa de plástico estéril y se realizan todos los estudios en condiciones estériles. Se cierra la incisión con sutura de Prolene 0 interrumpida simple a través tanto de peritoneo como de fascia posterior. Se cerró el tejido subcutáneo con Vicryl 3-0 continua. Se cierra la piel con Vicryl 3-0 subcuticular.

5

Para ratas, se usó ecocardiografía bidimensional para medir los parámetros de volumen sistólico y diastólico.

Análisis de datos

- 10 Se analizaron todas las imágenes fuera de línea. Se realizaron todas las medidas en la sístole final, identificada como el marco en el que el área de la cavidad VI era menor. Todos los gráficos que representan visualizaciones tridimensionales se crearon usando Tecplot (versión 10; Amtec Engineering, Bellevue, Washington). Se calcularon los ajustes de superficie de interpolación segmentaria y curvaturas gaussianas en Matlab. Se presentan todas las medidas como medias DE. Se realizan las comparaciones entre el valor basal y posinfarto usando pruebas de *t*
- 15 pareadas. Se han descrito previamente el procesamiento de imágenes y el análisis de datos practicados para los datos de 2DCE tanto en el eje largo como el corto. Brevemente, se midieron la curvatura endocárdica (K) y el grosor de pared ventricular (h) en la zona límite antes y 1 hora después del infarto. Se analizaron todas las imágenes de sección transversal rotacional 3DCE como sigue. Se trazaron los contornos endocárdico y epicárdico (UTHSCSA ImageTool; Department of Dental Diagnostic Science; University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas) por un técnico de ecocardiografía desconocedor de las hipótesis del estudio.
- 20

Se reconstruyeron endocardio y epicardio en la sístole final trazando cada uno en cada sección transversal rotacional individual. En cada localización endocárdica y epicárdica, se determinó la presencia o ausencia de perfusión miocárdica; así, se registró el estado de perfusión con geometría de VI, permitiendo una determinación

25 precisa y no ambigua del miocardio de la zona límite. Se combinaron entonces los datos de sección transversal para recrear una representación tridimensional de las superficies endocárdica y epicárdica del VI, indexadas por el estado de perfusión. Se ajustaron las superficies endocárdica y epicárdica usando una interpolación segmentaria de placa fina de suavizado (*x*), y se calcularon las características de esta superficie, incluyendo la curvatura gaussiana resuelta espacialmente.

30

Resultados y discusión

La Figura 22 muestra los efectos de células seleccionadas con el AcM STRO-3 después de 5 pases inyectadas directamente en corazones de 5 ratas 24 horas después de ligamiento agudo de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. A las dos semanas, las células inducen aproximadamente un 50 % más cambio de área

35 fraccionada en comparación con la inyección de medio de control solo.

La Figura 23 muestra los efectos de células seleccionadas con el AcM STRO-3 de oveja alogénico después de 5 pases inyectadas directamente en corazones de oveja inmediatamente después de ligamiento agudo de ambas arterias coronarias diagonales. A las 4 y 8 semanas, los animales tratados con células seleccionadas con STRO-3 demuestran una fracción de eyección (A) significativamente mayor y volúmenes diastólico (B) y sistólico (C)

40 significativamente menores, en comparación con animales tratados con medio de control solo.

Estos resultados muestran que las células expandidas de la invención son capaces de mejorar la función cardíaca.

45

Ejemplo 13: Uso de células enriquecidas en TNAP seleccionadas con STRO-3 y expandidas en cultivo humanas en pacientes humanos necesitados de (1) regeneración ósea o (2) recuperación/aumento funcional cardíaco en la formación de vasos sanguíneos

50 Materiales y procedimientos

Se usaron los protocolos operativos estándares de Cell Therapies Pty Ltd (afiliada al Peter MacCullum Institute of Cancer Research Melbourne, Australia) en células TNAP+ inmunoseleccionadas con el AcM STRO-3 expandidas en cultivo a partir de MO humana, posibilitando su uso posterior *in vivo* en pacientes necesitados de regeneración ósea

55 o función cardíaca/formación de vasos sanguíneos.

Procedimiento de aspiración de médula ósea

1. Se toma médula ósea (MO) rutinariamente de dos o más sitios separados aproximadamente 1/2 a 1 cm de la
- 60 parte posterior de la cresta ilíaca (hueso de la cadera).
2. Se procura una inyección de anestésico local en la piel sobre la cadera para anestesiarse el área cutánea. Se

realiza un pequeño corte en la piel y se dispone una aguja en el hueso.

3. Se aspiran 5-20 ml de médula, se retira la aguja y se vuelve a insertar a través de la misma incisión cutánea en una parte diferente del hueso, lejos del área aspirada previamente, hasta recolectar 40 ml de médula.

4. Se aspira rutinariamente MO en tubos que contienen litio-heparina, aunque son aceptables otros anticoagulantes.

5. Es preferible procesar el aspirado de médula al cabo de 1 hora de la recogida, como se describe a continuación.

Preparación de células mononucleares de médula ósea. Separación por gradiente de densidad.

Se practican todas las técnicas en una cabina de seguridad biológica de clase 11.

10

1. Se recibirá habitualmente un aspirado de 40 ml de MO en 4 tubos (aprox. 10 ml/tubo).

2. Agrupar todas las fracciones de MO en un tubo de 50 ml (Falcon, Becton Dickinson) para asegurar un mezclado igual. Dividir el volumen de MO en cantidades iguales en dos tubos de 50 ml. Añadir un volumen igual de tampón de bloqueo.

15

3. Practicar una estimación de leucocitos usando líquido leucocítico (WCF). Valorar el número de células (recuento preprocesamiento).

4. Usando un filtro celular de 70 mm (Falcon, Becton Dickinson), filtrar la MO diluida en dos tubos de centrífuga de 50 ml para retirar cualquier coágulo pequeño y fragmento de hueso.

5. Disponer 3 ml de solución de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) en el fondo de 10 tubos de polietireno de 14 ml de

20

"fondo redondo" (Falcon, Becton Dickinson).

6. Recubrir cuidadosamente Lymphoprep con 7,5 ml de MO.

7. Centrifugar los tubos a 400 x g (1400 rpm) durante 30 min a TA. *Asegurar que el freno de la centrífuga está desconectado.*

25

8. Con una cánula estéril, aspirar con vacío los medios hasta aproximadamente _ cm por encima de la banda leucocítica (capa leucocítica). Recoger cuidadosamente la capa mononuclear con una pipeta Pasteur de plástico desechable y agrupar en un tubo de 50 ml.

9. Diluir las células a 40 ml con tampón de lavado y centrifugar la muestra a 400 x g (1400 rpm) durante 10 min con la rotura activada.

10. Aspirar el tampón hasta justo por encima del sedimento celular. Agitar con vórtice el tubo y añadir 50 ml de HHF.

30

Repetir la etapa 9.

Clasificación celular activada por magnetismo (MACS) de células positivas de TNAP

35

1. Previamente al inmunomarcaje, se resuspenden BMMNC (aproximadamente 1-2 x 10⁸ células) en 0,5 ml de tampón de bloqueo y se incuban durante 30 minutos en hielo para bloquear la posible unión de anticuerpos mediada por receptor de Fc.

2. Se añaden 500 microlitros de AcM STRO-3 previamente diluido a una concentración de 10 mg/ml en tampón de bloqueo a las BMMNC y se incuban durante 60 minutos a 4 °C, con mezclado suave ocasional.

40

3. Se lavan las BMMNC dos veces con HHF y se resuspenden en 0,5 ml de HHF que contiene IgG de cabra anti-ratón biotinilada (específica de cadena g, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) a una dilución 1/50 y se incuban a 4 °C durante 45 minutos.

45

4. Se lavan las BMMNC tres veces con tampón de MACS (PBS exento de Ca²⁺ y Mn²⁺ suplementado con 1 % de BSA en PBS, EDTA 5 mM y 0,01 % de azida de sodio) y se resuspenden en 450 _1 de tampón de MACS al que se añaden 50 _1 de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) (10 _1 de microperlas/107 células en 90 _1 de tampón de MACS). Se incuba la mezcla a 4 °C durante 15 minutos.

5. Para monitorizar el proceso de purificación (opcional), se añade directamente conjugado de estreptavidina-PE (1/50) (Caltag Laboratories, San Francisco, CA) a la suspensión celular durante 5 minutos adicionales.

50

6. Después de 1 lavado con tampón de MACS enfriado con hielo, se retira una pequeña alícuota de células (aprox. 200K) para análisis citométrico de flujo (antes de la muestra). Se disponen entonces las células restantes en la columna mini MACS (capacidad de columna de 108 células, Miltenyi Biotec, columna de MS). Las células TNAP- (fracción negativa) no se retienen en la columna y pasan a través por la gravedad al efluente, mientras que las células TNAP+ permanecen enlazadas con la matriz magnetizada.

7. Lavar la columna 3 veces con 0,5 ml de tampón de MACS para retirar cualquier célula TNAP- unida no específicamente.

55

8. Se recuperan las células TNAP+ por purgado de la columna con tampón de MACS después de extraer la columna del campo magnético. Se retiran muestras pequeñas de cada una de las fracciones pre, negativa y positiva, se fijan en FACS Fix (1 % (v/v) de formalina, D-glucosa 0,1 M, 0,02 % de azida de sodio en PBS) y se analizan posteriormente por citometría de flujo para valorar pureza y recuperación.

60

Establecimiento y cultivo ex vivo de células seleccionadas con el AcM STRO-3

1. Se cultivan las poblaciones enriquecidas en TNAP+ (5×10^4 por cm^2) en matraces o placas de cultivo de tejido que contienen la modificación alfa de medio de Eagle (α -MEM) suplementado con 20 % de suero fetal de ternero, L-ascorbato-2-fosfato 100 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 mg/ml (CSL) a 37 °C en 4 % de CO₂ durante 2 semanas.
- 5 2. Las poblaciones de células primarias deberían someterse a pases cuando los cultivos alcancen 80-90 % de confluencia. Los cultivos adherentes deberían lavarse 1x con HBSS exento de suero y liberarse las células por digestión enzimática con 2 ml de solución de 0,5 % de tripsina/EDTA (JRH) por matraz T75 durante 5-10 minutos a 37 °C. Se agrupan las suspensiones celulares y se resiembran a 0,5-1,0 $\times 10^4$ por cm^2 en un medio de crecimiento α -MEM suplementado con 10 % de FBS.
- 10 3. Rutinariamente, se preparan suspensiones monocelulares de células expandidas en cultivo por digestión con tripsina/EDTA como se describe anteriormente. Se diluyen entonces las células y se lavan con HFF frío. Después de la centrifugación, se resuspende el sedimento celular a una concentración de 5×10^6 células por ml en FBS y se mantiene en hielo. Se añade entonces gradualmente un volumen igual de mezcla de congelación (DMSO al 20 % en FBS frío) mezclando suavemente las células, dando una concentración final de $2,5 \times 10^6$ células por ml en DMSO al
- 15 10 %/FBS. Se distribuyen entonces alícuotas de 1 ml en crioviales de 1,8 ml (NUNC) en hielo, es decir 1 ml por tubo, y se congelan entonces a una velocidad de -1 °C por minuto usando un congelador con control de velocidad. Se transfieren entonces los viales congelados a nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. Se consigue la recuperación de las soluciones madre congeladas descongelando rápidamente las células en baño de agua a 37 °C. Se resuspenden entonces las células en HFF frío y se centrifugan a 280 x g durante 10 minutos. Para valorar la
- 20 viabilidad de las células, se prepara una dilución 1:5 en azul de tripano al 0,4 %/PBS y se determina el número de células usando un hemocitómetro. Típicamente, este procedimiento da variabilidades entre 80-90 %.

Control de calidad de preparaciones de células

- 25 1. Se preparan cultivos de BMSSC por digestión con tripsina/EDTA y se resuspenden entonces en tampón de bloqueo durante 30 minutos.
2. La calificación celular final incluye: tinción gramnegativa, cultivo bacteriano y fúngico negativo a los 14 días, ensayo de endotoxinas negativo y 70 % de viabilidad por exclusión con tinte de azul de tripano.
3. Las células se caracterizan por un inmunofenotipo STRO-1+, TNAP+, CD146+, CD44+, CD3-, CD14-, ensayos de
- 30 formación de colonias (unidades formadoras de colonias-fibroblastos (UFC-F), y diferenciación osteoblástica inducida).

