

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 581**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2013 PCT/EP2013/056033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013 E 13720803 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2828663**

54 Título: **Nuevo marcador superficial de MSC**

30 Prioridad:

23.03.2012 DE 102012102532

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

09.01.2019

73 Titular/es:

**EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN
UNIVERSITÄTSKLINIKUM (100.0%)**

**Geissweg 3
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**BUEHRING, HANS-JOERG;
GRIMM, SABRINA y
CERABONA, FLAVIANNA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 695 581 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

Nuevo marcador superficial de MSC

5 La presente invención se refiere al aislamiento y/o a la identificación *in vitro* de células madre mesenquimales de gran pureza mediante nuevos marcadores de la superficie celular, así como al uso de estos marcadores de la superficie celular.

10 Las células madre mesenquimales (MSC), también denominadas células estromales mesenquimales, son células multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tejidos mesenquimales en condiciones apropiadas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, pueden diferenciarse en osteocitos, condrocitos, adipocitos, miocitos y formar tejido óseo, cartilaginoso, adiposo y muscular. Por otra parte, también pueden diferenciarse en astrocitos, neuronas, células endoteliales, hepatocitos, células de tipo pancreático y células epiteliales pulmonares. Morfológicamente se pueden reconocer por su fenotipo fibroblastoide y pueden encontrarse en diversos tejidos humanos adultos y embrionarios, como en el cerebro, en la médula ósea, en la sangre del cordón umbilical, en los vasos sanguíneos, en el músculo esquelético, en la piel, en el hígado, en las encías y en la placenta.

15 Las MSC de médula ósea expresan una serie de marcadores de superficie tales como CD105 (endoglina, SH2), CD73 (ecto-5'-nucleotidasa, SH3, SH4), CD166 (ALCAM), CD29 (integrina β 1), CD44 (H-CAM) y CD90 (Thy-1), que en parte también se encuentran en células endoteliales y epiteliales, así como en células musculares. Sin embargo, las MSC se pueden distinguir de las células madre hematopoyéticas, porque las MSC no expresan los marcadores CD45, CD34 y CD133, que son específicos de las células madre hematopoyéticas.

20 Las MSC tienen la propiedad de adherirse de manera rápida y estable a las superficies de plástico o vidrio, formando colonias de fibroblastos ("unidades formadoras de colonias fibroblásticas" (UFC-F)). Sin embargo, estas últimas son heterogéneas por lo que se refiere a su capacidad de proliferación y diferenciación.

25 Las MSC con un cierto potencial de diferenciación son de gran interés en medicina e investigación: pueden obtenerse especialmente de la médula ósea, incluso de la de personas mayores, tienen una elevada tasa de división y, como se ha dicho, pueden diferenciarse en células tisulares de origen mesenquimal. Por consiguiente, p.ej. en el marco de las terapias con células madre, podrían servir directamente para tratar enfermedades degenerativas de órganos como los huesos, cartílagos, tendones, músculos, tejido conjuntivo, células sanguíneas, etc.

30 Para obtener y aislar las MSC se usan actualmente células de médula ósea no fraccionadas como material de partida. Además de las MSC se adhieren a los frascos de cultivo otras células como macrófagos y células endoteliales. Al cabo de unos momentos definidos las células no adherentes (en su mayoría células hematopoyéticas) se desechan de la muestra. Sin embargo, las células así obtenidas están poco definidas y no se diferencian solo en poblaciones de MSC heterogéneas, sino también en osteoblastos y/o en células precursoras de osteoblastos, células adiposas, células reticulares, macrófagos y células endoteliales. Por tanto, un tratamiento específico de las enfermedades degenerativas de un órgano con MSC, sin un potencial de diferenciación determinado, es difícil o problemático debido a los posibles efectos secundarios.

35 Bühring y otros ("Phenotypic Characterization of Distinct Human Bone Marrow-Derived MSC Subsets [*Caracterización fenotípica de distintos subgrupos de MSC procedentes de la médula ósea humana*], Hematopoietic Stem Cells [*Células madre hematopoyéticas*] VII, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1176:124-134 (2009)) describen dos subgrupos de MSC con diferentes patrones de expresión y distinta morfología y capacidad de diferenciación.

40 El aislamiento de MSC especialmente puras, tanto del tejido primario como de las MSC cultivadas, no es posible ni se conoce según el estado técnico precedente, pero tendría la ventaja de poder usar específicamente tales células madre identificadas en la terapia/tratamiento de tejido enfermo degenerado o dañado, en el cual se diferencian las células madre específicamente aisladas.

45 Así, p.ej., los cartílagos dañados podrían tratarse mediante células madre mesenquimales específicamente aisladas, con potencial de diferenciación condrogénica, ya sea directamente *in situ* en el tejido afectado, donde se diferencian en condrocitos, reemplazando así el tejido dañado (terapia con células madre), o también puede ser interesante una diferenciación en condrocitos *in vitro*, si hay que obtener condrocitos diferenciados destinados p.ej. a investigación/diagnóstico/medicina.

50 Vistos estos antecedentes, la presente invención tiene por objeto proporcionar nuevas vías con las que poder aislar *in vitro* poblaciones de células madre mesenquimales especialmente puras.

55 Según la presente invención este objetivo se logra mediante el uso *in vitro* de al menos un anticuerpo monoclonal que se una al marcador de superficie celular SUSD2 ("*Sushi Domain containing protein 2*" = proteína 2 que contiene el dominio sushi), o de fragmentos funcionales del anticuerpo que se unan al marcador de superficie celular SUSD2, en combinación con al menos un segundo anticuerpo que se una a CD140b (PDGF-RB = receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas) o fragmentos funcionales del anticuerpo, y opcionalmente con un tercer anticuerpo

que se una a TNAP (“*tissue non-specific alkaline phosphatase*” = fosfatasa alcalina no específica de tejido) y/o CD56, o fragmentos funcionales del anticuerpo. Mediante el uso combinado *in vitro* de al menos estos dos anticuerpos se incrementa la intensidad de la señal en la marcación, lo cual permite lograr una purificación más efectiva durante la selección.

5 El objetivo también se logra mediante un método *in vitro* para el aislamiento y/o identificación de MSC, en el cual se usan los anticuerpos que se unen a SUSD2 y CD140b y opcionalmente los anticuerpos que se unen a TNAP y/o CD56.

10 La presente revelación también describe las células madre aisladas de esta forma y su uso, sobre todo terapéutico.

El objeto subyacente de la presente invención se resuelve completamente de esta forma. Los inventores de la presente solicitud de patente pudieron demostrar en ensayos propios que es posible aislar MSC especialmente puras usando dichos anticuerpos. Éstas a continuación pueden diferenciarse o ser diferenciadas en condrocitos, osteoblastos y adipocitos en condiciones adecuadas *in vivo* o *in vitro*.

