

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 780**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2013** **E 15158384 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 2902482**

54 Título: **Métodos para obtener células madre estromales**

30 Prioridad:

10.02.2012 GB 201202319

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

28.01.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ELLIMAN, STEPHEN JOSEPH

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 697 780 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).

DESCRIPCION

Métodos para obtener células madre estromales

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a métodos para aislar células madre, a poblaciones de células madre obtenidas de las células aisladas y a usos de esas poblaciones y de células y tejidos derivados de las mismas.

10 **Antecedentes**

En los años 60 y 70, Friedenstein y sus colegas demostraron que el potencial osteogénico - revelado por el trasplante heterotópico de células de médula ósea (BM) - estaba asociado con una subpoblación menor de células BM-mononucleares (MNC) (revisado en Friedenstein, 1990). Estas MNC eran distinguibles de la mayoría de las MNC hematopoyéticas por su rápida adherencia a recipientes de cultivo de tejido de plástico y por el aspecto similar a fibroblastos de su progenie en el cultivo, sugiriendo un origen en el compartimento estromal de BM. Además de establecer el estroma de BM como la fuente, Friedenstein, Owen y sus colegas proporcionaron un segundo avance mostrando que la siembra de suspensiones de células BM en densidad clonal da como resultado el establecimiento de colonias discretas iniciadas por células individuales (unidad fibroblástica formadora de colonias, CFU [Friedenstein et al., 1970]).

Friedenstein y Owen más tarde llamaron a esta célula generadora de CFU-F la Célula Madre Estromal (SSC) (Owen y Friedenstein, 1988) y las referencias a la SSC en la presente se basan en la definición de la célula original.

Las SSC derivadas de BM pueden identificarse en una población mixta de MNC adherentes al plástico (fibrosis plástica), fibroblásticas, que dan origen al hueso, la grasa o el cartílago y secretan proteínas inmunomoduladoras y angiogénicas potentes. Los estudios preclínicos demuestran que las PA-SSC median respuestas inmunomoduladoras y angiopoyéticas potentes *in vivo*. Actualmente, los ensayos clínicos están probando PA-SSC en 40 enfermedades degenerativas, autoinmunes e isquémicas distintas.

En la médula humana, aproximadamente 1 célula mononuclear de BM (MNC) en cada 80.000 MNC es una SSC que forma CFU-F. Hasta la fecha, el método más simple y frecuentemente usado para aislar estos SSC de BM depende de la adherencia previamente mencionada al plástico de cultivo de tejido, de acuerdo con el que las MNC se dejan incubar durante 10-14 días y mientras tanto las CFU-F se unirán y formarán colonias a una frecuencia reconocida de 1:80000. A los 10-14 días, estas CFU-F se recolectan mediante digestión con tripsina y se vuelven a colocar en placas en medios ricos en suero a una densidad de 3-8000 CFU-F por cm². Estas CFU-F luego se propagan *in vitro* hasta que se hayan obtenido suficientes números de células para permitir la evaluación bioquímica y citológica. Este enfoque se usa ampliamente pero se considera inadecuado para definir o purificar SSC para uso clínico, ya que solo 1:80.000 BMMNC colocadas en placas con SSC y los métodos no cumplirán con los buenos protocolos de fabricación necesarios para la aprobación clínica de productos relacionados.

Por lo tanto, en el estado de la técnica, las poblaciones de células madre se han identificado en base a una capacidad inicial para adherirse a una superficie de plástico. A partir de esta selección inicial, las poblaciones celulares se obtienen como poblaciones clonales de unidades formadoras de colonias individuales en la superficie. Estas también se han etiquetado en la bibliografía "células madre mesenquimales", aunque el término puede ser incorrecto ya que se pueden incluir células madre no mesenquimales dentro de las células aisladas. En un enfoque de aislamiento conocido, estas poblaciones de células conocidas se derivan de células madre que son positivas para la fosfatasa alcalina (ALP) y CD271. Sin embargo, en términos clínicos, la célula está esencialmente no identificada.

Las poblaciones de células se preparan a partir de estas células aisladas conocidas, como la expansión clonal a partir de una única célula aislada, y se usan para trasplante. Los resultados son variables, sin embargo, en el sentido de que las poblaciones de células trasplantadas a veces se comportan de manera bastante diferente de un lote a otro, y con un elemento de imprevisibilidad.

Las poblaciones de células del estado de la técnica tienden a formar hueso y grasa y cartílago, pero con un control limitado, frecuentemente producen grasa cuando se requiere hueso o cartílago. A la inversa, por ejemplo, cuando se prefiere obtener células que producen grasa, estas células productoras de grasa solo se obtienen de manera poco fiable.

Un problema importante es que la población celular inicial está esencialmente sin definir, ya que el aislamiento en base a la adherencia al plástico no es una definición suficientemente técnica de un tipo de célula. Incluso cuando se seleccionan, por ejemplo, para los marcadores mencionados (ALP y CD271), la expresión de esos marcadores en las células o en la progenie desaparece rápidamente en el cultivo, dejando una población efectivamente indefinida. Las propiedades útiles de las células también se reducen o desaparecen con el tiempo -

otro problema con una población celular no definida

Kaltz et al, Experimental Cell Research, vo. 316, N° 16, 1 de octubre de 2010, páginas 2609-2617, divulga varios marcadores para enriquecer CFU-F a partir de cordones umbilicales humanos.

Objetos de la invención

Es un objeto general de la invención proporcionar métodos de aislamiento de células madre estromales y poblaciones de células y tejidos derivados de los mismos que sean por lo menos una alternativa a la técnica, y un objeto de realizaciones particulares de la invención es proporcionar métodos que se mejoran, por ejemplo, a través de una definición aumentada de las células obtenidas, o células y tejidos que se mejoran, por ejemplo, por una confiabilidad aumentada de sus propiedades, lo que las hace más adecuados para aplicaciones clínicas.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el aislamiento prospectivo de células madre estromales, especialmente células madre estromales humanas, basado en la expresión de marcadores o antígenos que se expresan en una pluralidad de especies de mamíferos. En los métodos y las poblaciones de células de la invención, las células se clasifican en base a la expresión de un marcador de especies cruzadas en particular, lo que se denomina como aislamiento prospectivo, y luego el cultivo de las células obtenido, dejando la identificación de las células, concretamente unidades de formación de colonias de fibroblastos (CFU-F), que pueden expandirse clonalmente. La población celular obtenida después de la expansión clonal se propone luego para fines terapéuticos, de trasplante y otros usos.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de aislamiento de una célula madre estromal, que comprende el aislamiento de una célula a partir de una población mixta de células de mamíferos basada en la expresión de Sindecán-2, y en donde la población mixta de células comprende células del cordón umbilical o células de sangre del cordón umbilical.

La invención proporciona un método de aislamiento de una célula madre estromal, que comprende el aislamiento de una célula a partir de una población mixta de células de mamíferos basada en la expresión de Sindecán-2, en donde la población mixta de células comprende células del cordón umbilical o células de sangre del cordón umbilical, y en donde el Sindecán-2 correspondiente también se expresa en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, de rata, de caballo, de conejo y de cerdo.

Preferiblemente, el Sindecán-2 se encuentra en células madre estromales humanas y células madre estromales de ratón, o en células madre estromales humanas y células madre estromales de rata, o en las tres.