Se envían entonces por mensajería células expandidas en cultivo autólogas en hielo al Hospital Melbourne, Melbourne, Australia, para implantación en pacientes necesitados de regeneración ósea, y al Hospital John Hunter

35 en Newcastle, Australia, para implantación intramiocárdica en pacientes necesitados de recuperación funcional cardíaca y/o formación de nuevos vasos sanguíneos.

Procedimiento de implantación de células de médula ósea guiada por NOGA percutáneo

- 40 El sistema de cartografía electromecánica ventricular izquierda NOGA (Biosense) utiliza la tecnología magnética para guiar un catéter de cartografía endocárdica de 8fr, que se introduce por vía percutánea por la arteria femoral derecha y se hace progresar al ventrículo izquierdo. Se arrastra entonces el catéter a lo largo de la superficie endocárdica, adquiriendo potenciales eléctricos de onda R locales. Se transmiten las señales eléctricas a electrodos de ECG de superficie, proporcionando así información sobre el movimiento de pared regional (puntuaciones de
- 45 acortamiento lineal local). Las áreas de miocardio isquémico pero viable se detectarán por NOGA como una región de acortamiento lineal local reducido, pero potencial de onda R conservado. Los parámetros de NOGA predefinidos de miocardio normal son áreas de actividad eléctrica > 5 mV y acortamiento lineal local > 12 %. El miocardio infartado tendrá áreas de actividad eléctrica < 5 mV y un acortamiento lineal local < 4 %. El miocardio isquémico pero viable tendrá un potencial eléctrico de 5 mV o mayor y puntuaciones de acortamiento lineal local de 4-12 %. El
- 50 NOGA se ha validado extensamente como herramienta para valorar la viabilidad miocárdica en línea en el Laboratorio de cateterización cardíaca. El catéter de inyección Biosense Myo-Star™ es similar al catéter de cartografía ya que tiene un sensor magnético en su punta, que lo hace localizable en el espacio. Tiene una aguja retraíble, que puede usarse para inyectar precisamente las células de médula ósea en la región diana. Este sistema posibilita una inyección precisa y segura de células de médula ósea en el endocardio, ya que entra en contacto con
- 55 la superficie endocárdica.

Resultados y discusión

- 60 **Implantación de células enriquecidas en TNAP seleccionadas con STRO-3 y expandidas en cultivo en un paciente con fractura sin unión del fémur**

Se presentó un varón de 19 años en el Hospital Royal Melbourne con una fractura del eje femoral que había ocurrido 9 meses antes debido a un accidente de motocicleta y no había conseguido curar a pesar de la implantación quirúrgica de varillas y tornillos. Persistía un defecto de 5 cm no curado persistente.

5 Después del consentimiento informado, el paciente se sometió a aspiración de médula ósea, con selección con el AcM STRO-3 de las células mononucleares de médula ósea y expansión en cultivo de estas células como anteriormente. Después de aproximadamente 6 semanas de cultivo, se recolectaron 200-225 millones de células y se prepararon para infusión quirúrgica.

10 En la infusión, se resuspendieron las células en solución salina/Plasmalyte estéril a un volumen de 5-10 ml y se mezclaron con matriz ósea sintética artificial (HA/TCP) que contenía colágeno bovino (Mastergraft™ Matrix).

El procedimiento fue sin problemas, sin efectos adversos y el defecto se cerró completamente.

15 **Implantación de células enriquecidas en TNAP seleccionadas con STRO-3 y expandidas en cultivo en dos pacientes con oclusiones de vaso arterial coronario múltiples y dolor torácico resistente**

Se presentaron dos varones en el intervalo de edad de 40-65 años en el Hospital John Hunter con dolor torácico persistente por esfuerzo y oclusiones de arteria coronaria multivasos no susceptibles de tratamiento médico o quirúrgico.

Después del consentimiento informado, se sometieron los pacientes a aspirado de médula ósea, con selección por el AcM STRO-3 de las células mononucleares de médula ósea y expansión en cultivo de estas células, como anteriormente. Después de aproximadamente 6 semanas de cultivo, se recolectaron 100-120 millones de células por cada paciente y se prepararon para infusión intramiocárdica por catéter cardiaco NOGA (Biosense).

Por cada paciente, se practicó una inyección intramiocárdica de las células cultivadas guiada por el catéter NOGA. En cada región diana, se practicaron 10-12 inyecciones de 0,2 ml que contenían células. Se practicaron ecocardiogramas durante e inmediatamente después del procedimiento para excluir la perforación de la pared ventricular y el taponamiento pericárdico resultante. Después del procedimiento, se observaron los pacientes durante 24 horas en la Unidad de cuidados coronarios. Se ensayaron los electrocardiogramas y niveles enzimáticos cardiacos cada 8 horas durante la observación en la Unidad de cuidados coronarios. Se obtuvieron los ecocardiogramas en las primeras 24 h después del procedimiento de implantación.

35 No se observaron efectos adversos en el periodo agudo ni posoperatorio. Los pacientes se siguieron cada uno durante dos meses. Durante este periodo, cada paciente ha indicado una frecuencia y gravedad reducida de los episodios de dolor torácico y ha reseñado una tolerancia al ejercicio aumentada.

Estos datos sugieren que la implantación de células expandidas ha dado como resultado un flujo sanguíneo vascular aumentado en las áreas dañadas y "en riesgo" del miocardio suministrado por los vasos coronarios ocluidos.

Ejemplo 14: Supervivencia celular aumentada cuando se suministra cola de fibrina

Materiales y procedimientos

45

Preparación de cola de fibrina

Se preparó la cola de fibrina (Tisseal VH, Baxter) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, se calentaron en baño de agua a 37 °C los viales que contenían el concentrado de proteína Sealer liofilizado, la solución inhibidora de la fibrinólisis y la trombina. Se transfirió la solución inhibidora de la fibrinólisis al vial que contenía el concentrado de proteína Sealer liofilizado usando los componentes de reconstitución estériles proporcionados con el sistema de preparación y aplicación DUPLOJECT. Se dejó reposar el vial a 37 °C durante 1 minuto, se agitó entonces breve y vigorosamente con un movimiento circular (evitando una espumación excesiva) y se dispuso en un baño de agua durante otros 15 minutos. Se transfirió la solución de cloruro de calcio a la solución de trombina una vez calentada.

Resuspensión e inyección de células

Se transfirieron 5 millones de MPC humanas inmunoseleccionadas expandidas en PBS a la solución de trombina diluida. Se cargaron entonces las soluciones de trombina/células y soluciones de proteína Sealer reconstituida en un sistema de aplicación DUPLOJECT modificado cargado con dos jeringa de insulina de 1 cc sin aguja (Beckton

Dickinson) y con una aguja 27G de 15,9 mm (Becton Dickinson).

48 horas después del ligamiento LAD e infarto de ratas atímicas, se reabrió la incisión de toracotomía izquierda y se lisaron cuidadosamente las adhesiones. Se identificó la zona de infarto y se inyectó un volumen total de 0,3 cc (que contenía 1 millón de células en cola de fibrina diluida 1:5) en tres dosis iguales divididas en la región periinfarto. Se cerró la incisión por capas y el animal se recuperó. Después de otras 48 horas, se sacrificaron los animales, se obtuvo el tejido cardíaco y se extrajo el ADN total por procedimientos estándares.

Se practicó la PCR del gen de β -globulina humana en ADN de tejido cardíaco extraído de rata para estimar la supervivencia de células humanas a partir de curvas patrón.

Resultados y discusión

La Figura 24 muestra que las MPC expandidas en cultivo de la invención demuestran una supervivencia aumentada en tejidos *in vivo* cuando se suministran con cola de fibrina.

Bibliografía

- Allcock y col. (1977) Synthesis of Poly[(amino acid alkyl ester)phosphazenes] *Macromolecule* 10, 824-830.
- 20 Anseth y col. (2002) In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *J Control Release* 78, 199-209.
- Bianco y col. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-92.
- Bregni y col. (1992). Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 80, 1418-22.
- 25 Chatterjee y col. (1996) Adeno-associated virus vectors for gene therapy of the hematopoietic system. *Curr Top Microbiol Immunol* 218, 61-73.
- Cole y col. (1984) Human monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biochem.* 62, 109-20.
- Cote y col. (1983) Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026-30.
- 30 Danos y col. (1988) Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6460-4
- De Broe y col. (1992). Introduction: recent developments in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 38, 2485.
- Dennis y col. (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170, 73-82.
- 35 Ducy y col. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-54.
- Finer y col. (1994) *kat*: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood.* 83, 43-50.
- Frey y col. (1998) High-efficiency gene transfer into *ex vivo* expanded human hematopoietic progenitors and precursor cells by adenovirus vectors. *Blood* 91, 2781-92.
- 40 Fukushi y col. (1998). Intracellular retention and degradation of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with a Gly317-->Asp substitution associated with lethal hypophosphatasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 613-8.
- Gronthos y col. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84, 4164-73.
- Gronthos y col. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 45 97, 13625-30.
- Gronthos y col. (1995). The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. *Blood* 85, 929-40.
- Gronthos y col. (1996). The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother* 5, 15-23.
- 50 Gronthos y col. (1999). Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14, 47-56.
- Gronthos y col. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116, 1827-35.
- Harris (1990) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186, 133-50.
- 55 Hooper (1997). Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin. Chim. Acta* 266, 3-12.
- Hutmacher y col. (2001) Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 12, 107-124.
- Kohler y col. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-60 7.
- Kozbor y col. (1985). Specific immunoglobulin production and enhanced tumorigenicity following ascites growth of

- human hybridomas. *J. Immunol. Methods* 81, 31-42.
- Magnusson y col. (2002). Monoclonal antibodies against tissue-nonspecific alkaline phosphatase. Informe del taller TD9 del ISOBM. *Tumour Biol* 23, 228-48.
- McComb y col. (1979). *Alkaline Phosphatases*, Plenum Press, Nueva York.
- 5 Miller y col. (1986) Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol.* 6, 2895-902.
- Miller y col. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques.* 7, 980-82, 984-86, 989-990.
- Miura y col. (1994) Differences between the sugar moieties of liver- and bone-type alkaline phosphatases: a re-evaluation. *Ann. Clin. Biochem.* 31, 25-30.
- 10 Mornet y col. (2001). Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol. Chem.* 276, 31171-8.
- Moss (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 38, 2486-92.
- Mulivor y col. (1985). Quantitative analysis of alkaline phosphatases in serum and amniotic fluid: comparison of biochemical and immunologic assays. *J Lab. Clin. Med.* 105, 342-8.
- 15 Nosjean y col. (1997). Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochem. J.* 321, 297-303.
- Oda y col. (1999). A general method for rapid purification of soluble versions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed in insect cells: an application for human tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J. Biochem.* 20 (Tokio) 126, 694-9.
- Owen y col. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60.
- Pear y col. (1993) Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 8392-8396.
- Pearson y col. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 24444-8.
- 25 Prockop (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-4.
- Quesenbery y col. (eds) (1998) *Stem Cell Biology and Gene Therapy*, John Wiley & Sons.
- Rucker y col. (1996) Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 87, 437-46 .
- Sato y col. (1994). Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes. *Blood* 83, 1093-101.
- 30 Simmons y col. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55-62.
- Stewart y col. (1999). Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14, 1345-56.
- 35 Wang y col. (2003) Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel. *Biomaterials* 24, 3969-3980.
- Weiss y col. (1986). Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7182-6.
- Weiss y col. (1988). Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 263, 12002-10.
- 40 Whyte (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 15, 439-61.
- Xu y col. (1994). Correction of the enzyme deficiency in hematopoietic cells of Gaucher patients using a clinically acceptable retroviral supernatant transduction protocol. *Exp. Hemat.* 22, 223-30.
- 45 Zannettino y col. (1996). A powerful new technique for isolating genes encoding cell surface antigens using retroviral expression cloning. *J Immunol* 156, 611-20.
- Zannettino y col. (1998) The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. *Blood* 92, 2613-28.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Angioblast Systems, Inc.
- <120> Marcador para el enriquecimiento de células multipotenciales adultas
- 55 <130> 504292
- <150> US 60/670.250
- <151> 12-04-2005
- <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.1
- 60 <210> 1
- <211> 524

ES 2 654 428 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
1           5           10           15

Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
          20           25           30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
          35           40           45

Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
          50           55           60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65           70           75           80

Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
          85           90           95

Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
          100          105          110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
          115          120          125

Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
130          135          140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
145          150          155          160
  
```

5

ES 2 654 428 T3

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
 165 170 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
 180 185 190

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu
 225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp
 245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg Tyr Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg
 260 265 270

Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val
 290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu
 305 310 315 320

Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350

Val Glu Met Asp Arg Ala Ile Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser
 355 360 365

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400

ES 2 654 428 T3

Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
420 425 430

Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Pro Val Pro
435 440 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys
450 455 460

Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val
465 470 475 480

Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His
485 490 495

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu
500 505 510

Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe
515 520

<210> 2

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
1 5 10 15

Ser Phe Val Pro Glu Lys Glu Arg Asp Pro Ser Tyr Trp Arg Gln Gln
20 25 30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Asn Ala Leu Lys Leu Gln Lys Leu Asn Thr
35 40 45

Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
50 55 60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65 70 75 80

Thr Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
85 90 95

ES 2 654 428 T3

Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
 100 105 110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
 115 120 125

Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Thr Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
 130 135 140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
 145 150 155 160

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
 165 170 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
 180 185 190

Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
 195 200 205

Met His Asn Ile Lys Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
 210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Ile Ser Ile Trp
 245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg
 260 265 270

Thr Glu Leu Leu Ala Leu Asp Pro Ser Arg Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Leu
 290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Val Ala Leu Arg Ile Leu
 305 310 315 320

Thr Lys Asn Leu Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335

ES 2 654 428 T3

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350

Val Glu Met Asp Gln Ala Ile Gly Lys Ala Gly Ala Met Thr Ser Gln
 355 360 365

Lys Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Asp Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430

Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys
 450 455 460

Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile
 465 470 475 480

Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ser Cys Ile Gly Ala Asn Leu Asp His
 485 490 495

Cys Ala Trp Ala Gly Ser Gly Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu
 500 505 510

Leu Pro Leu Ala Val Leu Ser Leu Pro Thr Leu Phe
 515 520

<210> 3

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 3

Met Ile Leu Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Pro Cys Leu Thr Asn
 1 5 10 15

Ser Phe Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Ser Tyr Trp Arg Gln Gln
 20 25 30

ES 2 654 428 T3

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Asn Ala Leu Lys Leu Gln Lys Leu Asn Thr
35 40 45

Asn Val Ala Lys Asn Ile Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
50 55 60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
65 70 75 80

Thr Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
85 90 95

Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
100 105 110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val
115 120 125

Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Thr Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly
130 135 140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser
145 150 155 160

Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala
165 170 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met
180 185 190

Arg Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu
195 200 205

Met His Asn Ile Lys Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys
210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Arg Thr Asp Val Glu Tyr Glu Leu Asp Glu
225 230 235 240

Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Ile Ser Ile Trp
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Tyr Val Trp Asn Arg
260 265 270

ES 2 654 428 T3

Thr Glu Leu Leu Ala Leu Asp Pro Ser Arg Val Asp Tyr Leu Leu Gly
 275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Leu
 290 295 300

Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Glu Val Ala Leu Arg Ile Leu
 305 310 315 320

Thr Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile
 325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala
 340 345 350

Val Glu Met Asp Glu Ala Ile Gly Lys Ala Gly Thr Met Thr Ser Gln
 355 360 365

Lys Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr
 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Met Val Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Asp Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
 420 425 430

Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Lys
 450 455 460

Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Ile
 465 470 475 480

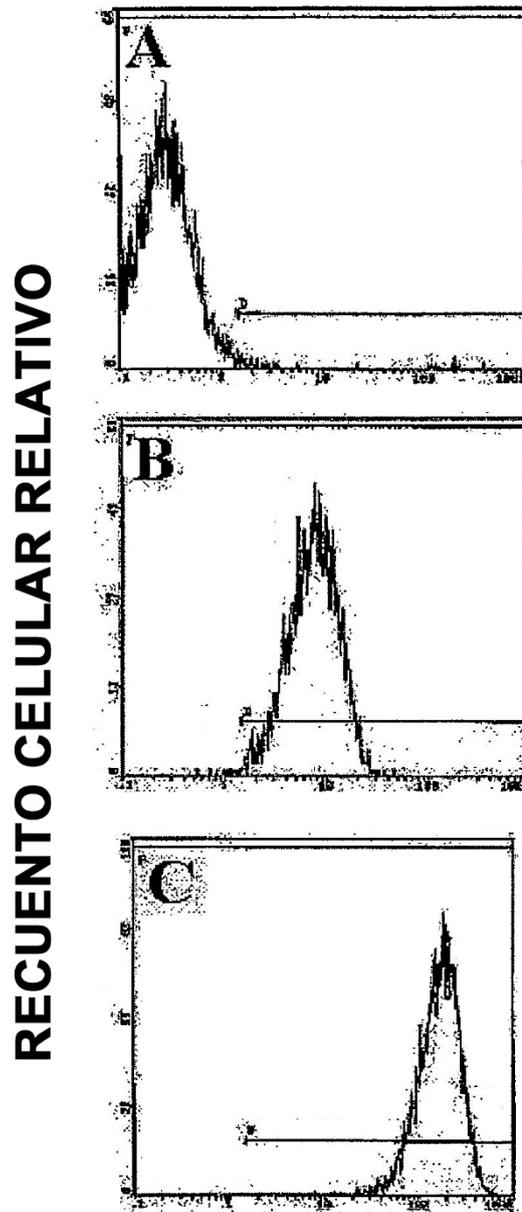
Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ser Cys Ile Gly Ala Asn Leu Asp His
 485 490 495

Cys Ala Trp Ala Ser Ser Ala Ser Ser Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu
 500 505 510

Leu Pro Leu Ala Leu Phe Pro Leu Arg Thr Leu Phe
 515 520

REIVINDICACIONES

1. Una población enriquecida de células multipotenciales adultas TNAP⁺ donde al menos un 4 % de la población celular total son células multipotenciales TNAP⁺ STRO-1⁺ aptas para cultivarse *in vitro* produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos, donde el marcador TNAP⁺ es un marcador TNAP⁺ que se une al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.
2. La población enriquecida de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos un 10 % de la población celular total son células multipotenciales TNAP⁺ STRO-1⁺ aptas para cultivarse *in vitro* produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos.
3. La población enriquecida de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos un 20 % de la población celular total son células multipotenciales TNAP⁺ STRO-1⁺ aptas para cultivarse *in vitro* produciendo adipocitos, osteocitos y condrocitos.
4. La población enriquecida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las células STRO-1⁺ son STRO-1^{bright}.
5. Un procedimiento de generación de una población celular comprometida específica de tejido, comprendiendo el procedimiento cultivar células multipotenciales adultas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en presencia de uno o más factores estimulantes; y someter dicha población cultivada a condiciones que sesgan la diferenciación de las células multipotenciales adultas a un tipo de tejido específico.
6. Una composición que comprende una población de células multipotenciales adultas enriquecidas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Una población celular enriquecida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la generación o reparación de tejido.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6 para uso en la generación o reparación de tejido.



Expresión de antígeno de STRO-3 (PE)

Figura 1

M de antígeno de STRO-3

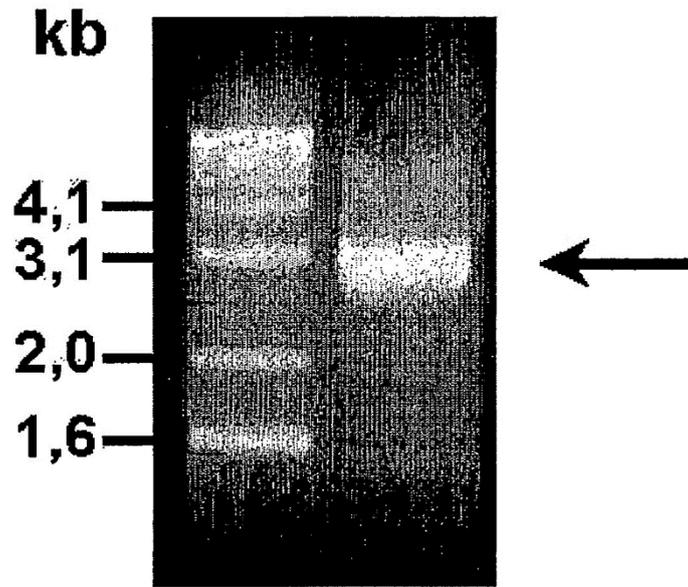


Figura 2

```

BLASTN 1.4.8MP [20 de junio de 1995] [Build 16:33:28 5 de Sep de 1995]
Referencia: Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers,
and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol.
Biol. 215:403-10.
Consulta= az4 (821 letras)
Base de datos: PDB no redundante+actualización de GB+GenBank+actualización de
EMBL+EMBL 534,094 secuencias; 373,855,830 letras totales
Alta probabilidad de suma menor
Secuencias productoras de pares de segmentos de alta puntuación: Puntuación P(N) N
gb|H37944|H37944 yp47b08.rl Clon 190551 de ADnc de Homo sapiens 5' similar a gb:X14174
FOSFATASA ALCALINA, ISOZIMA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO
PRECURSOR (HUMANO);. Longitud= 484 HSP de hebra codificante
Puntuación= 936 (258,6 bits), esperada= 3,0e-144, Suma P(5)= 3,0e-144
Identities= 188/189 (99 %), Positivas= 188/189 (99 %), Hebra= codificante/codificante