15 En concreto se prepara una herramienta mediante el nuevo marcador superficial identificado SUSD2, la cual permite identificar selectivamente por primera vez, en combinación con CD140b y opcionalmente además con CD56 y/o TNAP, células MSC que constituyan una subpoblación de MSC particularmente pura.

20 La SUSD2 es una proteína integral de membrana que comprende 822 aminoácidos y ha sido detectada hasta ahora en células de órganos tales como amígdalas, pulmones, intestinos y riñones. Su secuencia y demás indicaciones se encuentran en la base de datos UniProt (www.uniprot.org) bajo la entrada Q9UGT4, a la cual se hace aquí referencia explícita. Hasta la fecha no se ha expuesto en el estado técnico ninguna relación con la expresión de esta proteína de membrana en células madre mesenquimales.

25 Gracias al nuevo uso *in vitro* y al nuevo método *in vitro* se pueden preparar MSC, que a su vez pueden emplearse ventajosamente p.ej. en terapia y profilaxis o en diagnóstico e investigación. Así, las células madre aisladas de esta forma se pueden usar en particular para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un tejido degenerado, lesionado o dañado, p.ej. en el marco de una terapia con células madre: para ello las células madre aisladas mediante el método *in vitro* según la presente invención se trasplantan al tejido afectado (p.ej. también en conexión con ciertos implantes), y allí se diferencian en el tejido correspondiente. De este modo el tejido degenerado se regenera y recupera su funcionalidad.

30 El nuevo método *in vitro* permite identificar y aislar con gran pureza las células madre mesenquimales, tanto de tejidos primarios como de células cultivadas.

35 Por lo tanto, según la presente invención se pueden emplear anticuerpos anti-SUSD2 en combinación con anticuerpos anti-CD140b, así como esta combinación más anticuerpos anti-TNAP y/o anticuerpos anti-CD56, en el método *in vitro* según la presente invención.

40 En una forma de ejecución preferida de la invención, el anticuerpo - al menos uno - que se une a la SUSD2 se elige entre:

- 45 - los anticuerpos W5C5 o W3D5 o una mezcla de estos dos anticuerpos, producidos respectivamente mediante líneas celulares de hibridoma y consignados el 21 de febrero de 2007 según el Tratado de Budapest en la Colección alemana de cultivos celulares y microorganismos con los respectivos números de depósito DSM ACC2813 (W5C5) y DSM ACC2815 (W3D5),
- fragmentos funcionales del anticuerpo W5C5 o W3D5 todavía capaces de unirse al mismo epítipo, como los anticuerpos W5C5 y W3D5 completos, y
- 50 - anticuerpos monoclonales que se unen respectivamente al mismo epítipo que los anticuerpos W5C5 o W3D5.

55 En particular se prefiere el uso del anticuerpo W5C5 y/o del anticuerpo W3D5. Para los dos anticuerpos W5C5 o W3D5 o la mezcla de estos dos anticuerpos, producidos por líneas celulares de hibridoma y consignados el 21 de febrero de 2007 según el Tratado de Budapest en la Colección alemana de cultivos celulares y microorganismos con los números de depósito DSM ACC2813 (W5C5) y DSM ACC2815 (W3D5), se solicitó la prórroga del depósito. También se pueden usar ventajosamente fragmentos funcionales o relevantes para la unión de estos anticuerpos. En este caso se entiende por fragmentos “funcionales” o “relevantes para la unión” cualquier fragmento de los anticuerpos, o una secuencia derivada de los mismos, que aún es capaz de unirse al mismo epítipo, como el respectivo anticuerpo completo.

60 Los anticuerpos W5C5 y W3D5 se unen a diferentes epítopos de la SUSD2; pero, a pesar de que estos anticuerpos están disponibles según el estado técnico, hasta la fecha no se conoce el antígeno al que se unen estos anticuerpos.

Según un perfeccionamiento del uso conforme a la presente invención, es preferible que el anticuerpo anti-CD140b se elija del grupo formado por:

- 65 - el anticuerpo 28D4,

- fragmentos funcionales del anticuerpo 28D4, y
- un anticuerpo que se una al mismo epítipo como el anticuerpo 28D4.

5 Se conocen diversos anticuerpos anti-CD140b, que pueden adquirirse p.ej. de GenWay Biotec, San Diego, EUA, RayBiotech Inc., Norcross, EUA, AbD Serotec, Raleigh, EUA, BD Biosciences, San José, EUA, Millipore Upstate Biotecnología, EUA, Biolegend, San Diego, EUA, etc.

10 El anticuerpo 28D4 específico para CD140b se puede adquirir p.ej. a BD Biosciences, EUA, y en otros estudios se ha demostrado que es un marcador de MSC. Sin embargo, no se sabía hasta la fecha que se puede usar una combinación de anticuerpos dirigidos contra SUSD2 y CD140b para obtener subpoblaciones de células madre mesenquimales muy puras.

15 Según un perfeccionamiento del uso conforme a la presente invención, es preferible que el anticuerpo anti-TNAPA se elija del grupo formado por:

- el anticuerpo W8B2 producido por la línea celular depositada con el número ACC2567 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
- fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2 producidos por la línea celular depositada con el número ACC2567 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, y
- 20 - un anticuerpo que se una al mismo antígeno o epítipo como el anticuerpo W8B2.

25 Según otros estudios se ha demostrado que el anticuerpo específico de TNAP W8B2 es un marcador de MSC. Sin embargo, no se sabía hasta la fecha que una combinación de anticuerpos dirigidos contra SUSD2 y TNAP permitiera obtener subpoblaciones muy puras de células madre mesenquimales. Las células productoras del anticuerpo W8B2 se depositaron el 14 de agosto de 2002 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ), según el Tratado de Budapest, asegurando la prórroga de su depósito.

En una forma de ejecución preferida, el anticuerpo que se une a CD56 se selecciona del grupo formado por:

- 30 - el anticuerpo 39D5 producido por la línea celular depositada con el número DSM ACC 2930 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
- fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5 producido por la línea celular depositada con el número DSM ACC 2930 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, y
- 35 - un anticuerpo que se una al mismo epítipo, como el anticuerpo 39D5, producido por la línea celular depositada con el número DSM ACC 2930 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

40 En una forma de ejecución del uso *in vitro* según la presente invención se prefiere el empleo de un anticuerpo dirigido contra CD271 o fragmentos funcionales del mismo, además de la combinación de un anticuerpo anti-SUSD2 y un anticuerpo anti-CD140b, y dado el caso un anticuerpo dirigido contra CD56 y/o TNAP.