Más específicamente, la invención proporciona un método de aislamiento de una célula madre estromal humana, que comprende el aislamiento de una célula de médula ósea humana que es negativa para CD45 y positiva para Sindecán-2, en donde el Sindecán-2 se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de forma cruzada con un marcador de superficie celular encontrado en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo. Más específicamente, la invención proporciona un método de aislamiento de una célula madre estromal humana, que comprende el aislamiento de una célula de médula ósea humana que es positiva para FAP alfa y positiva para Sindecán-2, en donde el Sindecán-2 se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de forma cruzada con un marcador de superficie celular que se encuentra en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

Preferiblemente, el Sindecán-2 se encuentra en células madre estromales humanas y células madre estromales de ratón, o en células madre estromales humanas y células madre estromales de rata, o en las tres.

También se proporcionan métodos para obtener una población de células, que comprenden aislar células de acuerdo con la invención, y derivar la población de esas células aisladas; y se proporcionan métodos para obtener una población clonal de células, que comprenden aislar una célula individual de acuerdo con la invención y derivar una población clonal de células a partir de la célula individual.

Las células obtenidas de este modo también se proporcionan por la divulgación, por lo tanto, poblaciones de células estromales, preferiblemente células madre estromales, enriquecidas con respecto al marcador. El enriquecimiento puede ser del 30% o más, del 35% o más, o del 40% o más de las células que son positivas para el marcador. En realizaciones, el marcador es NG2 o, en particular, SDC2.

Una población específica de células de la divulgación se obtiene:

proporcionando una célula madre estromal humana,

derivando una población clonal de células a partir de la célula madre estromal humana, y opcionalmente, creciendo y/o expandiendo y/o pasando adicionalmente las células en cultivo,

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

Una población de células específica adicional de la divulgación se obtiene:

proporcionando una célula madre estromal humana, derivando una población clonal de células a partir de la célula madre estromal humana, y opcionalmente, creciendo y/o expandiendo y/o pasando adicionalmente las células en cultivo,

en donde la célula madre estromal humana se aísla de la médula ósea, es positiva para la expresión de FAP alfa y es positiva para la expresión de un marcador de superficie celular adicional, en donde el marcador de superficie celular adicional se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de forma cruzada con un marcador de superficie celular encontrado en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo.

Se proporcionan por la divulgación productos de las células, como el hueso, el tendón del cartílago y otros productos de células madre estromales, así como el uso de las células, por ejemplo, en ensayos.

La invención permite la identificación de células madre estromales deseadas sobre la base de la expresión de Sindecán-2, proporcionando células prospectivamente purificadas y definidas y poblaciones derivadas de las mismas.

Detalles de la invención

Por lo tanto, la invención proporciona un método de aislamiento de una célula madre estromal, que comprende el aislamiento de una célula de una población mixta de células de mamífero basada en la expresión de Sindecán-2, y en donde la población mixta de células comprende células del cordón umbilical o células de sangre del cordón umbilical.

Un anticuerpo puede reconocer Sindecán-2 en una célula humana y reaccionar de forma cruzada con un marcador de superficie celular en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo. En uso, tales métodos son adecuados para el aislamiento de células humanas, de ratón, de rata, de caballo, de conejo y de cerdo, en particular células humanas.

El anticuerpo puede reconocer Sindecán-2 en una célula equina y reaccionar de forma cruzada con un marcador de superficie celular en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, de rata, de conejo y de cerdo. En uso, tales métodos son adecuados para el aislamiento de células humanas, de ratón, de rata, de caballo, de conejo y de cerdo, en particular células equinas.

De manera similar, la invención proporciona un método de aislamiento de una célula madre estromal, que comprende el aislamiento de una célula de una población mixta de células de mamífero basada en la expresión de Sindecán-2, en donde el Sindecán-2 es expresado por la célula de mamífero y en donde un marcador de superficie celular correspondiente también es expresado en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, de rata, de caballo, de conejo y de cerdo.

El Sindecán-2 puede expresarse en una célula humana y el marcador correspondiente puede expresarse en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo, para el aislamiento, por ejemplo, de células humanas. El anticuerpo puede expresarse en una célula equina y el marcador correspondiente expresarse en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, de rata, de conejo y de cerdo, para el aislamiento, por ejemplo, de células equinas. Un marcador es un marcador correspondiente si un anticuerpo puede usarse para clasificar células humanas en base a la unión a un marcador en células humanas y ese mismo anticuerpo puede usarse para clasificar células de otra especie de mamífero.

El aislamiento de células madre estromales prospectivo de la invención, por tanto, usa marcadores que se encuentran en todas las especies, refiriéndose a la unión de marcadores en diferentes especies de mamífero a un anticuerpo común. En una realización específica descrita a continuación, el anticuerpo contra SDC2 humano se une y puede usarse para aislar células madre estromales humanas y también se une y puede usarse para aislar células madre estromales en ratones, ratas, caballos y conejos.

El anticuerpo puede unirse o reaccionar de forma cruzada con marcadores en células de por lo menos tres especies de mamíferos, por lo menos cuatro o por lo menos cinco especies.

5 Por separado, la divulgación proporciona un método para obtener o derivar una población de células madre estromales que comprende el aislamiento prospectivo de células en base a la expresión de un marcador que se expresa de manera similar en células humanas y en por lo menos otra célula de ratón, rata, conejo, caballo y cerdo, para el aislamiento, por ejemplo, de células madre estromales humanas.

10 En realizaciones de la invención, las células madre estromales se aíslan de acuerdo con la expresión de Sindecin-2 expresado en por lo menos células madre estromales humanas y de ratón, en por lo menos células madre estromales humanas y de rata o en por lo menos células madre estromales de ratón y rata. Por lo tanto, por ejemplo, un anticuerpo para SDC2 puede usarse para aislar las poblaciones correspondientes de células madre estromales en humanos, ratones, conejos, caballos y ratas.

15 Una fuente, una población mixta de células de mamíferos, puede ser médula ósea, tejido adiposo, músculo esquelético, endometrio, placenta, cordón umbilical, sangre del cordón umbilical y gelatina de Wharton. Se pueden usar fuentes de células humanas, de ratón, de rata, de conejo, equinas y de cerdo, y en ejemplos específicos se han utilizado células humanas. Una fuente usada en los ejemplos es la médula ósea, y una fuente preferida específica es la médula ósea humana. Otra fuente son las células, por ejemplo, SSC, derivadas de células pluripotentes humanas. 20 En un ejemplo, se usaron SSC humanas de células hES.

En el uso de la divulgación, se puede realizar una clasificación inicial en base solo al primer marcador, por ejemplo, la expresión de SDC2. Este método generalmente también aísla células no deseadas, lo que significa células que no son células madre estromales y pueden ser, por ejemplo, células B o células T. Sin embargo, en el 25 paso adicional de aislar las CFU, estas células no deseadas pueden perderse ya que no forman colonias, por lo que este nivel de clasificación puede ser aceptable ya que solo las células estromales deseadas capaces de formar CFU producirán poblaciones clonales.

30 En ciertas realizaciones de la divulgación, las células se aíslan en base a la expresión de dos marcadores separados. La selección de combinación de células puede ser selección de células positivas/positivas, lo que significa que las células se seleccionan si son positivas para la expresión del primer marcador y positivas para la expresión del segundo marcador. La selección también puede ser para positivas/negativas, negativas/positivas o negativas/negativas.