Consulta: 123 CCGTGCCTCCCACGGCGCTTGTGCCTGGACGGACCCTCGCCAGTGCCTGCGCGAGGATFGGA 182
|||||
Sujeto: 26 CTGTGCCTCCCACGGCGCTTGTGCCTGGACGGACCCTCGCCAGTGCCTGCGCGAGGATFGGA 85
Consulta: 183 ACATCAGTTAACATCTGACCACTGCCAGCCCACCCCTCCCACCCACGTCGATTGCATCT 242
|||||
Sujeto: 86 ACATCAGTTAACATCTGACCACTGCCAGCCCACCCCTCCCACCCACGTCGATTGCATCT 145
Consulta: 243 CTGGGCTCCAGGGATAAAGCAGGTCTTGGGGTGCACCATGATTTACCATTTCTTAGTACT 302
|||||
Sujeto: 146 CTGGGCTCCAGGGATAAAGCAGGTCTTGGGGTGCACCATGATTTACCATTTCTTAGTACT 205
Consulta: 303 GGCCATTGGCACCTGCCTTACTAACTCCTTAGTCCAGAGAAAGAGAAAGACCCCAAGTA 262
|||||
Sujeto: 206 GGCCATTGGCACCTGCCTTACTAACTCCTTAGTCCAGAGAAAGAGAAAGACCCCAAGTAC 265
Consulta: 263 CTGGCGAGACCAAGCGCAAGAGACACTGAAATATGCCCTNGGAGCTTCAGAAGCTCAAAT 422
|||||
Sujeto: 266 TGGCGGAGACCAAGCGCAAGAGACACTGAAATATGCCCTGGGAGCTTCAGAAGCTCAAAT 322
Consulta: 423 ATTGTCATCATGTCCCTGGGAGATGGATGGGNTTGTG 479
|||||