45 Del modo usado en la presente solicitud de patente y explicado anteriormente, los términos fragmentos “funcionales” o “relevantes para la unión” se refieren a sustancias que son partes/secciones de los anticuerpos revelados y que aún muestran y poseen sus características funcionales, sobre todo las propiedades de unión celular de los anticuerpos de los cuales se derivan. Estos fragmentos se pueden usar como tales o en combinación con otros fragmentos; en este caso también se revelan los anticuerpos modificados W5C5, W3D5, W8B2, 39D5 y 28D4, que se han adaptado, p.ej. humanizado, para usarlos y aplicarlos adecuadamente a las personas.

50 Por tanto según la presente invención se pueden usar las siguientes combinaciones para el aislamiento/identificación *in vitro* de MSC altamente purificadas: W5C5 y/o W3D5 con anticuerpos anti-CD140b, en particular 28D4; W5C5 y/o W3D5 con anticuerpos anti-CD140b, en particular 28D4, y con anticuerpos anti-CD56 o anticuerpos anti-TNAP; o W5C5 y/o W3D5 con anticuerpos anti-CD140b, en particular 28D4, anticuerpos anti-CD56, en particular anticuerpos 39D5 y anti-TNAP, en particular W8B2.

55 Los anticuerpos adecuados para los propósitos de la presente invención son monoclonales y se pueden obtener otros anticuerpos dirigidos contra SUSD2, CD140b, TNAP o CD56 usando los anticuerpos W5C5 y W3D5, 28D4, W8B2 y 39D5. Existe una guía para la obtención de anticuerpos monoclonales publicada por Köhler y Milstein (“*Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity* [Cultivos continuos de células fusionadas secretoras de anticuerpos de especificidad predefinida]”, Nature, (1975), 256: 495-497).

60 Sin embargo, en este caso también entran en consideración fragmentos de tales anticuerpos, como p.ej. Fab, F(ab)² o fragmentos scFv, y otros fragmentos tales como los CDR (“región determinante de la complementariedad”, región hipervariable) como anticuerpos en el sentido y marco de la presente invención, siempre que posean su funcionalidad, es decir, que tengan las propiedades de unión específicas como los anticuerpos “completos” de los cuales se derivan. Dichos fragmentos de anticuerpo también pueden se producir p.ej. de forma recombinante, usando métodos conocidos del estado técnico.

65

Los anticuerpos W5C5, W3D5 y 28D4 también se pueden humanizar de manera apropiada y también se pueden usar en una terapia con células madre.

5 Los anticuerpos humanizados son p.ej. anticuerpos quiméricos en los que las regiones constantes de los anticuerpos animales (p.ej. anticuerpos de ratón o conejo) se han reemplazado por las correspondientes regiones de anticuerpos humanos, p.ej. por los fragmentos Fc (Sharon y otros, Nature, (1984), 309: 364-367). Como alternativa también se puede unir la CDR de los anticuerpos animales a anticuerpos humanos; este proceso se denomina "remodelación" de anticuerpos. Según otro método adicional se producen anticuerpos humanos en animales transgénicos.

10 Los anticuerpos se pueden incorporar o aplicar, p.ej. en forma humanizada o de fragmentos funcionales de los mismos, a dispositivos médicos implantables apropiados, e introducir junto con el dispositivo en los sitios/tejidos dañados del paciente sometido a tratamiento. Luego, en los sitios tratados mediante los anticuerpos se incorporan células madre mesenquimales que se adhieren al implante, se diferencian y por consiguiente forman tejido nuevo. En tal caso, como dispositivo médico sirve cualquier tipo de implante biocompatible o endoprótesis, p.ej. stents, etc., que se introduce de forma permanente o temporal en el paciente. Opcionalmente los dispositivos también pueden estar constituidos por materiales total o parcialmente reabsorbibles y llevar, además de los anticuerpos, otros principios activos terapéuticos normalmente empleados en los implantes/trasplantes que deben introducirse en un cuerpo.

20 Como ya se ha mencionado anteriormente, la presente invención también se refiere a un método *in vitro* para aislar y/o identificar células madre mesenquimales, que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) poner en contacto una muestra que contenga células madre mesenquimales con al menos un anticuerpo que se una al antígeno SUSD2, o con fragmentos funcionales del anticuerpo,
 b) opcionalmente poner en contacto una muestra que contenga células madre mesenquimales con otro anticuerpo que se una al antígeno SUSD2, o con fragmentos funcionales del anticuerpo,
 30 c) poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que se una a CD140b, y opcionalmente con un anticuerpo que se una a CD56 y/o TNAP y/o CD271, o con fragmentos funcionales del anticuerpo, y/o
 d) aislar y/o identificar células a las que se haya unido i) al menos un anticuerpo, o fragmentos del mismo, que se une al antígeno SUSD2, y ii) al menos un anticuerpo que se une a CD140b, y opcionalmente iii) al menos un anticuerpo que se une a CD56, TNAP y/o CD271.

35 Con esta forma de ejecución del método *in vitro* según la presente invención se pueden identificar y/o aislar células madre mesenquimales de gran pureza, y en particular aquellas que tienen un potencial de diferenciación condrogénica. Las células madre obtenidas de este modo se pueden usar directamente en el marco de una terapia con células madre (terapia autóloga o alogénica), mediante la cual se diferencian *in situ* en condrocitos y por lo tanto pueden regenerar el tejido cartilaginoso degenerado o dañado.

40 Por otro lado, las MSC obtenidas con el método *in vitro* según la presente invención también pueden diferenciarse en condrocitos, primero *in vitro*, y a continuación utilizarse para el tratamiento del tejido enfermo o degenerado.

45 Sobre todo, en los últimos años, el trasplante autólogo de condrocitos se ha convertido en una intervención preferida para el tratamiento de los defectos del cartílago (en las articulaciones) de los discos intervertebrales y de la rodilla en los cuales hay que reconstituir el cartílago hialino. Para ello se toman muestras del paciente mediante una artroscopia de una porción no dañada de la articulación y las células cartilaginosas que contiene se cultivan en el laboratorio sobre matrices especiales. El tejido resultante, es decir el nuevo cartílago, se trasplanta luego a la articulación enferma o degenerada mediante una segunda operación que protege el tejido existente.

50 Ahora, el método *in vitro* de la presente invención permite por primera vez aislar selectivamente células madre, p.ej. con potencial de diferenciación condrogénica, del tejido de un paciente y el cultivo rápido, eficiente y específico de un tejido de condrocitos para su posterior trasplante al donante de las muestras (trasplante autólogo) o a otro receptor (trasplante alogénico).