35 Un método de combinación de la divulgación, que típicamente combina una o más o todas las características de cualquier método descrito en otra parte de la presente, comprende por lo tanto el aislamiento de células en base a la expresión de un marcador de superficie celular adicional diferente del primero. Esto puede denominarse como el segundo marcador, aunque la nomenclatura es para indicar simplemente que los marcadores son diferentes entre sí y no indica una diferencia temporal en el momento de la selección o el aislamiento de acuerdo 40 con ese marcador. La selección basada en marcadores puede ser secuencial, en cualquier orden, aunque comúnmente se lleva a cabo en una sola clasificación o aislamiento, que puede ser simultáneo, según lo permita la tecnología disponible.

45 Un segundo marcador adecuado es CD45. Adecuadamente, se seleccionan células que son negativas para CD45. Un marcador adecuado adicional es FAP alfa; adecuadamente se seleccionan células positivas para FAP alfa. Los primeros marcadores superficie celular adecuados incluyen SDC2 y NG2.

50 En otro uso de la divulgación, se lleva a cabo una clasificación inicial sobre la base de la expresión de CD45, seleccionándose la fracción negativa. Una clasificación separada se lleva a cabo sobre la base de la expresión del primer marcador, por ejemplo, SDC2. Puede tomarse la fracción positiva o puede tomarse la fracción negativa. En la práctica, la clasificación generalmente se lleva a cabo simultáneamente. La viabilidad celular puede reducirse drásticamente en la clasificación secuencial.

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

En otro método particular de la divulgación, se seleccionan las células que son negativas para el primer marcador; Estos métodos son adecuados para el aislamiento de células adipogénicas.

60 Un método específico de aislamiento de una célula madre estromal humana comprende el aislamiento de una célula de médula ósea humana que es positiva para un primer marcador y negativa para CD45, en donde el primer marcador se une a un anticuerpo y en donde dicho anticuerpo reacciona de forma cruzada con un marcador que se encuentra en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células de ratón, rata, caballo, conejo y cerdo. El primer marcador es preferiblemente SDC2 y el aislamiento usa un anticuerpo que se une a SDC2 y reacciona de forma cruzada con un marcador correspondiente en todas las humanas, de ratón, de rata, de 65

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

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

Las células madre estromales aisladas específicas de la divulgación son:

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

20 De las células que se han aislado, se pueden obtener cultivos celulares y poblaciones. Esto puede lograrse mediante la expansión clonal de una célula aislada (por ejemplo, una célula que es por lo menos inicialmente negativa para CD45 y positiva para SDC2 o negativa para CD45 y negativa para SDC2) y luego el crecimiento continuo o el cultivo de las células obtenidas. Tener en cuenta que las células obtenidas por este crecimiento continuo y el cultivo y el pase tienden inicialmente a demostrar el mismo espectro de marcadores que la célula o células originalmente aisladas. Con el tiempo el patrón de expresión puede cambiar. Pero las propiedades de la población resultante están vinculadas a los criterios del aislamiento inicial (por ejemplo, una célula que es por lo menos inicialmente negativa para CD45 y positiva para SDC2 o negativa para CD45 y negativa para SDC2).

30 De las células que se han aislado, los cultivos celulares y las poblaciones pueden obtenerse generalmente con una alta homogeneidad, medida por la expresión del marcador o antígeno usado para el aislamiento. Por lo tanto, también se proporcionan por la divulgación poblaciones de células estromales de mamíferos que expresan altos niveles del primer marcador de superficie celular. El % de células que expresan el primer marcador puede ser el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 75% o más, el 80% o más, o el 90% o más. En una realización específica de la divulgación descrita a continuación con más detalle, las poblaciones celulares iniciales expresan el primer marcador a un nivel del 95% o más. Al hacer referencia a las células que son positivas, la referencia es positiva cuando se mide en o sobre la superficie celular, por ejemplo, como detectable usando un anticuerpo marcado para el marcador.

40 Las poblaciones de células también pueden derivarse de lo anterior, por ejemplo, mediante cultivo y/o pases, y al hacerlo la proporción de células que conservan la expresión del primer marcador puede reducirse, pero sin embargo permanece más alta que en poblaciones no seleccionadas en base al marcador. Por lo tanto, también se proporcionan por la divulgación poblaciones de células de mamífero adicionales que expresan altos niveles del primer marcador. El % de células que expresan el primer marcador puede ser el 30% o más, el 40% o más, el 50% o más, o estar en los niveles enumerados inmediatamente con anterioridad. Las poblaciones celulares de la divulgación han especificado pureza y están definidas. Las células pueden identificarse/seleccionarse sobre la base de la expresión de marcadores y usarse inmediatamente, sin necesidad de cultivo para determinar si se ha obtenido una población de células suficientemente pura.

50 Por tanto, se proporciona una población de células madre estromales de mamífero, en donde el 75% o más de las células son positivas para un marcador de superficie celular, y en donde un marcador de superficie celular correspondiente también se expresa en una célula de por lo menos otra especie de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, de rata, de caballo, de conejo y de cerdo. El marcador se expresa adecuadamente en una célula humana y el marcador correspondiente se expresa en una célula de ratón y opcionalmente también en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de rata, caballo, conejo y cerdo. El marcador se expresa adecuadamente en una célula humana y el marcador correspondiente se expresa en una célula de rata y opcionalmente también en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de ratón, caballo, conejo y cerdo. En otra población ejemplar de células madre estromales, el 75% o más de las células son positivas para SDC2, y estas células eran osteogénicas. Además, las células pueden caracterizarse adicionalmente por los niveles de expresión del segundo marcador. El % de células que expresan el segundo marcador puede ser el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 75% o más, el 80% o más, o el 90% o más. En una realización específica de la divulgación descrita a continuación con más detalle, el 95% o más de las células en las poblaciones celulares iniciales son positivas para el segundo marcador. Las células pueden ser negativas por separado para el segundo marcador. El % de células que no expresan el segundo marcador puede ser el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 75% o más, el 80% o más, o el 90% o más. En una realización específica de la divulgación descrita a continuación con más detalle, el 95% o más de las células en las poblaciones celulares iniciales son negativas para

el segundo marcador. En una población ejemplar de células madre estromales osteogénicas y angiopoyéticas, el 75% o más de las células son positivas para SDC2 y el 75% o más de las células son negativas para CD45.

También se proporcionan por la divulgación poblaciones celulares que expresan niveles bajos del primer marcador. El % de células que no expresan el primer marcador puede ser el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 75% o más, el 80% o más, o el 90% o más. En una realización específica de la divulgación descrita a continuación con más detalle, las poblaciones celulares iniciales que expresan el primer marcador a un nivel del 5% o menos se consideran negativas para ese primer marcador. En una población ejemplar de células madre estromales, el 75% o más de las células son negativas para SDC2 y son células adipogénicas. Además, las células pueden caracterizarse adicionalmente por los niveles de expresión del segundo marcador. El % de células que expresan el segundo marcador puede ser el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 75% o más, el 80% o más, o el 90% o más. Las células pueden ser negativas por separado para el segundo marcador. El % de células que no expresan el segundo marcador puede ser el 50% o más, el 60% o más, el 70% o más, el 75% o más, el 80% o más, o el 90% o más. En una realización específica de la divulgación descrita a continuación con más detalle, el 95% o más de las células en las poblaciones celulares iniciales son negativas para el segundo marcador. En una población ejemplar de células madre estromales adipogénicas, el 75% o más de las células son negativas para SDC2 y el 75% o más de las células son negativas para CD45.