Sujeto: 323 AATGTCATCATGTTCCTGGGAGATGGATGGGTGTCTC 377

```

Figura 3

RECuento CELULAR RELATIVO

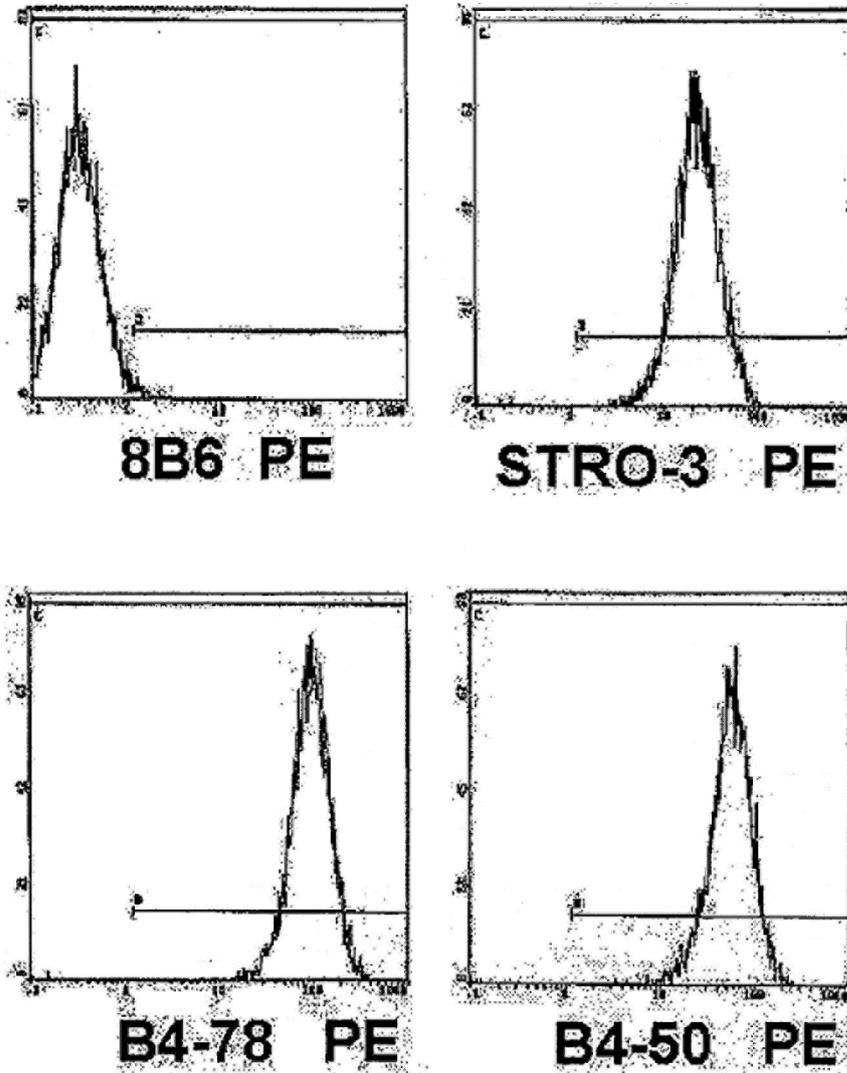


Figura 4

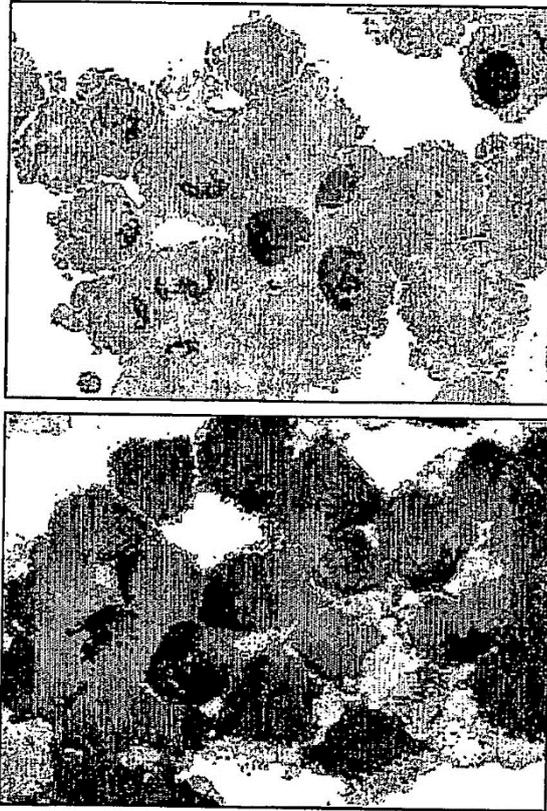


Figura 5

M L B

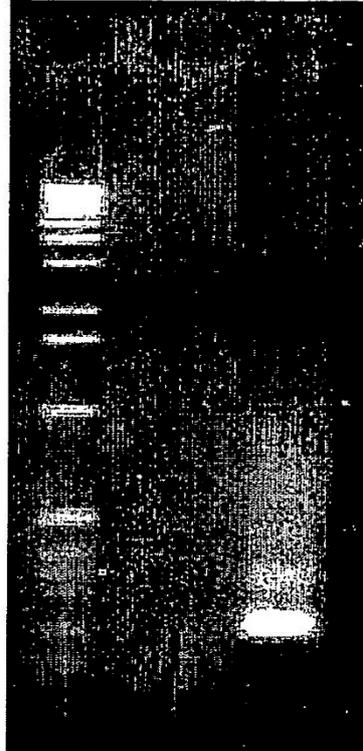
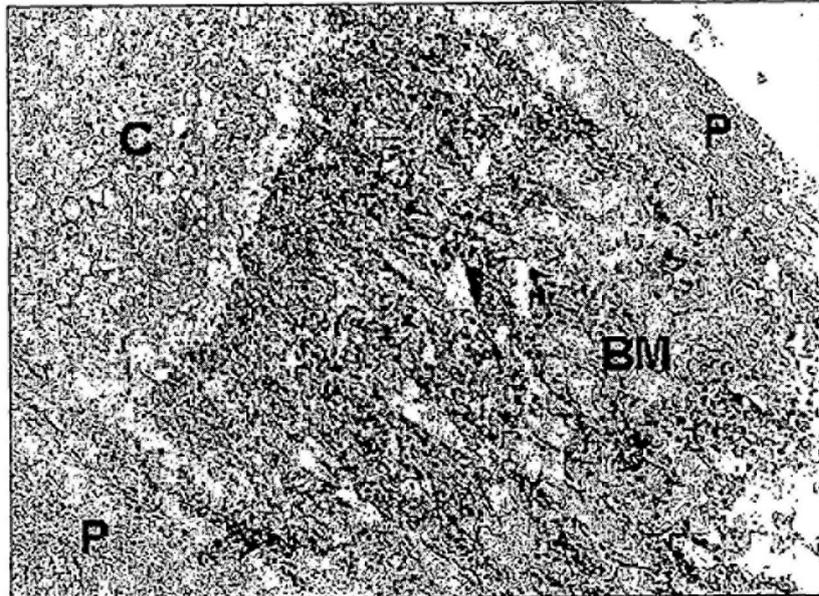


Figura 6

100 x aumentos



400 x aumentos

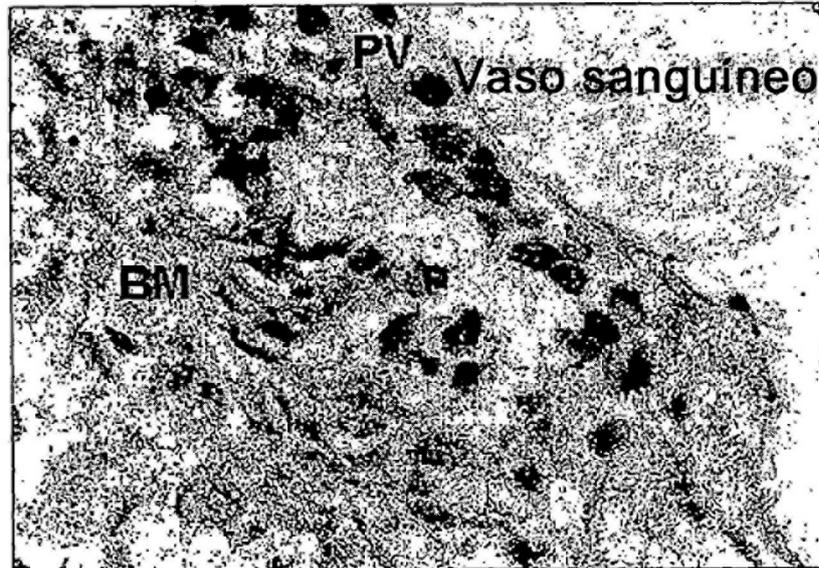


Figura 7

UFC-F por 10⁵ células sembradas

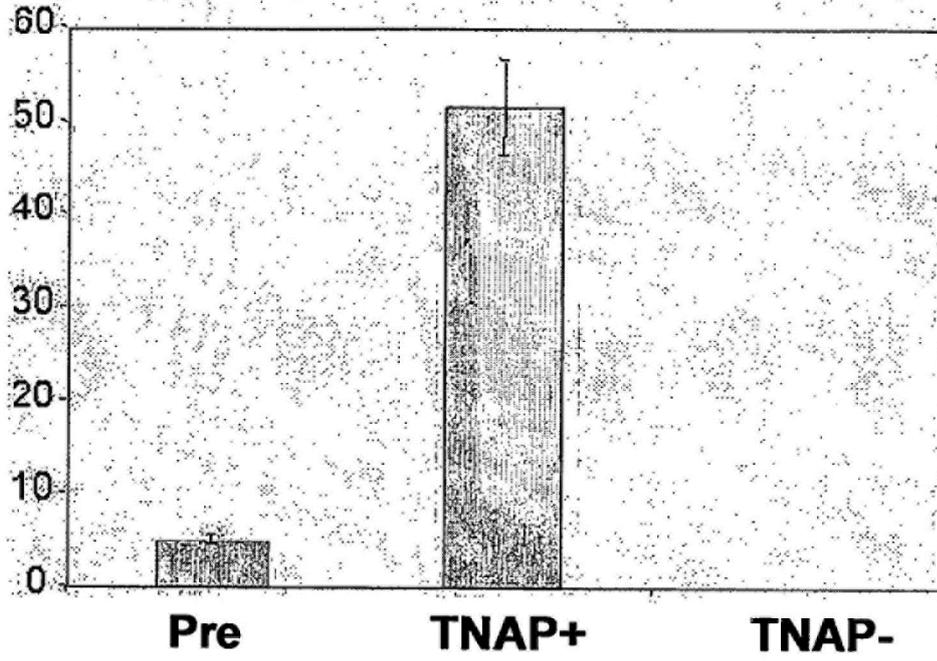