55 Como se ha explicado anteriormente, en el método según la presente invención se prefiere elegir el anticuerpo anti-SUSD2 del grupo formado por:

- 60 - los anticuerpos W5C5 o W3D5s o una mezcla de estos anticuerpos, producidos respectivamente mediante líneas celulares de hibridoma consignadas el 21 de febrero de 2007 conforme al Tratado de Budapest con los números de depósito DSM ACC2813 (W5C5) y DSM ACC2815 (W3D5) en la Colección alemana de cultivos celulares y microorganismos,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo W5C5 o W3D5, todavía capaces de unirse al mismo epítipo como los anticuerpos W5C5 y W3D5 completos, y
 - anticuerpos monoclonales que se unan respectivamente al mismo epítipo, como los anticuerpos W5C5 o W3D5.

65 Asimismo, en el método según la presente invención se prefiere elegir el anticuerpo anti-CD140b del grupo formado por:

- el anticuerpo 28D4,
- fragmentos funcionales del anticuerpo 28D4, y
- anticuerpos que se unan al mismo epítipo, como el anticuerpo 28D4.

5 Además, en un perfeccionamiento del método según la presente invención se prefiere elegir el anticuerpo que se une a CD56 del grupo formado por:

- el anticuerpo 39D5 producido mediante la línea celular de hibridoma depositada en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares con el número DSM ACC 2930,
- 10 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, y
- anticuerpos que se unan al mismo antígeno o epítipo, como el anticuerpo 39D5 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

15 Tal como se ha explicado anteriormente para el uso *in vitro* según la presente invención, en el método *in vitro* de la presente invención se pueden usar uno o más anticuerpos antiSUSD2, en particular los anticuerpos W5C5 y W3D5 o una combinación de ambos anticuerpos, en concreto con un anticuerpo anti-140b, u opcionalmente en combinación con una mezcla de anticuerpos anti-140b, anti-CD56 y anti-TNAP, prefiriéndose los anticuerpos 28D4 (CD140b), 39D5 (CD56) y W8B2 (TNAP).

20 Los presentes inventores han comprobado en ensayos propios que utilizando el anticuerpo W5C5 y/o W3D5 en un método *in vitro* para el aislamiento/identificación de células madre mesenquimales se podía lograr un enriquecimiento selectivo de células madre mesenquimales de gran pureza.

25 En el marco de la presente invención se ha observado que las células madre aisladas y/o identificadas mediante los métodos *in vitro* de la presente invención se pueden usar en terapia, diagnosis o investigación.

Las células madre obtenidas con el método *in vitro* según la presente invención se pueden utilizar para la generación definida de condrocitos, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

30 Las células madre aisladas y/o identificadas mediante el método *in vitro* según la presente invención, que se hayan diferenciado en condrocitos, también se pueden usar en la terapia y/o en la profilaxis de tejido degenerado o delicado.

35 Las células madre obtenidas con el método *in vitro* según la presente invención se pueden emplear en la terapia y/o profilaxis de las lesiones, degeneraciones o enfermedades de los cartílagos y/o de los huesos, sobre todo de la rodilla y de los discos intervertebrales, o de la artritis reumatoide. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune, y en esta enfermedad también se pueden usar células madre para reemplazar tejidos (es decir, para la llamada "reparación de tejidos").

40 La presente descripción también revela una composición farmacéutica y un kit que contienen una combinación de al menos uno de los anticuerpos W5C5 o W3D5, o ambos, con el anticuerpo 28D4, W8B2 o 39D5.

45 La presente descripción revela asimismo una composición farmacéutica que contiene células madre aisladas y/o identificadas mediante el método según la presente invención, así como al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente sustancias terapéuticamente efectivas.

Por "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende aquí cualquier sustancia/composición que se administra en farmacia a un paciente, sin afectar adversamente a la efectividad de las células/anticuerpos, y/o que puede favorecer o facilitar el uso farmacológico de la composición farmacéutica.

50 Por "sustancia terapéuticamente activa" se entiende aquí cualquier sustancia utilizada con el fin de tratar o mejorar un cuadro clínico de un paciente.

55 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar sistémicamente, es decir, p.ej. por vía oral, subcutánea, intravenosa, rectal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica o tópica. El modo de administración depende de la naturaleza de la enfermedad, del cuadro clínico y del estado de los pacientes. Del mismo modo, la administración puede tener lugar repetidamente o una sola vez, en el primer caso una o varias veces al día y/o durante un período de tiempo más largo.

60 Además de las sustancias activas, la composición farmacéutica también puede contener tampones, diluyentes y/o aditivos. Los tampones adecuados incluyen p.ej. Tris-HCl, glicina y fosfato, y los diluyentes adecuados p.ej. soluciones acuosas de NaCl, lactosa o manitol. Los aditivos adecuados incluyen p.ej. detergentes, disolventes, antioxidantes y conservantes. P.ej. en A. Kibbe: "Handbook of Pharmaceutical Excipients [Manual de excipientes farmacéuticos]", 3ª edición, 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, se encuentra un resumen de dichos ingredientes adicionales.

65

La presente invención se explica con más detalle en la siguiente descripción y en las figuras adjuntas, en las cuales se muestra:

Fig. 1: UFC-F de células de médula ósea SUSD2+ (W5C5).

Se marcaron células de médula ósea con CD271-APC, CD45 Brilliant Violet, CD56-FITC y W5C5-PE. Se fijó una ventana sobre la población de CD271+CD45-MSD y a continuación una ventana de clasificación en el área resultante, sobre las poblaciones de W5C5+cd56 y W5C5+CD56+. Después de la clasificación se examinó la capacidad (número) de formación de colonias (UFC-F) de cada población.

Fig. 2: identificación de SUSD2:

Los anticuerpos W5C5 y W3D5 reconocen las células HEK-293 transfectadas con el gen SUSD2: los gráficos FACS muestran las tinciones de control de ambos tipos de células (es decir, células HEK-293 no transfectadas (**A**) y células HEK-293 transfectadas con SUSD2 (**B**), así como las tinciones específicas con los anticuerpos respectivos (células HEK.293 no transfectadas (**C**) y células HEK293 transfectadas con SUSD2 (**D**)).

Ejemplos

Materiales y métodos

Aislamiento de células de médula ósea y células mononucleares de sangre periférica.