Por consiguiente, la divulgación también proporciona un método para obtener una población de células, que comprende aislar células de acuerdo con los métodos descritos y derivar la población a partir de esas células aisladas; y la divulgación proporciona además un método para obtener una población clonal de células, que comprende aislar una célula individual de acuerdo con los métodos descritos y derivar una población clonal de células a partir de la célula individual. Generalmente, el cultivo comprende obtener una población inicial de células y luego seguir creciendo y/o expandiendo y/o pasando las células en cultivo. SDC2 es el marcador de caracterización en los ejemplos específicos descritos a continuación.

Las poblaciones celulares descritas en los ejemplos específicos a continuación se han obtenido y se ha descubierto que muestran propiedades útiles. Por lo tanto, la divulgación proporciona además una población de células obtenibles de acuerdo con los métodos descritos y reivindicados. Las poblaciones celulares son preferiblemente células humanas, equinas, de conejo, de ratón y/o de rata.

Una población de células de una realización específica se obtiene:

proporcionando una célula madre estromal humana, derivando una población clonal de células a partir de la célula madre estromal humana, y opcionalmente, seguir creciendo y/o expandiendo y/o pasando las células en cultivo,

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

Se proporcionan por la divulgación tejidos, mediante la obtención de células de acuerdo con los métodos descritos y la obtención de tejido a partir de las mismas. De esta forma se puede obtener tejido seleccionado de hueso, cartílago y tendón. También se puede obtener tejido adiposo o tejido para cirugía reconstructiva.

Un uso adicional de la divulgación consiste en proporcionar células y ensayos usando las células aisladas y la progenie de las mismas. Por lo tanto, un método para realizar un ensayo comprende obtener una célula de acuerdo con los métodos descritos y usar esas células en el ensayo.

Las poblaciones de células del estado de la técnica, como se ha mencionado, tendían a formar hueso y grasa y cartílago, con control limitado y, por tanto, a veces hacían grasa cuando se requería hueso o cartílago. Pueden prepararse poblaciones celulares de la divulgación que tienden a no formar grasa. Esto es una ventaja. Pueden prepararse poblaciones de células separadas de la divulgación que, de hecho, tienden a formar grasa. De este modo, se puede proporcionar al usuario un mayor control y previsibilidad de las propiedades de las células, en base a un criterio de selección de marcador celular específico.

Una ventaja de las poblaciones de células específicas de la divulgación se puede poner de otra manera, concretamente para las células negativas para CD45, positivas para SDC2 que tienden a ser osteogénicas, generando poblaciones de células productoras de hueso y cartílago con mayor frecuencia. Las dificultades del estado de la técnica de resultados mixtos y la baja reproducibilidad para obtener hueso y cartílago pueden resolverse de este modo. Las poblaciones de células específicas que se pueden obtener ahora pueden tener ventajas adicionales; por ejemplo, las poblaciones positivas para SDC2 parecen ser más angiopoyéticas, induciendo a las células vecinas a formar vasculatura. Esto es ventajoso en el tratamiento de enfermedades que se

beneficiarían de una vasculatura mejorada, por ejemplo, enfermedades isquémicas.

Además, en métodos específicos de la invención se derivan poblaciones positivas para SDC2 a partir de células que están más definidas que en el estado de la técnica, por referencia a un marcador que persiste en las células y la progenie. En sí mismo, esto es una ventaja. La población celular es una población aceptablemente definida.

Una ventaja potencial adicional de la invención es que el marcador usado para el aislamiento prospectivo de la población celular inicial también es útil para el aislamiento prospectivo de poblaciones celulares en otras especies. Por tanto, en una realización específica, SDC2 es común en todas las humanas, de ratón, de rata, de caballo, de conejo. Como resultado, es posible aislar una población correspondiente en, digamos, células de ratón y luego extrapolar del trabajo en células de ratón para el trabajo en células humanas. Se puede usar una población definida en el ratón para obtener datos que luego se pueden llevar más lejos, en una población definida correspondiente en otra especie, especialmente en células humanas. Un problema que se cree es cierto para las poblaciones de células madre mesenquimales del estado de la técnica, es decir, las obtenidas usando un aislamiento prospectivo conocido, es que el marcador usado para el aislamiento, digamos, la célula de ratón no tiene un patrón de expresión correspondiente en las células humanas. La divulgación puede por tanto proporcionar poblaciones de células definidas con poblaciones paralelas de especies cruzadas, tales como de ratón y humana o ratón y equino, etc. Esto facilita el trabajo preclínico y clínico ya que el conocimiento obtenido de experimentos realizados inicialmente en células de una especie puede transferirse a trabajos posteriores en la población celular definida correspondiente en otra especie.

Las células y el tejido de la divulgación, y las composiciones que comprenden las células y los tejidos, pueden usarse para tratar varias afecciones y enfermedades de mamíferos, incluyendo en particular aquellas que se pueden tratar usando células y productos derivados de productos de SSC existentes. Las células y el tejido pueden interactuar con las células dendríticas e impulsar la secreción de IFN- β y, por lo tanto, pueden usarse como un supresor tumoral. Los cánceres en general pueden tratarse usando la divulgación, incluyendo específicamente carcinoma hepatocelular, cáncer cervical, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, fibrosarcoma, meduloblastoma y astrocitoma. Pueden tratarse enfermedades pulmonares, incluyendo lesión pulmonar aguda (LPA); Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); Fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Las células y los tejidos pueden usarse para tratar sepsis e insuficiencia multiorgánica inducida por sepsis, trasplante de médula ósea (BMT) o rechazo de células madre hematopoyéticas (HSC); rechazo de trasplante de órgano sólido (SOT) (incluyendo hígado, riñón, piel, córnea, corazón, pulmón); insuficiencia hepática aguda inducida por toxinas; hepatitis autoinmune; cirrosis biliar primaria (PBC) y colangitis esclerosante primaria (PSC); osteonecrosis; enfermedad degenerativa del disco; artritis reumatoide; artrosis y retraso en la curación ósea en pacientes diabéticos; nefritis autoinmune incluyendo granulomatosis de Wegener (WG); quemaduras, quemaduras graves; afecciones de desgaste muscular y síndromes atróficos incluyendo sarcopenia; caquexia y otras afecciones de desgaste muscular, incluyendo distrofias musculares (Duchenne y Becker); insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio agudo y apoplejía; diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; retinopatía diabética y otras retinopatías; nefropatía diabética y otras nefropatías; neuropatía diabética y otras neuropatías; úlceras diabéticas no curativas; cardiomiopatía diabética y otras miopatías; aterosclerosis; enfermedad arterial periférica e isquemia de extremidades crítica; uveítis (húmeda o seca) degeneración macular aguda (AMD; daño a la retina y córnea; afecciones autoinmunes como gastritis autoinmune (AIG); enfermedad de injerto contra huésped (GvHD); esclerosis múltiple y enfermedades desmielinizantes; enfermedad de tiroides; enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn fistulizante; esclerodermia; lupus (SLE; enfermedad de Graves; y enfermedad linfoproliferativa autoinmune (ALPS).