Figura 8

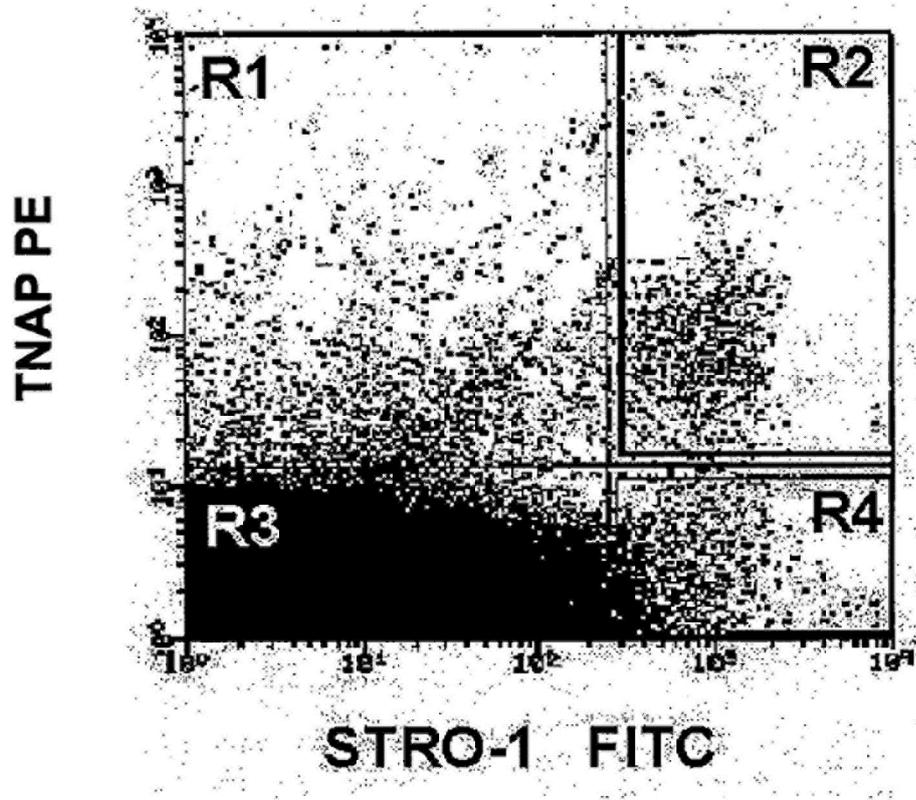


Figura 9

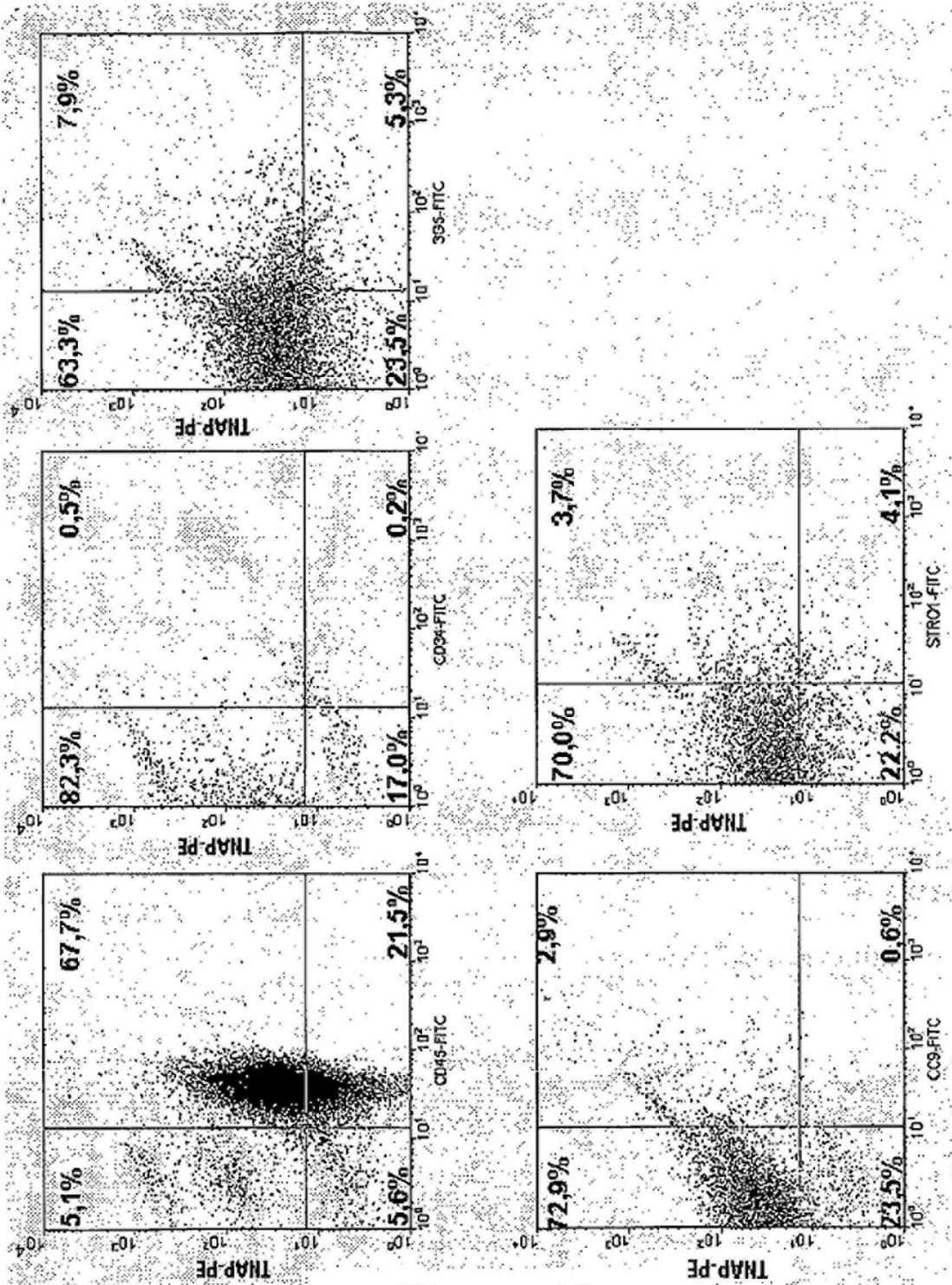


Figura 10

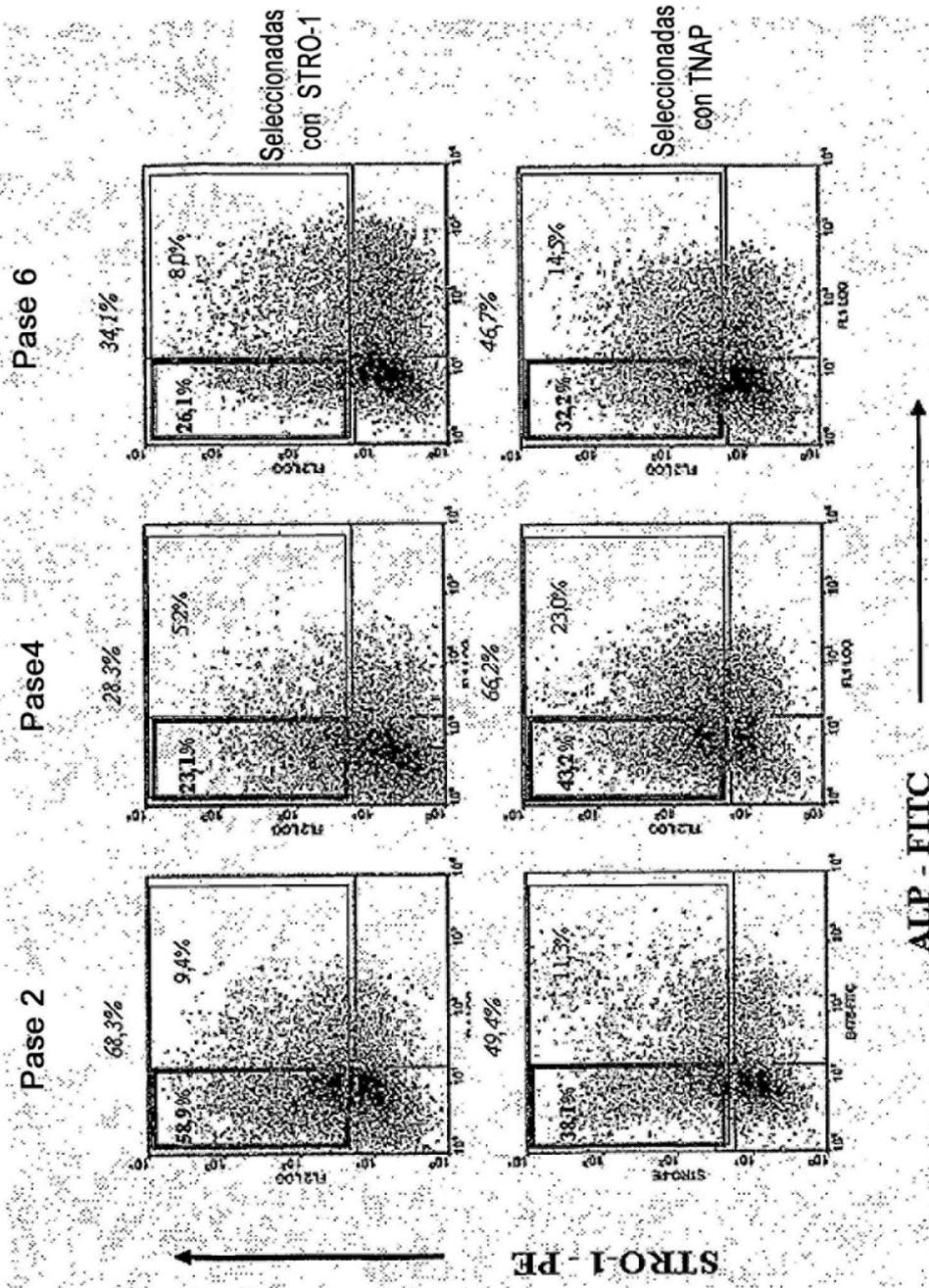


Figura 11

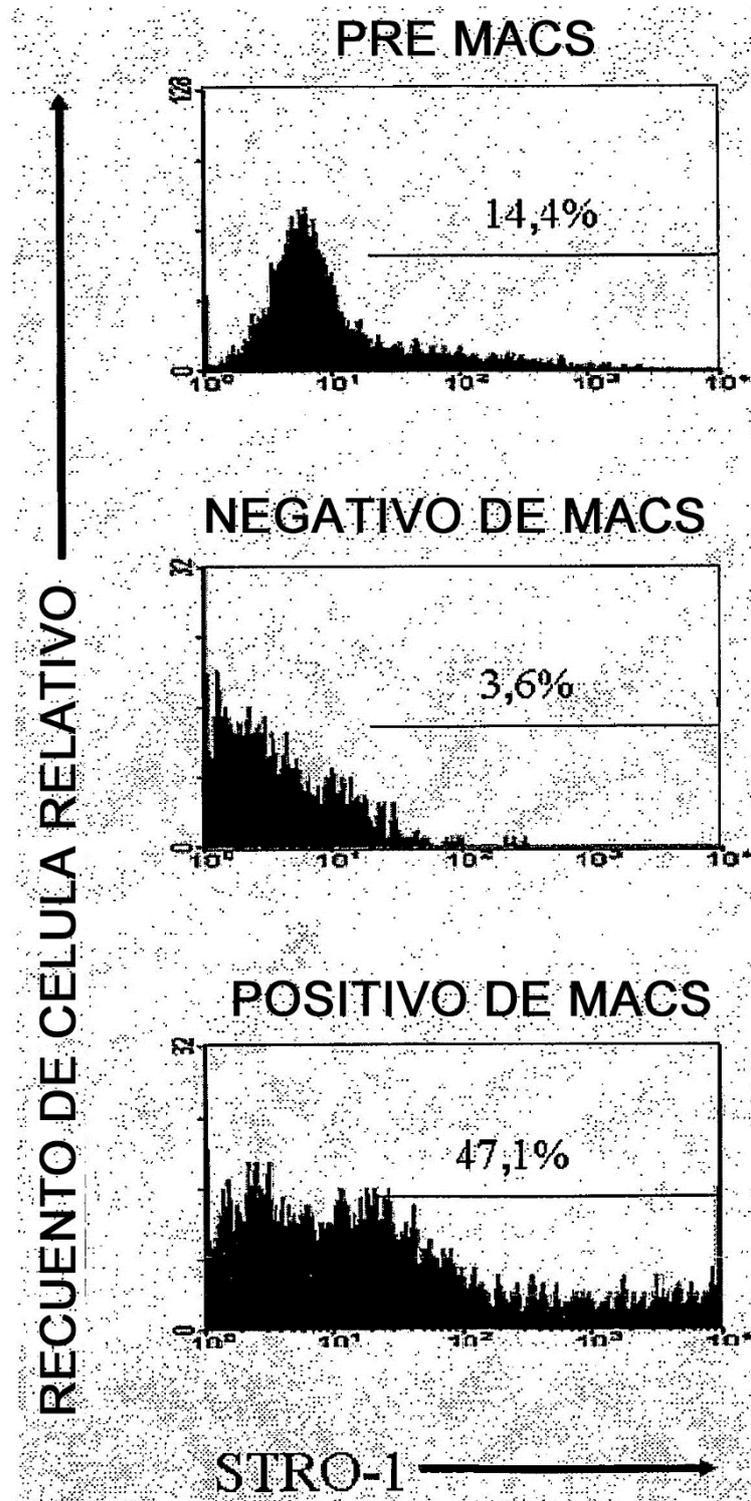


Figura 12

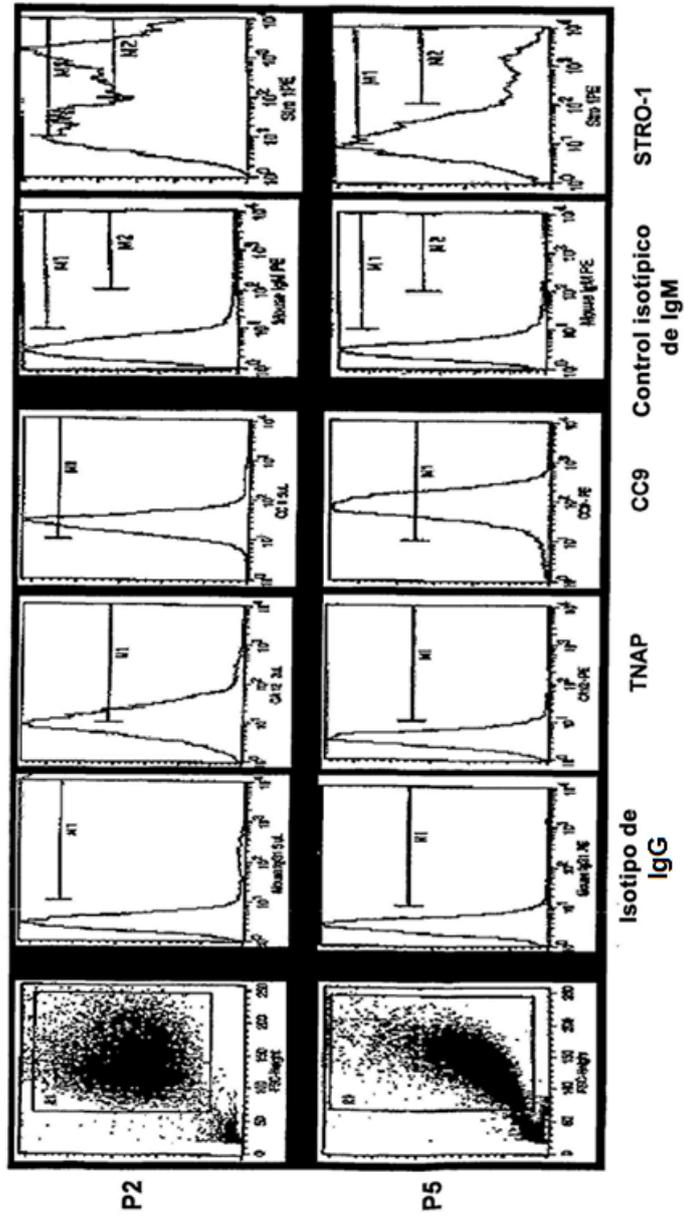


Figura 13

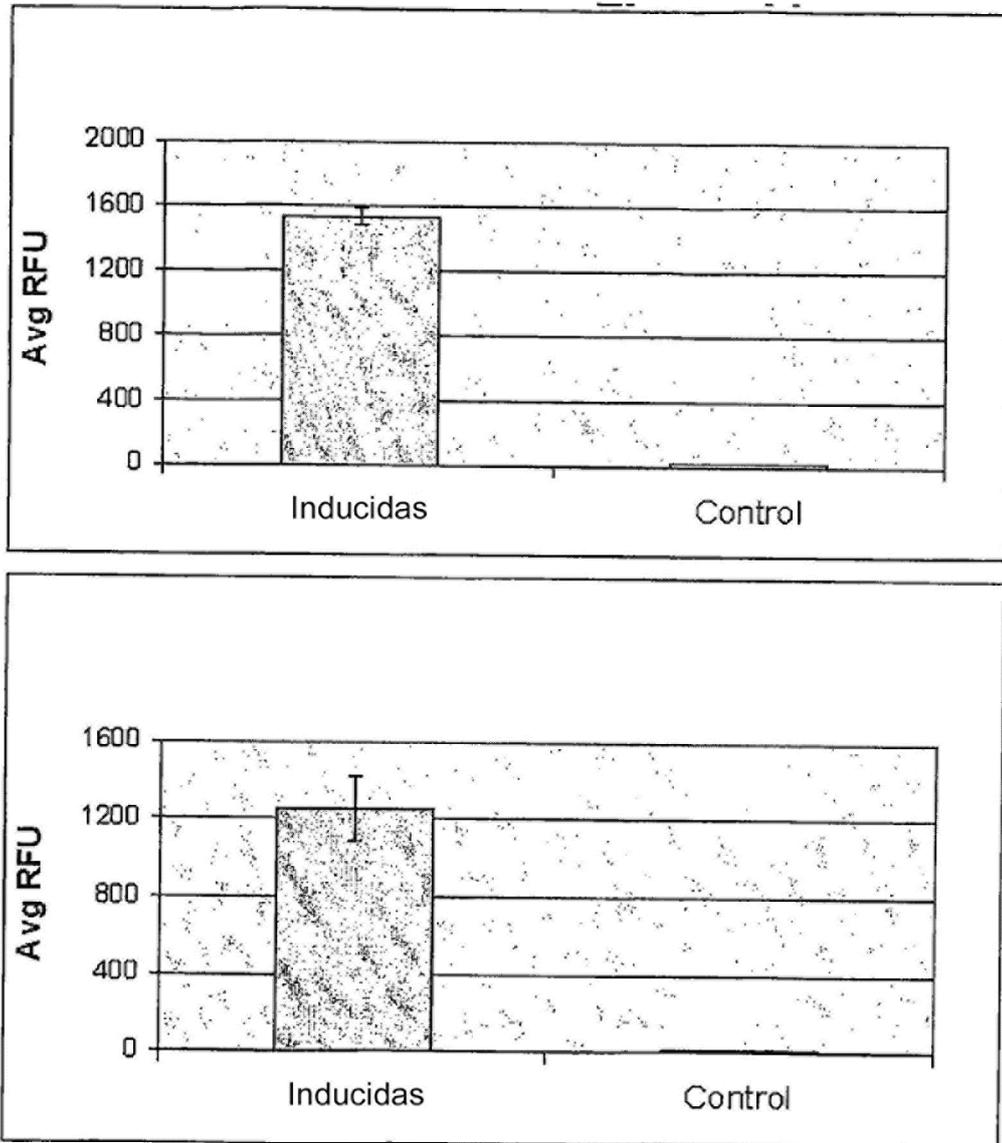


Figura 14

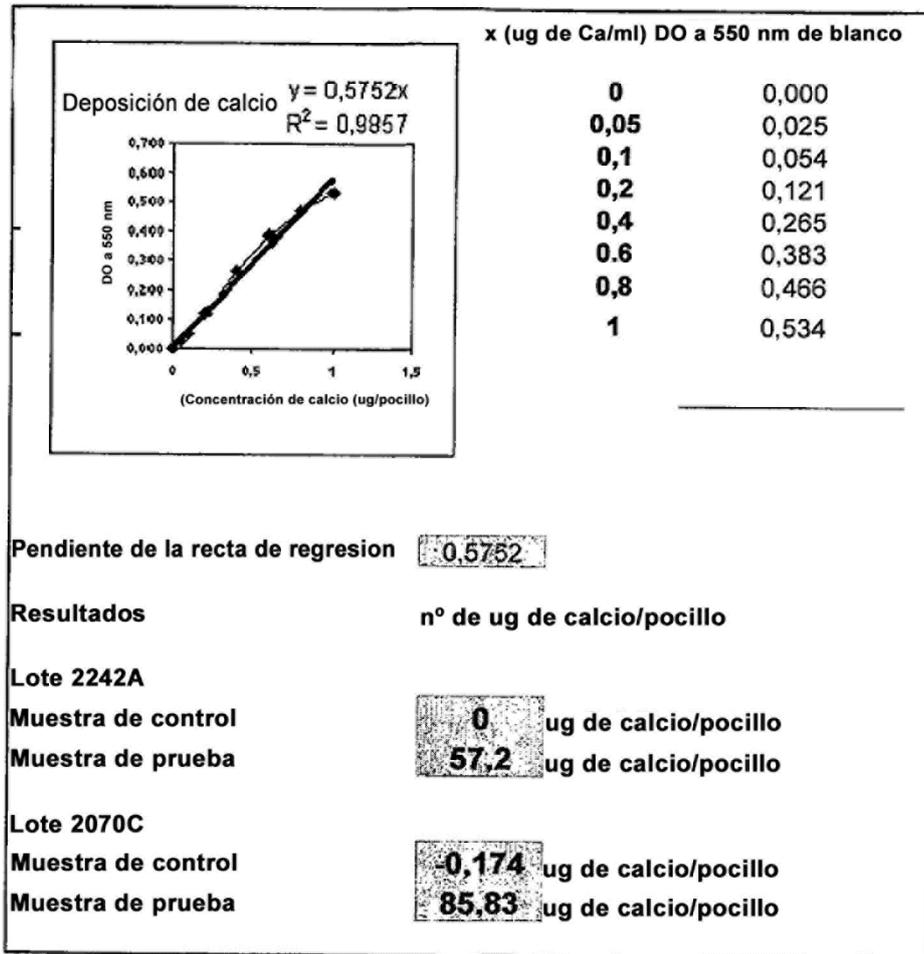


Figura 15

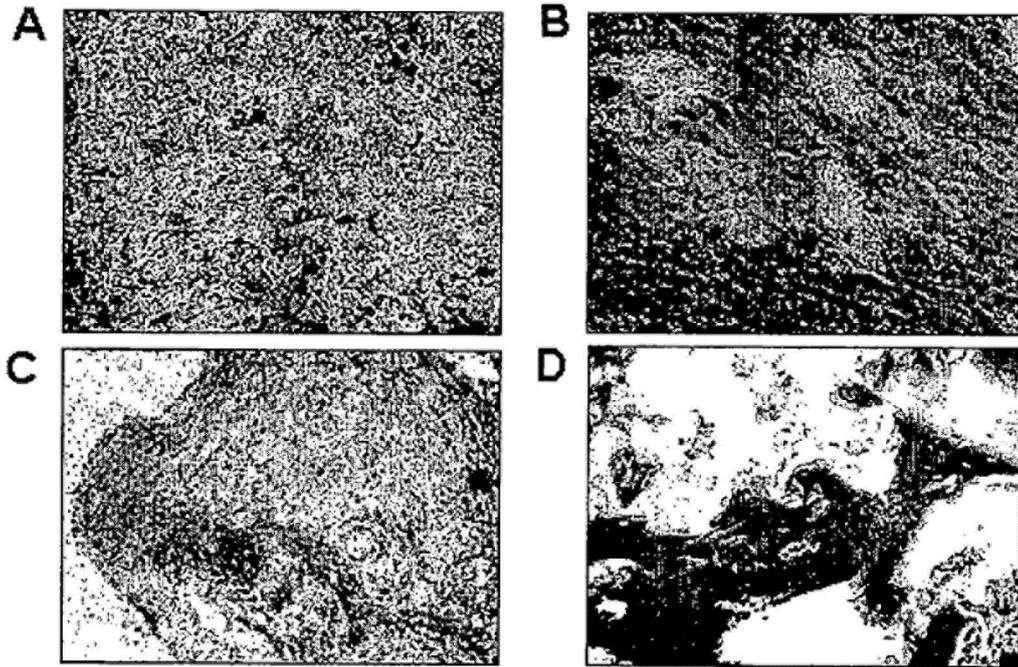