Después de la aclaración y del consentimiento informado, en la clínica del seguro de accidentes laborales se obtuvo médula ósea del eje femoral de pacientes que habían recibido una articulación artificial después de las operaciones de cadera. Se obtuvo sangre periférica de donantes sanos, procedente del departamento de transfusiones del Centro clínico universitario de Tübingen. Las células mononucleares de la médula ósea y las células mononucleares de la sangre se aislaron mediante fraccionamiento por gradiente de densidad de Ficoll y los eritrocitos restantes se lisaron en una solución de cloruro amónico.

Cultivo de las células primarias

Las células de médula ósea separadas por Ficoll y enriquecidas por FACS se cultivaron del modo anteriormente descrito: células BM MSCA-1⁺CD56⁺ y MSCA-1⁺CD56⁻ (2 x 10⁷ no fraccionadas o 1 x 10⁴ clasificadas) cultivadas en frascos T-75 o T-25 recubiertos con gelatina, en presencia de 20 ml o 6 ml de medio sustitutivo Knockout™ (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y 5 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico humano recombinante (rh-bFGF; CellSystems, Remagen, Alemania). Tras un cultivo de tres días se eliminaron las células no adherentes y se añadió medio fresco. Las células adherentes se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 90%.

Ensayo de formación de colonias de fibroblastos (UFC-F)

Los ensayos de UFC-F se llevaron a cabo sembrando células de médula ósea (1 x 10⁵ no seleccionadas o 500-5.000 seleccionadas por FACS) en frascos T-25 recubiertos con gelatina que contenían medio Knockout™ y 5 ng/ml de rh-bFGF. Después de 12 días de cultivo, las células adherentes se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con metanol a temperatura ambiente durante cinco minutos (Sigma-Aldrich), se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania). Las colonias UFC-F se contaron macroscópicamente. El tamaño de las colonias varió entre 1 y 8 mm de diámetro.

Análisis de inmunofluorescencia y clasificación celular

Anticuerpos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: W5C5 (SUSD2), W3D5 (SUSD2) y W8B2 (TNAP). El CD56-FITC (clon NCAM16.2) se adquirió de Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania). El anticuerpo reactivo SSEA-4 MC-813-70 se adquirió a Chemicon (Hampshire, Reino Unido). Los anticuerpos CD271-APC y SUSD2-PE y el anticuerpo SUSD2 acoplado a microesferas MACS se adquirieron a Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach.

Tinción inmunofluorescente: después del bloqueo y las fijaciones específicas con 10 mg/ml de Polyglobin (10 min., 4°C) se incubaron las células durante 15 minutos con 20 µl de anticuerpos o con 10 µl de anticuerpos conjugados con fluorocromo. Las células teñidas con los conjugados se lavaron dos veces, se suspendieron en 200 µl de tampón FACS y se usaron en la citometría de flujo. Las células marcadas con los anticuerpos se tiñeron durante 15 minutos con 20 µl de un fragmento F(ab)₂ del anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a R-ficoeritrina (PE) (Dako Cytomations, Glostrup, Dinamarca), se lavaron dos veces y se analizaron por citometría de flujo. Para la multitinción, las células se pusieron en contacto durante 15 minutos con 10 µl de un anti-CD56-FITC, AntiTNAP-APC y anti-SUSD2-PE. Después del lavado, las células se usaron en la citometría de flujo. Para una tinción combinada, directa e indirecta, las células se marcaron primero con el anticuerpo no conjugado y a continuación se tiñeron durante 15 minutos con 20 µl de un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón en dilución 1:25. Los sitios de unión libres del anticuerpo secundario se bloquearon incubando las células durante 25 minutos con 20 µl de un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (0,05 mg/ml; Southern Biotech, Birmingham, AL), antes de contrateñirlas con TNAP-APC y/o CD56FITC. Tras una etapa de lavado, las células se analizaron por citometría de flujo.

Análisis citométrico de flujo y clasificación celular

Las células de médula ósea marcadas con anti-TNAP-APC, anti-SUSD2-PE y CD56-FITC se clasificaron mediante un clasificador celular FACSAria (Becton Dickinson), poniendo primero una puerta en la población de SUSD2 y a continuación la ventana de clasificación en la gráfica resultante de TNAP frente a CD56. Las células clasificadas se utilizaron para análisis funcionales y fenotípicos. Los análisis de coexpresión se realizaron con un citómetro de flujo FACSCantoll (Becton Dickinson). Los datos se analizaron utilizando el programa informático FCS Express (De Novo Software, Ontario, Canadá).

10 *Separación de MACS*

En ensayos selectivos, las células de médula ósea se preclasificaron mediante MACS (Miltenyi Biotec), empleando microesferas MACS de SUSD2-PE y anti-PE. Las separaciones se efectuaron conforme a las recomendaciones del fabricante.

15 Como ya se ha mencionado en la descripción de las figuras, las células de médula ósea se marcaron en los ensayos con CD271-APC, CD45-BrilliantViolet, CD56-FITC y W5C5-PE. Dado que las MSC son CD271⁺CD45⁻, se puso una ventana sobre esta población y luego una ventana de clasificación en el gráfico resultante, sobre las poblaciones de W5C5⁺CD56⁻ y W5C5⁺CD56⁺. Después de la clasificación se examinó la capacidad de formación de colonias de las respectivas poblaciones (fig. 1).

Identificación de SUSD2

25 Las MSC de médula ósea cultivadas se marcaron simultáneamente con W3D5 y W5C5 y se tiñeron con un conjugado de conejo anti-ratón-PE (en ensayos preliminares con más de 20 tipos diferentes de células se encontró que W5C5 y W3D5 tenían los mismos patrones de reactividad). A continuación, las células W5C5⁺W3D5⁻ y W5C5⁺W3D5⁺ se clasificaron en el clasificador FACS y se separaron por centrifugación. A partir de los sedimentos celulares se aisló el ARNm (mediante Miltenyi, Alemania) y se realizó un análisis de la expresión génica de ambas fracciones. Se encontró que el gen SUSD2 se expresaba aproximadamente 20 veces más en la fracción W5C5⁺W3D5⁺ que en la fracción W5C5⁺W3D5⁻. Como no había anticuerpos monoclonales de SUSD2 en el mercado, se adquirió la secuencia completa del gen SUSD2 (Origen) y con ella se transfectaron células HEK-293. Tres días después de la transfección se comparó la reactividad de W5C5 y W3D5 sobre el transfectante y la célula HEK-293 no transfectada (fig. 2). Los gráficos de FACS muestran tanto las tinciones de control de ambos tipos de células (fig. 2A, B) como la tinción específica con los respectivos anticuerpos (fig. 2C, D). Se demostró que ambos anticuerpos reconocen selectivamente el transfectante HEK293/huSUSD2.