Las células y el tejido también pueden usarse para tratar varias afecciones equinas, incluyendo laminitis, lesiones del tendón y hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH) - también conocida como "sangrado" o "ataque de sangrado".

También se proporciona por la presente divulgación una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno en un animal, en particular un mamífero y, por ejemplo, un humano o un caballo. La composición farmacéutica comprende adecuadamente células o tejido de la divulgación en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o trastorno en el animal. Las células pueden por tanto administrarse con un portador farmacéutico aceptable. Por ejemplo, las células pueden administrarse como una suspensión celular en un medio líquido para inyección farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de medio líquido son solución salina, solución salina tamponada con fosfato, conteniendo también opcionalmente materiales adicionales como dimetilsulfóxido (DMSO) y albúmina de suero humano. Las células y el tejido pueden administrarse generalmente en una variedad de formatos como los conocidos para células madre mesenquimales existentes y productos similares y tejido derivado de los mismos. Pueden administrarse sistémicamente, por ejemplo, mediante infusión intravenosa o inyección directa. Las composiciones pueden comprender una matriz o andamiaje, o las células o el tejido pueden administrarse mediante inyección en un sitio que ya comprende matriz o andamiaje in situ. Las células o el tejido pueden administrarse por tanto en combinación con ácido hialurónico, colágeno u otra matriz extracelular. En la técnica pueden encontrarse ejemplos adicionales de formulación y administración que pueden aplicarse mutatis mutandis a las células y el tejido

de la divulgación, por ejemplo, en las WO2001080865, EP2545928 y WO1999061587. Se proporciona un método de tratamiento de un animal, que comprende administrar al animal una composición de la divulgación. Las células o tejido de acuerdo con la divulgación se proporcionan para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno de un animal. Las realizaciones de los métodos y usos comprenden realizaciones generalmente de la divulgación como se describe en la presente.

Los anticuerpos adecuados están disponibles para el experto en la técnica para realizar la clasificación y el aislamiento en base a los marcadores identificados. Un anticuerpo NG2/MCSP humano está disponible de R&D Systems, Inc. (614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA), como un clon IgG1 de ratón monoclonal # 7.1, Número de catálogo: MAB25851. Un anticuerpo NG2 (G-20) está disponible de: Santa Cruz Biotechnology, Inc. (2145 Delaware Avenue, Santa Cruz, California, 5060, USA), eef: sc-30923, reactivo con ratón, rata, humano, equino, canino, bovino y porcino; el péptido de bloqueo, sc-30923 P, también está disponible. Un anticuerpo para la Proteína de Activación de Fibroblastos Humanos α /FAP, número de catálogo: AF3715, está disponible de R&D Systems, Inc. Un anticuerpo FAPalfa (Y-16) está disponible de Santa Cruz Biotechnology, Inc. reactivo con por lo menos humano, rata y ratón y también equino, canino, bovino, porcino y aviar. Una proteína de activación anti-fibroblastos, anticuerpo alfa, ab28243, está disponible de Abcam (330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, Reino Unido) reactiva con por lo menos ratón, rata y humano. Un anticuerpo Sindecin 2, orb13481, reactivo con por lo menos humano, ratón y rata está disponible de Biorbyt Ltd. (12 Pembroke Avenue, Denny Industrial Center, Waterbeach, Cambridge, CB25 9QR, Reino Unido). El anticuerpo SDC2 usado en ejemplos específicos, número de catálogo: MAB29651 (Clon 305507) está disponible de R&D Systems, Inc, reactivo con humano, ratón, rata, equino, conejo y cerdo.

La SDC2, también denominada fibroglicano y ahora, CD362, estaba originalmente caracterizada bioquímicamente como una de las principales proteínas de superficie celular que contiene sulfato de heparano (HS) glicosaminoglicano (GAG) expresada en el pulmón. La SDC2 es uno de los cuatro miembros de esta familia transmembrana de un solo pase en vertebrados. En la presente, las referencias a "S2" y "SDC2" se refieren a SDC2.

La invención se describe ahora en realizaciones específicas con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

La Fig. 1 muestra el marcado por anticuerpo anti-SDC2 de células madre estromales humanas pero no de fibroblastos de pulmón humanos. Las líneas verdes indican tinción anti-SDC2-APC de células. Las líneas rojas indican el marcado con el anticuerpo de control apropiado (Isotipo IgG2B de rata Control-APC; R&D # IC013A; Clon - 141945). Las líneas azules indican el marcado de control positivo de MRC5 con anticuerpo anti-PDGFR α -APC (R&D Systems # FAB1264A; Clon - PRa292);

La Fig. 2 muestra el marcado por anticuerpo SDC2-APC de células mononucleares de médula ósea humana CD271^{bright}/CD45^{low}. Los datos muestran el perfil de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de $3,5 \times 10^7$ BMMNC teñidas con los SDC2-APC, CD271-PE y CD45-FITC (ambos de BD) mencionados anteriormente. La tinción con CD45-FITC permitió la separación de BMMNC en 3 poblaciones, (A) CD45-ve - AZUL, (B) CD45^{low} - NARANJA, y (C) CD45^{high} - VERDE. En (B) las células TP SDC+ve/CD271^{bright}/CD45^{low} raras son AZULES;

La Fig. 3 muestra un enriquecimiento mejorado en CFU-F en células mononucleares de médula ósea clasificadas SDC+/CD271^{bright}/CD45^{low}. Los datos muestran el perfil de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) 10^7 BMMNC teñidas con SDC2-APC, CD271-PE y CD45-FITC (ambos de BD) mencionados anteriormente;

La Fig. 4 muestra el porcentaje de pocillos de una placa de 96 pocillos en los que no se formó ningún clon como función del número de células mononucleares SDC+/CD271^{bright}/CD45- por célula;

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

La Fig. 6 muestra el depósito de GAG in vitro de células madre estromales SDC2+ a una tensión de oxígeno del 2% y 19%. Se muestran secciones de histología teñidas con safranina-O representativas de sedimentos de micromasa derivadas de SDC2+SSC;

La Fig. 7 muestra el depósito de lípidos in vitro de células madre estromales SDC2+ y SDC2- (marcadas como S2+ y S2- respectivamente);

La Fig. 8 muestra el depósito de calcio de células madre estromales SDC2+ y SDC2- en respuesta a estímulos osteogénicos in vitro;

La Fig. 9 muestra el depósito de GAG de células madre estromales SDC2+ y SDC- en respuesta a la estimulación condrogénica in vitro;

La Fig. 10 muestra la formación del cordón HUVEC relativa de células madre estromales SDC2+ y SDC2- en respuesta a la estimulación angiogénica in vitro;

La Fig. 11 muestra que las células mononucleares de médula ósea humanas CD45-/SDC+ raras expresan el marcador de células madre estromales CD271, CD146 y NG2;

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

La Fig. 13 muestra niveles crecientes de SDC2 en células madre estromales derivadas de médula ósea equina tras la confluencia, y células madre estromales derivadas de médula ósea de cerdo expresan SDC2 en baja tensión de oxígeno;

La Fig. 14 muestra niveles crecientes de SDC2 en células madre estromales derivadas de tres cepas de médula ósea de rata tras la confluencia;

La Fig. 15 muestra el aislamiento FACS de célula mononuclear CD45⁻ con tinción conjunta para SDC2 y Scal;

y La Fig. 16 muestra un enriquecimiento mejorado en CFU-F en células mononucleares de ratón seleccionadas SDC2⁺/Scal.