Figura 16

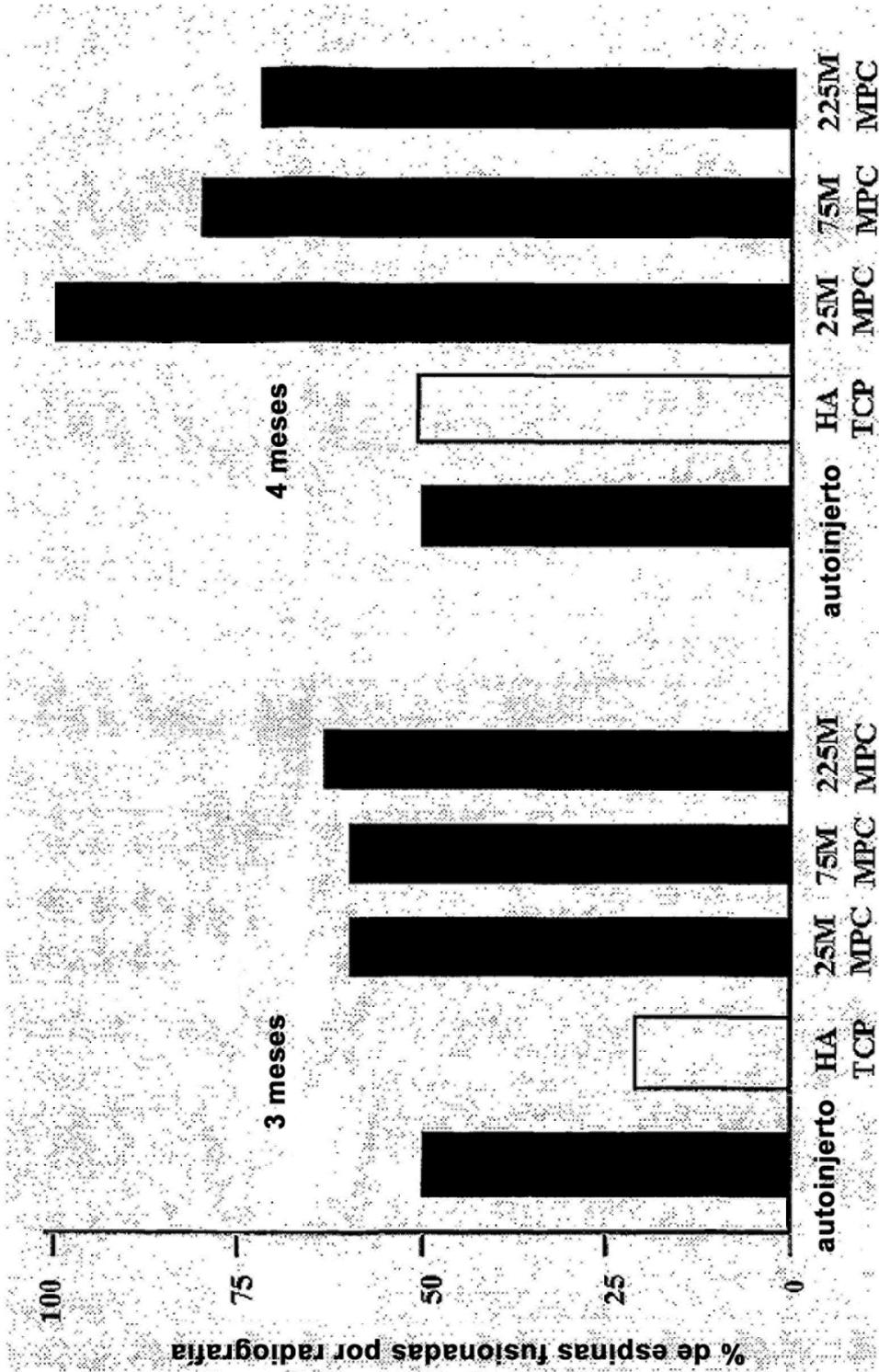


Figura 17

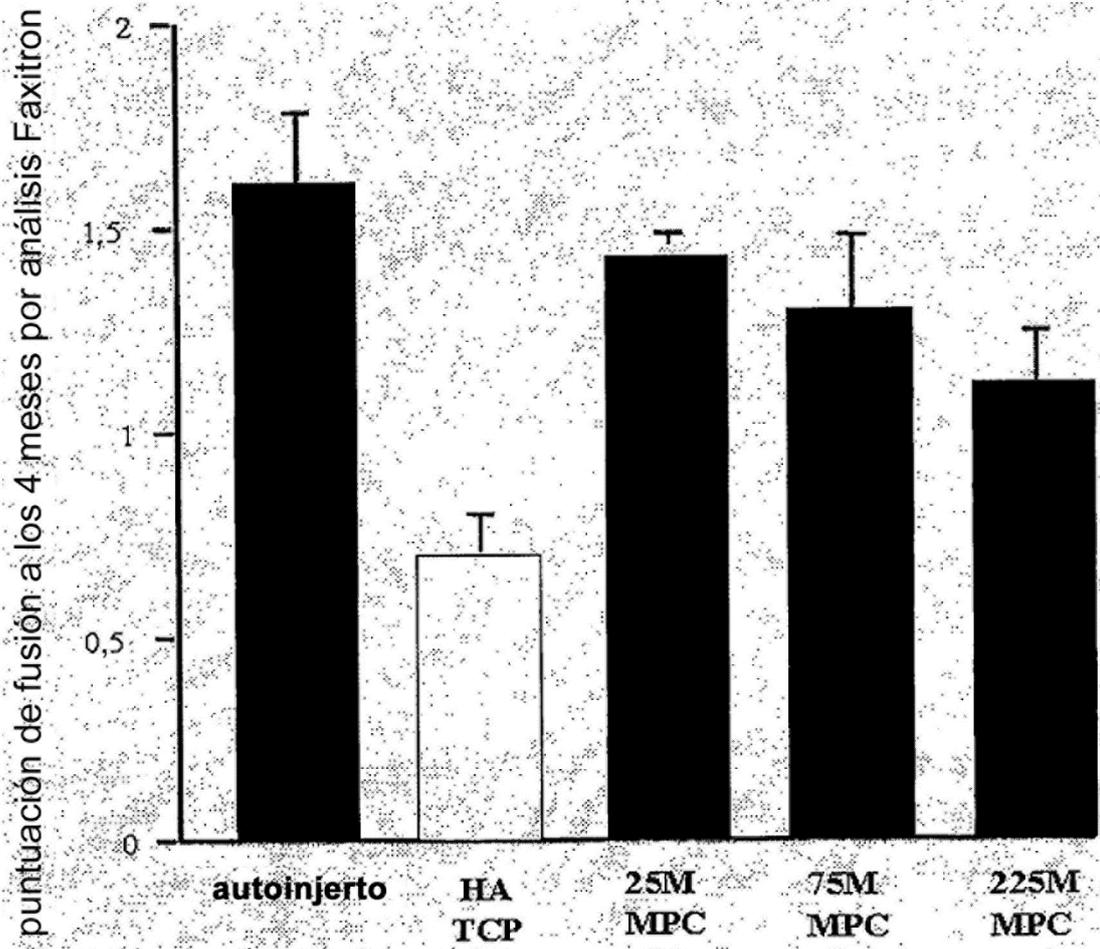


Figura 18

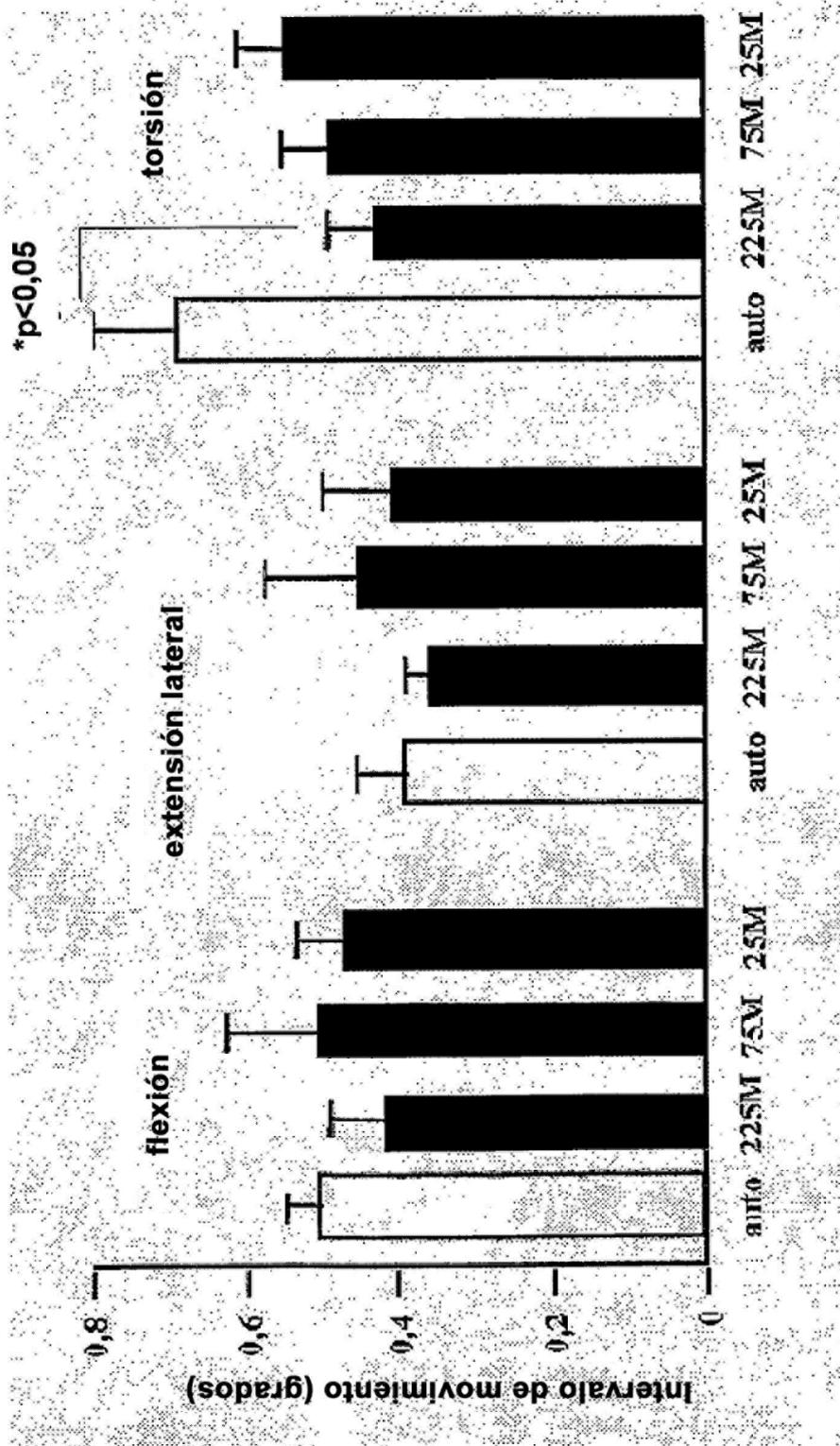


Figura 19

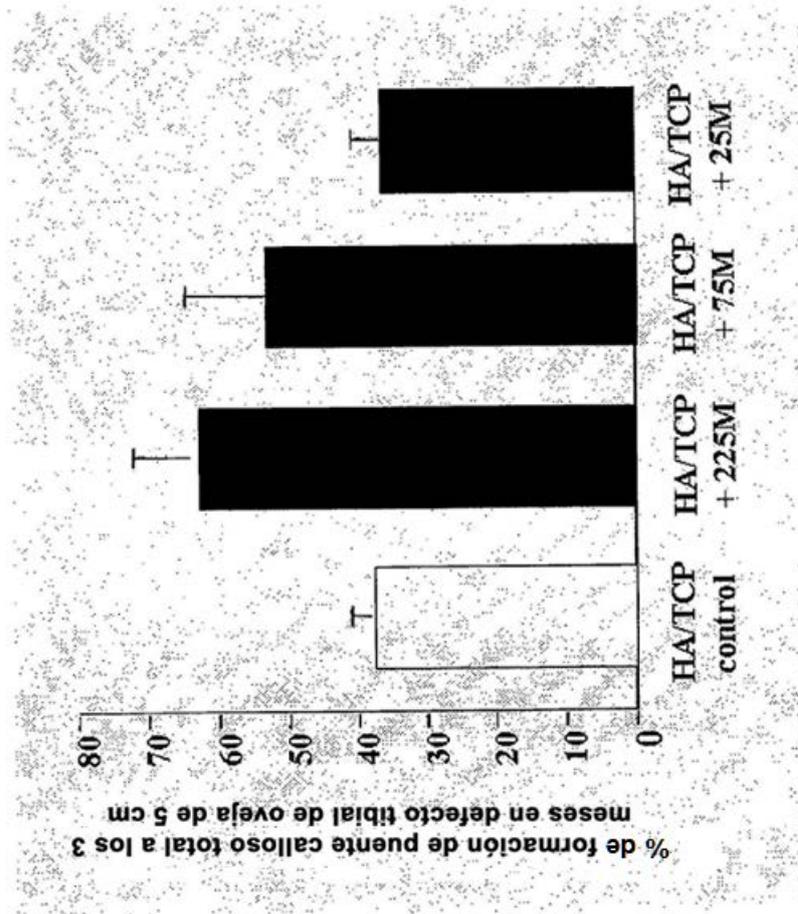


Figura 20

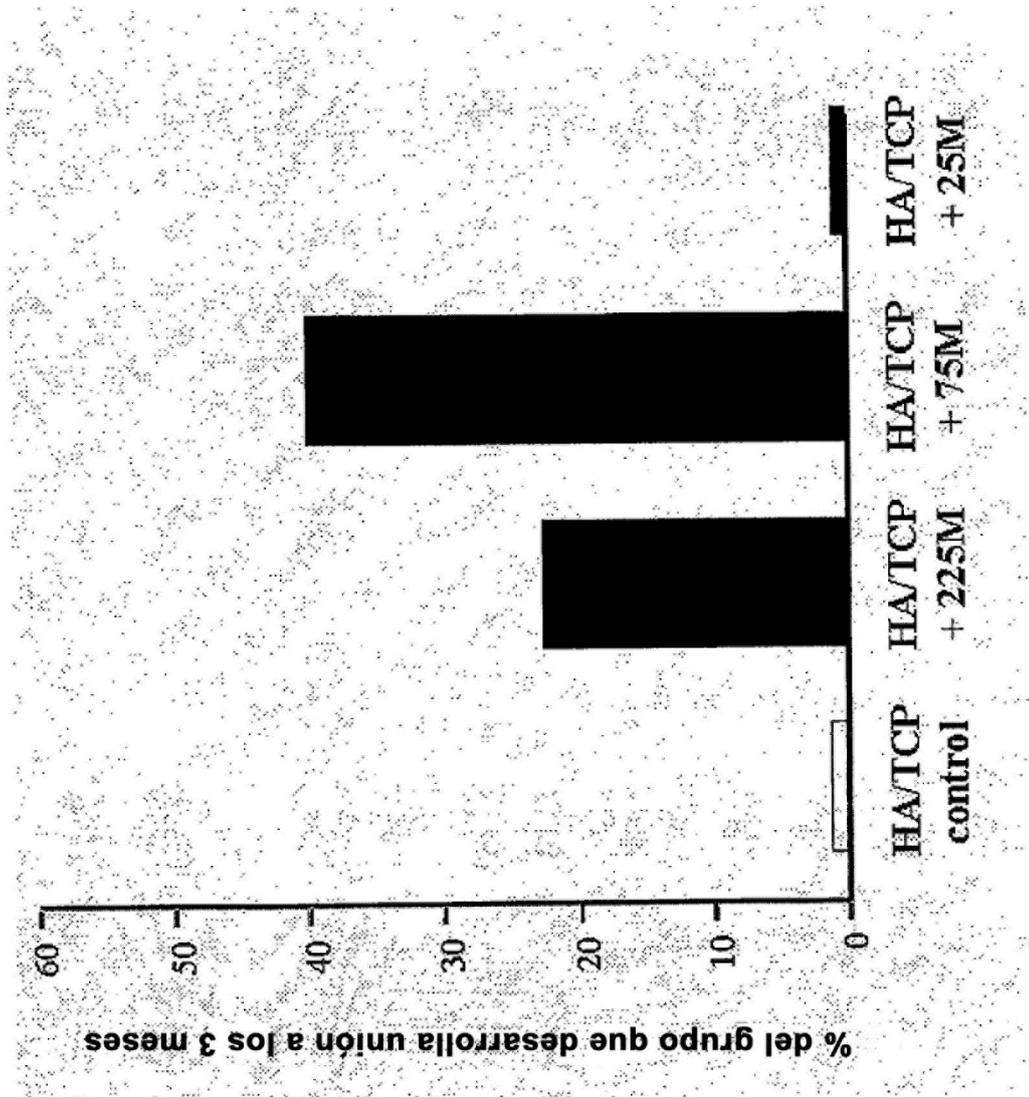


Figura 21

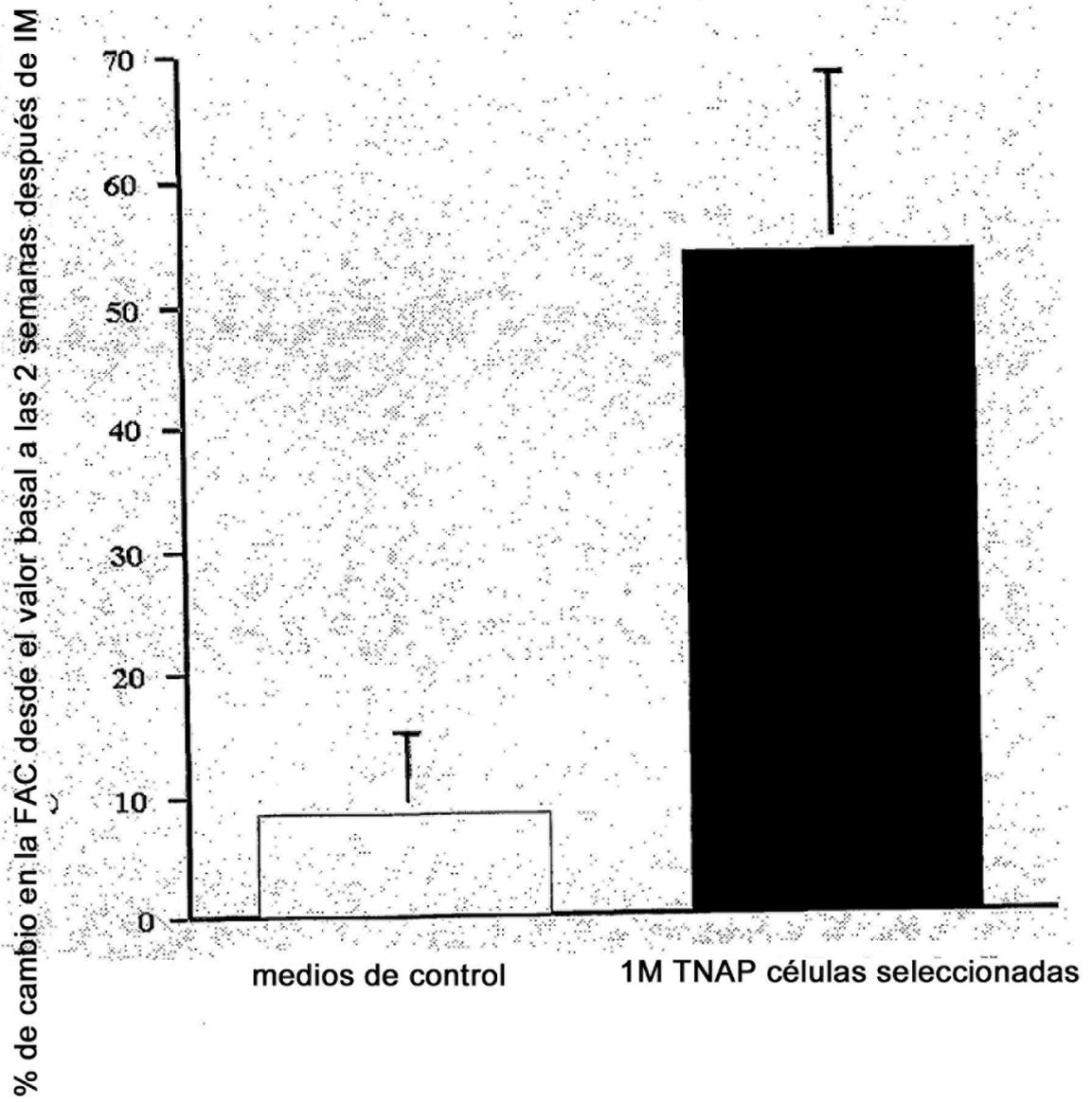


Figura 22

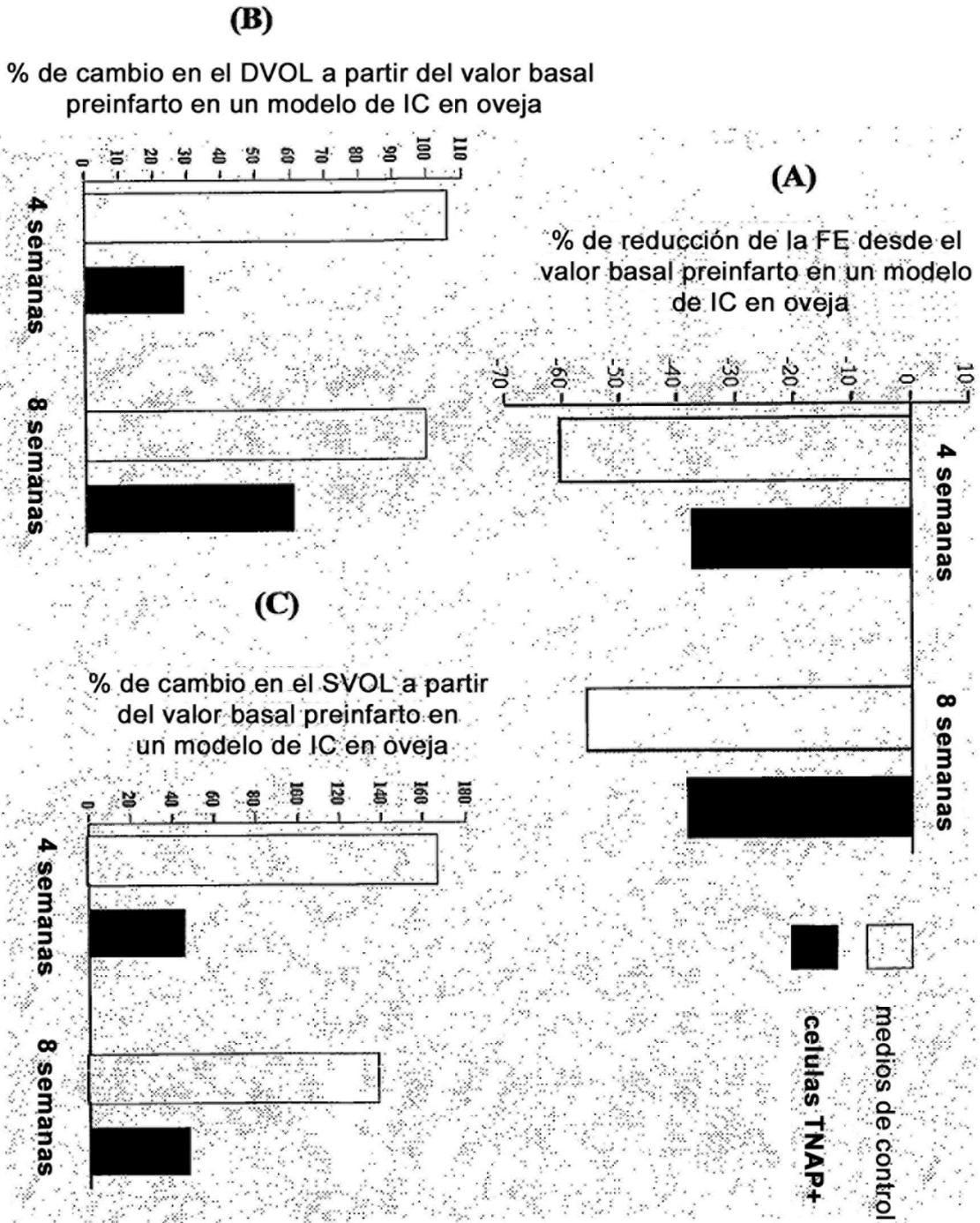


Figura 23

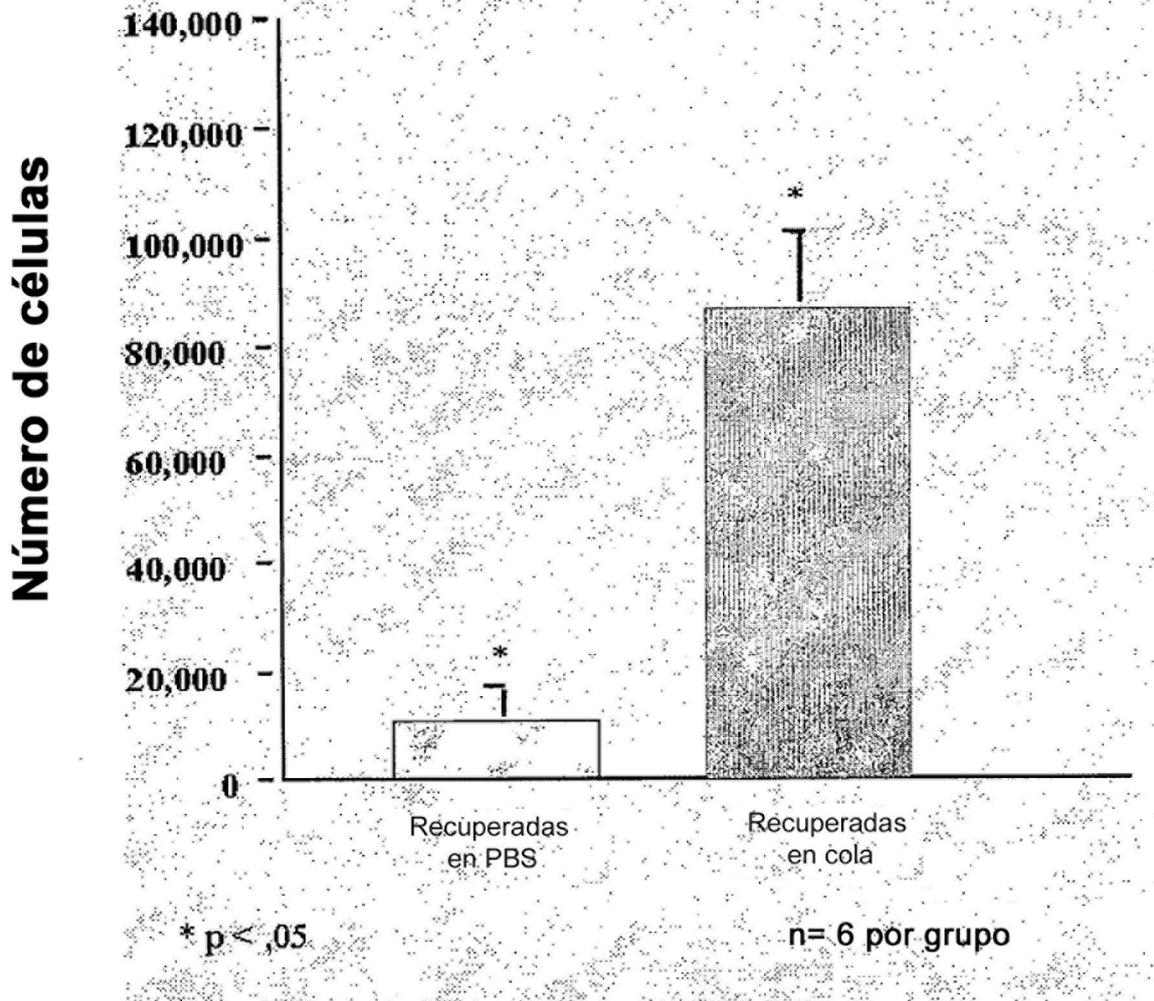


Figura 24