35 Con estos resultados se pudo demostrar que la combinación de al menos los anticuerpos contra SUSD2 y CD140b, TNAP y/o CD56 es adecuada para aislar todas las MSC de la médula ósea con gran pureza y efectividad, ya que ambos marcadores SUSD2 son muy selectivos para las MSC. La TNAP se expresa fuertemente en CD56⁻ MSC pero débilmente en CD56⁺ MSC. Sin embargo, el SUSD2 se expresa con la misma intensidad en ambas subseries. La combinación de ambos anticuerpos permite la selección segura de las MSC gracias a la amplificación de la señal.

40 Por lo tanto, con el presente estudio se identificó una combinación de antígenos, es decir, SUSD2 con CD104b, TNAP y/o CD56, que permite aislar y/o identificar efectivamente MSC, en particular las que tienen potencial de diferenciación condrogénico, adipocítico y osteogénico.

45 Estos resultados son especialmente relevantes para el uso clínico de las células madre aisladas de este modo o de los condrocitos, adipocitos y osteoblastos obtenidos mediante estas células madre. Así, p.ej., las lesiones del cartílago articular y de los discos intervertebrales suelen ser difíciles de tratar, debido precisamente a la limitada capacidad de regeneración de estos tejidos. Las enfermedades como la artritis reumatoide, los traumatismos, las fracturas óseas y las lesiones de los discos intervertebrales están directamente relacionadas con la falta de una condrogénesis efectiva. A pesar de los avances en ortopedia y del éxito creciente del trasplante autólogo de condrocitos, las preparaciones relacionadas con la biología celular para la regeneración del cartílago siguen siendo un desafío. El principal problema es el uso de células cultivadas con fines clínicos, cuando las células de partida están mal caracterizadas.

50 Así, la presente invención ofrece la posibilidad, p.ej. de proporcionar células MSC de médula ósea muy enriquecida y bien definida, con una excelente capacidad de diferenciación condrogénica, a fin de poder utilizarlas clínicamente como población inicial. Estas células se pueden inyectar directamente, p.ej. en los espacios intervertebrales/discos intervertebrales, o expandirse *in vitro* y diferenciarse en condrocitos antes de su empleo en aplicaciones clínicas.

60

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un primer anticuerpo de unión a la proteína 2 (SUSD2) que contiene el dominio Sushi antigénico, o de fragmentos funcionales de al menos el primer anticuerpo, en combinación con al menos un segundo anticuerpo que se une al antígeno CD140b o con fragmentos funcionales de al menos el segundo anticuerpo, para el aislamiento *in vitro* de células madre mesenquimales.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** al menos un anticuerpo que se une a SUSD2 se elige del grupo formado por:
- el anticuerpo W5C5 producido por la línea celular depositada con el número ACC 2813 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
 - el anticuerpo W3D5 producido por la línea celular depositada con el número ACC 2815 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo W5C5 o W3D5, y
 - un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo W5C5 o W3D5.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el anticuerpo que se une a CD140b se elige del grupo formado por:
- el anticuerpo 28D4,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo 28D4, y
 - un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 28D4.
4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** tiene lugar en combinación con al menos un tercer anticuerpo, o fragmentos funcionales del mismo, que al menos se une a uno de los antígenos CD56 o TNAP (*tissue non-specific alkaline phosphatase*; fosfatasa alcalina no específica de tejido), eligiendo el anticuerpo de unión a TNAP del grupo formado por:
- el anticuerpo W8B2 producido por la línea celular depositada con el número ACC2813 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, y
 - un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo W8B2.
5. Uso según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el anticuerpo que se une a CD56 se elige del grupo formado por:
- el anticuerpo 39D5 producido por la línea celular depositada con el número DSM ACC 2930 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, y
 - un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 39D5.
6. Método *in vitro* para el aislamiento y/o la identificación de células madre mesenquimales, en concreto de células madre mesenquimales con potencial de diferenciación condrogénica, que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto una muestra que contiene células madre mesenquimales con al menos un anticuerpo que se une al antígeno SUSD2, o con fragmentos funcionales del anticuerpo,
 - b) opcionalmente poner en contacto una muestra que contiene células madre mesenquimales con otro anticuerpo que se une al antígeno SUSD2, o con fragmentos funcionales del anticuerpo,
 - c) poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que se une a CD140b o con fragmentos funcionales del anticuerpo, y
 - d) aislar y/o identificar células a las que se ha unido i) al menos un anticuerpo, o fragmentos del mismo, que se une al antígeno SUSD2, y ii) al menos un anticuerpo que se une a CD140b.
7. Método según la reivindicación 6, **caracterizado porque** el anticuerpo empleado en la etapa a) se elige del grupo formado por:
- el anticuerpo W5C5 producido por la línea celular de hibridoma depositada con el número ACC2813 en la Colección alemana de cultivos celulares y microorganismos,
 - el anticuerpo W3C5 producido por la línea celular de hibridoma depositada con el número ACC2815 en la Colección alemana de cultivos celulares y microorganismos, y
 - anticuerpos que se unen al mismo epítipo, como el anticuerpo W5C5 o W3D5.
8. Método según una de las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado porque** el anticuerpo anti-CD140b empleado en la etapa c) se elige del grupo formado por:

- el anticuerpo 28D4,
- fragmentos funcionales del anticuerpo 28D4, y
- anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 28D4.

5 9. Método según una de las reivindicaciones 6 o 8, **caracterizado porque** comprende la etapa adicional c1):

c1) poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que se une a CD56 o TNAP, o con fragmentos funcionales del anticuerpo, eligiendo el anticuerpo anti-TNAP utilizado en la etapa c1) del grupo formado por:

- 10
- el anticuerpo W8B2 producido por la línea celular de hibridoma depositada con el número ACC2567 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo W8B2, y
 - anticuerpos que se unen al mismo antígeno o epítipo que el anticuerpo W8B2.

15 10. Método según la reivindicación 9, **caracterizado porque** el anticuerpo que se une a CD56 empleado en la etapa c1) se elige del grupo formado por:

- 20
- el anticuerpo 39D5 producido por la línea celular de hibridoma depositada con el número ACC 2930 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares,
 - fragmentos funcionales del anticuerpo 39D5, y
 - anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 39D5.

11. Método según una de las reivindicaciones 6 a 10, **caracterizado porque** las etapas a), b), c) y opcionalmente c1) tienen lugar de manera simultánea, sucesiva o en orden inverso.