Usamos un anticuerpo monoclonal IgG2B de rata para SDC2 humano conjugado con el fluorocromo de Alociocianina (APC) (R&D Systems número FAB2965A; clon 305515) para indicar si la expresión de la proteína SDC2 se enriquece en la superficie celular de SSC humana en comparación con un control de línea celular de fibroblastos de pulmón fetal humano, MRC5. Los fibroblastos de pulmón de MRC5 cultivados en medios de crecimiento SSC (αMEM/10% de PAA FSC; matraces NUNC T175) no expresaron SDC2 (Fig. 1). Como control, mostramos que los fibroblastos MRC5 expresan el marcador PDGFRα (CD140a-APC). Estos datos sugieren que la expresión de la proteína SDC2 se enriquece en la superficie de la SSC humana en comparación con los fibroblastos de pulmón de pulmón (Fig. 1).

En este momento, el estado de la técnica para la purificación de SSC basada en anticuerpos de BM consiste en usar una combinación de anticuerpos anti-CD271 (LNGFR) y anti-CD45, informados por la Universidad de Leeds (Drs. McGonagle y Jones). Este aislamiento de células CD45^{low}/CD271^{bright} ha demostrado que captura toda la CFU-F (SSC).

Sin embargo, la definición de células CD271 'bright' puede ser difícil de estandarizar de laboratorio a laboratorio. Para investigar si este anticuerpo anti-SDC2 co-tiñe BMMNC CD45^{low}/CD271^{bright}, se aspiraron 30 ml de BM humana del donante CRFG#0007 en la Instalación de Investigación Clínica (CRF) en el Hospital Universitario de Galway (GUH) por la Dra. Ruth Morrell.

Se asilaron BMMNC (5x10⁸) centrifugación centrifugación de Ficoll, se lavaron en PBS, se resuspendieron en tampón MACS y se bloquearon con Human FC-Block (Miltyi, UK). Se tiñeron BMMNC (4x10⁷) con colorante de viabilidad anti-SDC2-APC (R&D), anti-CD271-PE (BD) anti-CD45-FITC (BD) y Sytox/DAPI. Las células se analizaron por FACS en el Becton Dickinson Arianal en NUI Galway.

La Fig. 2 indica gráficos representativos de histogramas/puntos de los experimentos de citometría de tinción triple SDC2/CD271/CD45. La Fig. 2B indica BMMNC que expresan niveles bajos/medios del marcador CD45 (naranja). De acuerdo con otros informes, descubrimos que las células positivas para CD271 se encuentran dentro de la población de CD45^{low} (Fig. 2B) y en estos experimentos observamos que el anticuerpo anti-SDC2-APC marcaba células positivas para CD45^{low}/CD271. Específicamente, el anticuerpo anti-SDC2-APC marca los BMMNC CD45^{low}/CD271^{bright}. La población triple positiva (TP) de SDC2⁺/CD45^{low}/CD271⁺ es rara dentro de BMMNC con una frecuencia que varía de 1:16.000 a 1:23.000.

La Fig. 3 muestra que la fracción de MNC SDC2⁺/CD271⁺/CD45⁻ contiene 3000 veces más CFU-F/SSC en comparación con las BMMNC nativas preclasificadas. A la inversa, la fracción SDC2⁻negativa de la población CD271⁺ no retiene un número significativo de CFU-F/SSC

Se realizaron experimentos de clasificación de FACS de células individuales para enumerar el número de células clonogénicas dentro de la población de SDC2⁺/CD271⁺. Las MNC SDC2⁺/CD271⁺/CD45⁻ individuales se clasificaron a 1, 3 y 20 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Un análisis de dilución limitante revela que, a 1 célula por pocillo, se formaron 16-17 clones por placa de 96 pocillos (Fig. 4). Los 16 clones fueron proliferativos y capaces de experimentar de 15 a 20 duplicaciones de la población (Fig. 5). En particular, los clones de SDC2⁺ seleccionados pudieron experimentar condrogénesis significativa en respuesta al cultivo de micromasa in vitro. Los cinco clones mostraron un depósito de glicosaminoglicanos mejorada (GAG) cuando se cultivaron en tensiones bajas (2%) de oxígeno (Fig. 6).

Cuando se comparan con SSC preclasificadas (parentales), las SDC2⁺SSC clasificadas por FACS y expandidas en cultivo muestran un depósito de lípidos significativamente atenuado en respuesta a la estimulación in vitro con medios adipogénicos potentes durante un régimen de diferenciación de 14 días (Fig. 7), tal como se visualiza con tinción de Rojo Aceite O, extracciones y cuantificación. Por el contrario, en comparación con SDC2⁻SSC y SSC pre-clasificadas, la SDC2⁺SSC provoca un depósito mejorado de calcio y una mayor mineralización de la matriz en respuesta a una inducción de 14 días con un medio osteogénico, medido mediante extracción de calcio y tinción de Rojo Alizarina S respectivamente (Fig. 8). En particular, no se observaron diferencias entre las tres poblaciones de SSC cuando se sometieron a cultivo de micromasa condrogénica (Fig. 9).

Las células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) pueden formar túbulos similares a cordones angiogénicos en las 24 horas posteriores a la colocación en placa de matrigel rica en nutrientes. El co-cultivo de SDC2⁺SSC a una proporción de 1:1 con HUVEC en matrigel provoca un aumento de 3 veces en el número de túbulos vasculares estables a las 24 horas (Fig. 10).

Finalmente, la MNC SDC2+/CD45- humana también expresa marcadores estromales clave incluyendo CD146, NG2 (CSPG4) y CD271 (Fig. 11).

La Fig. 12 representa los histogramas de citometría de flujo de SSC derivados de BM y MNC adiposa de tejido de BM de cabra y conejo. Aunque el marcador SDC2 no parece ser detectable en SSC de cabra, se pueden detectar niveles significativos de proteína SDC2 en SSC de conejo (Fig. 12).

Una detección aumentada de la proteína SDC2 se incrementa en SSC equinas cultivadas en respuesta a un cultivo confluyente (Fig. 13). La proteína SDC2 también se puede detectar en una subpoblación de SSC porcina cuando se cultiva a tensión de oxígeno baja (Fig. 13).

El marcador SDC2 se expresa en la superficie de SSC de rata (Fig. 14). Como se ve en la SSC equina, la proteína SDC2 aumenta en la superficie de la SSC de rata en respuesta a la confluencia. Este patrón puede verse en SSC derivado de la médula ósea de tres cepas de laboratorio usadas habitualmente de rata, concretamente, Dark Agouti, Sprague Dawley y Lewis (Fig. 14).

EJEMPLOS

Ejemplo 1.1 - Aislamiento de aspirados de médula ósea

Se obtuvieron muestras de médula ósea humana de la cresta ilíaca posterior de voluntarios sanos (n=3) tras el consentimiento escrito de los pacientes. Los pacientes se sometieron a pruebas de virología para VIH I y II, Hep A/C, HBsAg, núcleo anti-HB, sífilis y CMV de acuerdo con los requisitos de la Directiva de tejidos de la UE 2006/17/EC. En un BSC, las muestras se agrupan y se dividen en alícuotas de 7,5 ml y se someten a centrifugación en gradiente de densidad.

Ejemplo 1.2 - Aislamiento y expansión de SSC humana mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll)

En una vitrina de seguridad biológica bajo técnicas asépticas, se pipetearon 7,5 ml de Ficoll en tubos de centrífuga de 50 ml. Para eliminar los coágulos, los 30 ml de BM se filtraron a través de un tamiz celular de 100 micras (BD Falcon) en un tubo de centrífuga de 50 ml. La médula filtrada se diluyó 1/1 en D-PBS y luego se dividió uniformemente entre los 4 tubos que contenían Ficoll, pipeteando lentamente la BM en el lado del tubo que se encuentra en un ángulo de 35° a 45° para asegurar una liberación lenta de la BM, sin alterar el Ficoll ni producir burbujas. Los tubos se centrifugaron luego durante 22 minutos a 900 g con frenos de centrífuga establecidos a cero para formar una muestra fraccionada. Después de la centrifugación, los contenidos del tubo formaron tres capas; una capa superior de plasma, una capa delgada - capa leucocitaria - contiene la MNC, una capa transparente de Ficoll y una capa inferior que contiene los componentes de los glóbulos rojos: eritrocitos y granulocitos. La capa leucocitaria se aspiró cuidadosamente teniendo cuidado de no alterar las células circundantes. Estas células se transfirieron luego a otro tubo de centrífuga de 50 ml y se resuspendieron en 45 ml de D-PBS. Estos tubos se centrifugaron luego durante 10 minutos a 350 g. El sobrenadante se aspiró y los sedimentos se resuspendieron en 5 ml de medio completo. Estos se centrifugaron durante 10 minutos a 350 g. Se aspiró el sobrenadante y se agruparon los sedimentos en 5 ml de D-PBS.

Ejemplo 1.3 - Siembra de placas CFU-F

Después del aislamiento de células mononucleares a través de colocación en placas directa o Ficoll, se aislaron 9×10^6 células a partir de ambos conjuntos de células y se sembraron en placas de 10 cm por triplicado a una densidad de siembra de 3×10^6 MNC/placa. Estas células se lavaron y se alimentaron al mismo tiempo que las células en cultivo como se ha explicado anteriormente.

Ejemplo 1.4 - Tinción de CFU-F con Violeta Cristal

En los días 12-14, las células se fijaron y se tiñeron para el análisis de CFU-F. El medio se aspiró de las placas y las placas se lavaron tres veces en D-PBS para eliminar cualquier medio restante. Las células se fijaron pipeteando 8 ml de metanol al 95% almacenado a -20° C, en las células durante 10 minutos y removiendo suavemente. El metanol se aspiró de las placas y las células se lavaron una vez con D-PBS. Luego se añadieron 8 ml de violeta cristal (violeta cristal al 0,5%, metanol al 99,5%) a las placas y las placas se removieron suavemente. Las placas se dejaron durante 10-15 minutos. El exceso de violeta cristal se aspiró y las células se lavaron tres veces con D-PBS para eliminar el exceso de tinción restante. Luego se invirtieron las placas y se dejaron secar durante la noche. Se tomaron imágenes luego de las placas secas usando un escáner de lecho plano. Las colonias se contaron luego y se caracterizadas mediante inspección visual bajo un microscopio de luz invertida (Olympus CKx41). Las colonias compuestas de grupos mayores que 50+ se contaron como una CFU.

Ejemplo 2 - Análisis de anticuerpos de células mononucleares y células madre estromales

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

Tabla 1:

Anticuerpo	Proveedor	Nº de Catálogo
CD362/Sidecan-2	R&D Systems	N/A
CD271/LNGFR	BD	N/A
W8B2/TNAP/ALBA	Miltenyi	N/A
TWEAK/TNFSF13	BD	N/A
ABRIL/CD256	BD	N/A
CD146	BD	N/A
CD105	Invitrogen	MHCD10504
CD73	BD	550257
CD90	BD	555596
CD14	AbD Serotec	SFL2185
CD19	BD	345777
CD3	BD	345765
CD34	BD	555822
CD45	BD	555483
Γ1, γ2a controles	BD	342409
HLA-DR	Invitrogen	MHLDR04
Γ2b control	Caltag	MG2b04

Preparación de la solución de bloqueo

La solución de bloqueo se preparó añadiendo 1 ml de FBS a 49 ml de D-PBS en un tubo de 50 ml.

Preparación de la muestra

Las células se tripsinizaron a 37° C y se transfirieron a medios de cultivo en un tubo de 15 ml. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo completo. Los recuentos celulares y las pruebas de viabilidad se realizaron usando azul de tripano. Las células se centrifugaron luego durante 5 minutos a 400 g y se aspiró el sobrenadante. La solución de bloqueo se añadió luego a los sedimentos celulares para resuspender las células a 1×10^6 células/ml.

Tinción de SSC (Análisis sobre FACS Canto)

Los anticuerpos marcados con PE se retiraron de la refrigeración y se colocaron en hielo junto con una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Sarstedt) y una solución de bloqueo. Se pipetearon 1×10^5 células (100 µL) en cada uno de los 12 pocillos de la placa de 96 pocillos en hielo, uno para cada anticuerpo y 1 para las células no teñidas. La placa se centrifugó luego durante 4 minutos a 400 g, 4° C. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente para no alterar el sedimento celular y se añadieron 50 µl de solución de bloqueo a cada pocillo y el sedimento se resuspendió pipeteando la solución.

Ejemplo 3 - Diferenciación condrogénica de SSC

La Tabla 2 muestra la composición de los medios condrogénicos incompletos (ICM).

Tabla 2:

Reactivo	Volumen	Concentración Final
DMEM (HG)	95 ml	
Dexametasona 1 mM	10 µl	100nM
Ácido ascórbico 2-P: 5 mg/ml	1ml	50 µg/ml
L-Prolina: 4mg/ml	1ml	40 µg/ml
Suplemento ITS+	1ml	6.25 µg/ml de insulina bovina
		6,25 µg/ml de transferrina
		6.25 µg/ml de ácido seleno
		5.33 µg/ml de ácido linoleico
		1.25 mg de bsa
Piruvato de sodio	1ml	1mM
Penicilina/Estreptomicina	1ml	100u/ml de penicilina
		100 µg/ml de estreptomicina

Las células se descongelaron usando un baño de agua a 37° C y se transfirieron rápidamente al medio de cultivo en un tubo de 15 ml, lavando el criovial con 1 ml de medio. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo completo. Se realizó el recuento celular y se recolectaron suficientes células para formar sedimentos de entre $2-2.5 \times 10^5$ células/sedimento. Se establecieron 4 cultivos positivos y 2 cultivos negativos para cada muestra. Las células se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 400 g para eliminar el medio de cultivo. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 3 ml de medio condrogénico incompleto (ICM). La suspensión de células de 3 ml se dividió en tubos de 15 ml (2 ml para sedimentos positivos, 1 ml para sedimentos negativos). Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 100 g. Las células para sedimentos positivos se resuspendieron en 500 µl de medio condrogénico completo (CCM) para cada sedimento que se formó. La CCM consiste de ICM con 0,5 µl de TGF-β por ml de ICM.