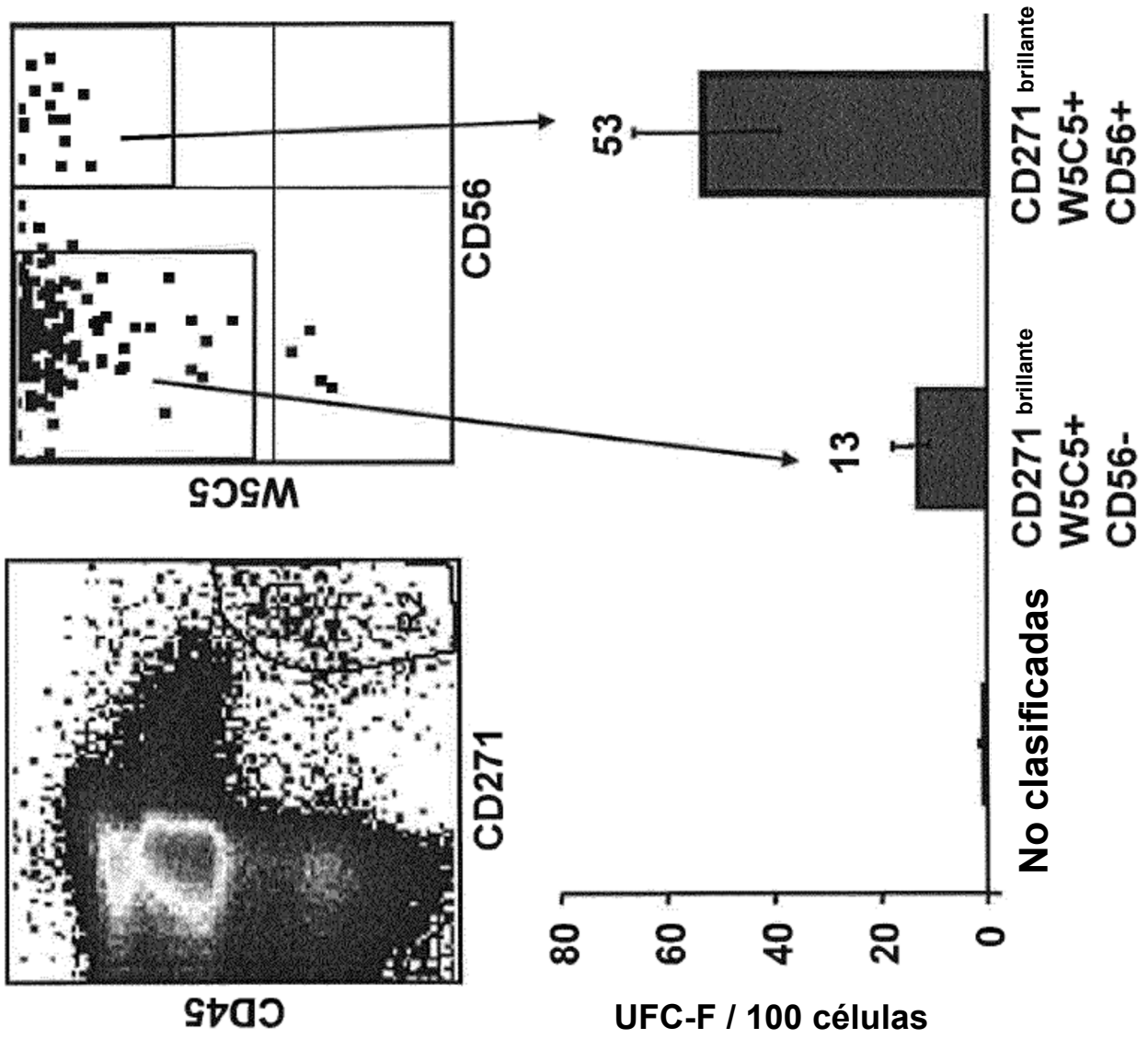
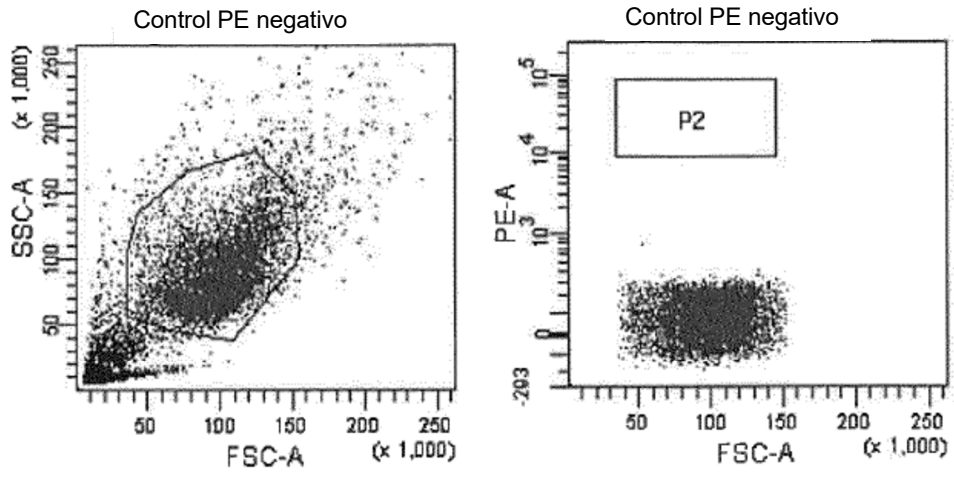
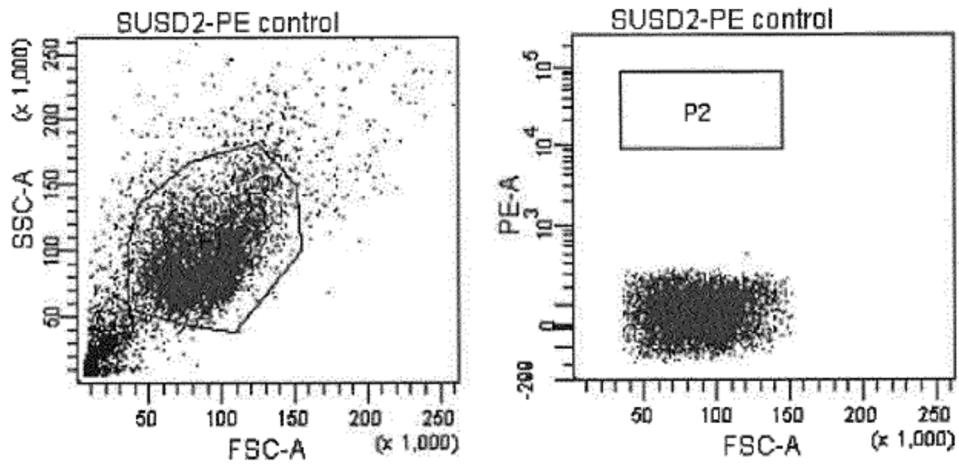


Fig. 1



A



B

Fig. 2

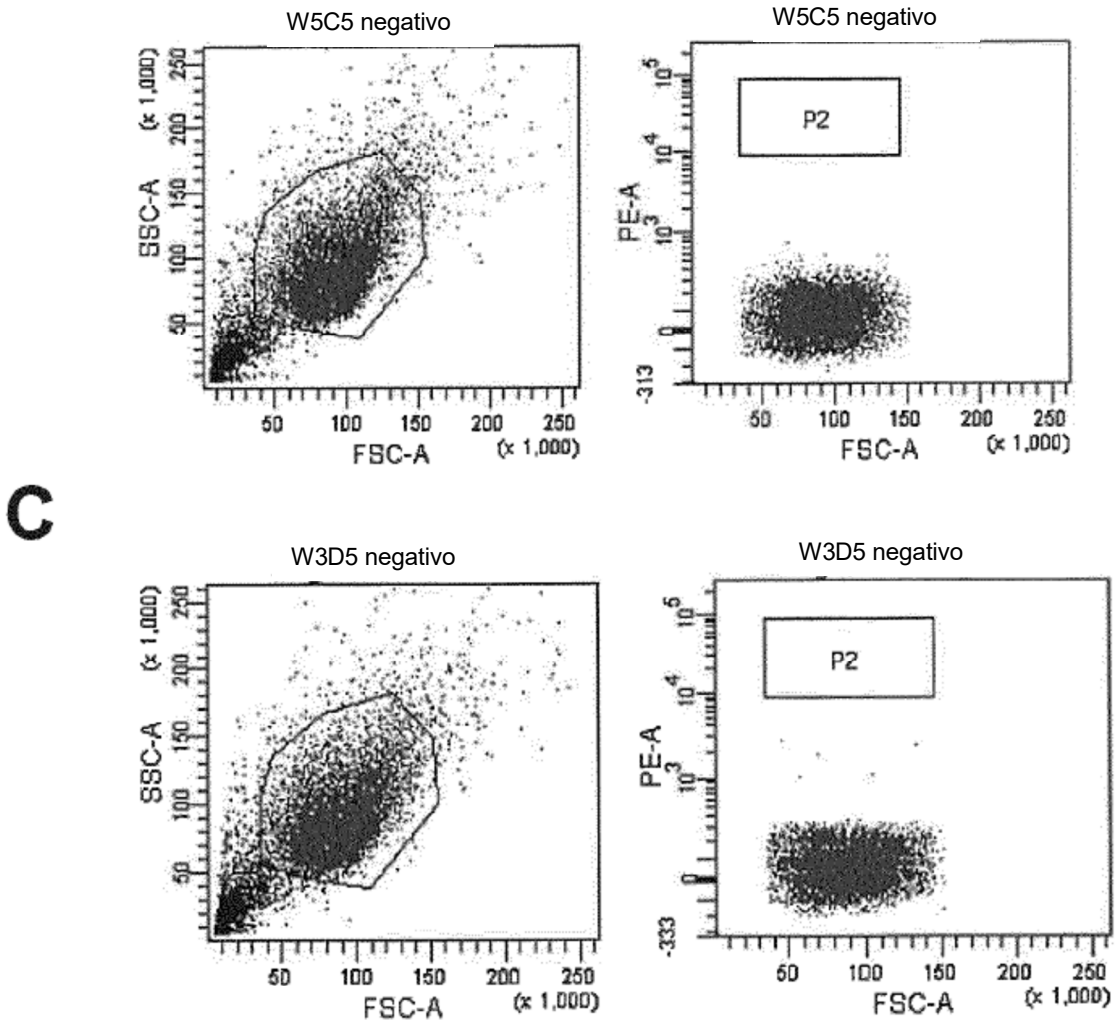
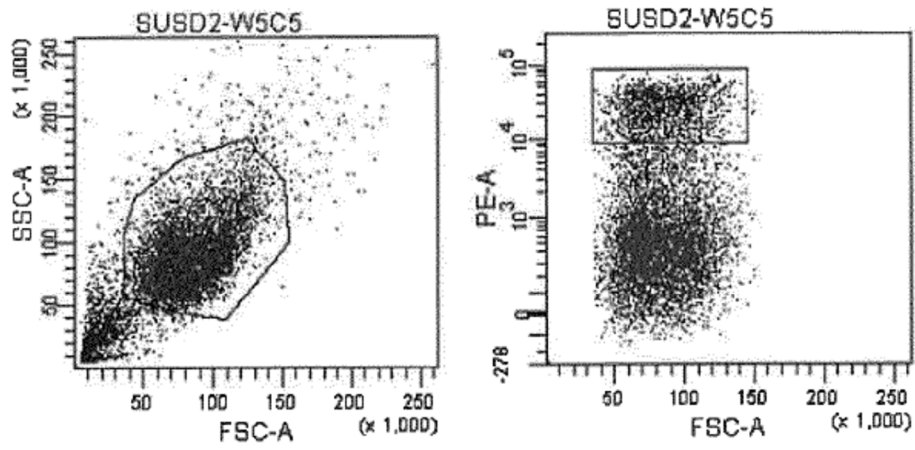


Fig. 2



D

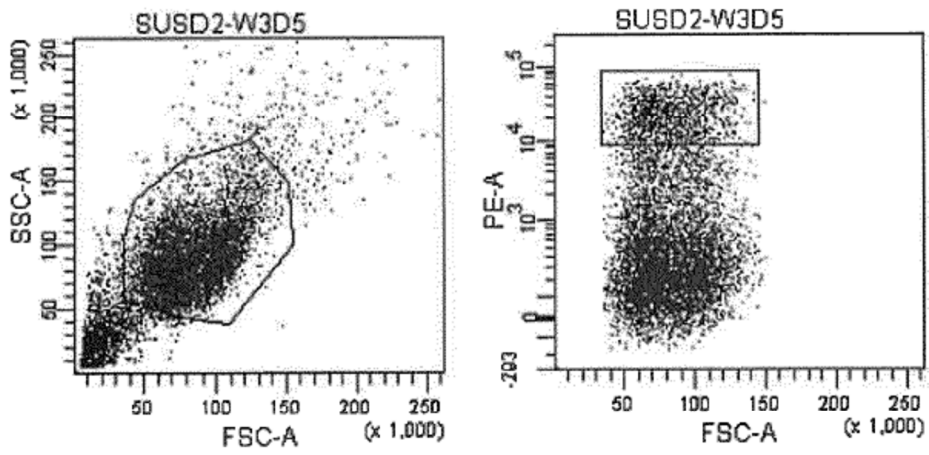


Fig. 2