Las células para el sedimento negativo se resuspendieron en 500 µl de ICM para cada sedimento que se formó. Las células se transfirieron a tubos Eppendorf con tapón de rosca y se centrifugaron durante 5 minutos a 100 g en un rotor oscilante. Los tapones de los tubos se aflojaron para permitir el intercambio de gases y se incubaron en BSC a 37° C, 5% de CO₂. El medio se cambió cada dos días aspirando la mayor cantidad de medio posible sin alterar el sedimento y reemplazando con CCM o ICM para sedimentos positivos y sedimentos negativos, respectivamente. En el día 21, los sedimentos celulares se recogieron mediante aspiración de todos los medios y se lavaron dos veces en D-PBS. Los sedimentos se dejaron secar al aire y 3 de los 4 sedimentos positivos se usaron para la medición de GAG y el otro se usó para histología. Los sedimentos para la medición de GAG se almacenaron a -20° C y el sedimento usado para histología se fijó en formalina al 10% durante 1 hora y luego se almacenó en agua hasta que estuvo listo para ser procesado.

Ejemplo 4 - Ensayo condrogénico

Preparación de la solución madre de DMMB

Se disolvieron 16 mg de DMMB durante la noche en 5 ml de etanol al 100% de grado reactivo. Se agregaron 2,73 g de NaCl y 3,04 g de glicina a 975 ml de agua desionizada. Se añadieron 0,69 ml de HCl concentrado (11,6 M) a esta solución y se mezclaron. Se añadió DMMB disuelto a esta solución. El recipiente de DMMB se enjuagó repetidamente con agua DI hasta que se transfirió toda la solución de DMMB. El pH se ajustó a 3,0 con HCl 1M. El volumen se ajustó a 1 l con agua desionizada y la solución se protegió de la luz envolviéndola en papel de aluminio.

La solución de papaína se preparó disolviendo 1 mg de papaína (Sigma P4762) en 9,75 ml de tampón diluido caliente. La papaína diluida se preparó agregando 250 µl de esta solución a 10 ml de tampón de dilución.

Se añadieron 200 µl de solución de papaína a cada sedimento y se dejó digerir durante la noche en un horno a 60° C. Las muestras se agitaron en vórtice luego para dispersar el sedimento. Los estándares se elaboraron usando condroitina-6-sulfato (Sigma C4384) añadiendo 4 mg de condroitina-6-sulfato a 10 ml de tampón de dilución, obteniendo un stock de 400 µg/ml. Esto se diluyó luego para dar una solución de 40 µg/ml. Las diluciones se realizaron como sigue a partir de esta solución de 40 µg/ml como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3:

Solución de sulfato de condroitina (40 µg/ml)	Tampón de dilución	Concentración GAG/pocillo (50µl)
200µl	0 µl	2µg
180µl	20µl	1.8µg
160µl	40µl	1.6µg
120µl	80 µl	1.2µg
80 µl	120µl	0.8µg
40µl	160µl	0.4µg
0 µl	200µl	0µg

Se añadieron 50 µl de estándares y muestras por triplicado a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µl de solución madre de DMMB a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 5 minutos. Las placas se leyeron usando un lector de placas de absorbancia a 595 nm. Las lecturas de absorbancia para los estándares que contenían 0 µl de GAG/pocillo se usaron como un valor blanco y se restaron de otras lecturas de absorbancia.

Medición de ADN usando PicoGreen

La solución 1xTE se preparó diluyendo la solución madre 20x proporcionada en el kit Quant-iT (Sigma P7589) 1 en 20 partes en agua destilada. Se preparó una solución de PicoGreen diluida diluyendo DMSO a 1 en 200 partes de dH₂O. El stock de ADN (100 µg/ml) se diluyó en 1xTE 50 veces para dar una concentración final de 2 µg/ml. Los estándares de ADN se prepararon como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4:

Stock de trabajo de ADN	1xTE	Conc. final ADN/ml
400 µl	0	2000ng
200µl	200µl	1000ng
100 µl	300 µl	500ng
40µl	360 µl	200ng
20µl	380µl	100ng
10µl	390µl	50 ng
4 µl	396µl	10ng
0 µl	400 µl	0ng

Las muestras digeridas con papaína (descritas anteriormente) se diluyeron adicionalmente 25 veces en 1xTE. Se añadieron 100 µl de estándares y muestras por triplicado a una placa negra de 96 pocillos. La placa debe ser negra ya que la reacción se ve afectada por la luz. Se añadieron 100 µl de solución de PicoGreen a cada pocillo de estándar y muestra y se dejó incuban durante 2-3 minutos. Las placas se leen en el lector de placas fluorescentes excitando primero la placa a 485 nm y luego leyendo la placa a 538 nm.

Ejemplo 5 - Diferenciación adipogénica de SSC

La tabla 5 muestra la composición de los medios de inducción adipogénicos.

Tabla 5:

Reactivo	Volumen (para hacer 100 ml)	Concentración Final
DMEM (HG)	87.6 ml	
Dexametasona 1 mM	100 µl	1 µM
Insulina 1mg/ml	1ml	10 µg/ml
Indometacina 100mM	200µl	200 µM
MEZCLA 500MM	100 µl	500µM
Penicilina/Estreptomicina	1ml	100u/ml de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina
FBS	10 ml	10%

La tabla 6 muestra la composición de los medios de mantenimiento adipogénicos.

Tabla 6:

Reactivo	Volumen (para hacer 100 ml)	Concentración Final
DMEM (HG)	88 ml	
Insulina 1mg/ml	1ml	10 µg/ml
Penicilina/estreptomicina	1ml	100u/ml de penicilina
		100 µg/ml de estreptomicina
FBS	10 ml	10%

Las células se descongelaron utilizando un baño de agua a 37° C y se transfirieron rápidamente a los medios de cultivo en un tubo de 15 ml, lavando el criovial con 1 ml de medio. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo completo. Se realizó el recuento celular y se recogieron suficientes células para sembrar células en confluencia (4×10^4 células/pocillo) en una placa de 24 pocillos con fondo plano. Se instalaron 4 pocillos de prueba y 4 pocillos de control. Las células se sembraron en 1 ml de medio de cultivo en cada pocillo. Las células se incubaron a 37° C, 5% de CO₂ y después de 48 horas se observó que las células se habían adherido al plástico y parecían confluentes. Para probar los pocillos, los medios de cultivo completos se reemplazaron con 1 ml de medio de inducción adipogénico y se dejaron durante 3 días. Los pocillos de control se reemplazaron con medio de cultivo completo. Después de 3 días en medio de cultivo adipogénico, el medio en los pocillos de prueba se reemplazó con 1 ml/pocillo de medio de mantenimiento y se dejó durante 1 a 3 días. Luego se reemplazó con 1 ml/pocillo de medio de mantenimiento. Este proceso se repitió tres veces. Después del cambio final del medio al medio de mantenimiento, las células se dejaron en el medio de 5 a 7 días antes de la recogida.

Ejemplo 6 - Ensayo adipogénico

Tinción Rojo Aceite O

Se preparó una solución de trabajo de Rojo Aceite O mezclando 6 partes de la solución madre de Rojo Aceite O con 4 partes de dH₂O. La solución se dejó reposar durante 10 minutos y luego se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 1.

El medio se aspiró y las células se lavaron dos veces en D-PBS. Las células se fijaron luego en formalina al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. La formalina se aspiró y las placas se enjuagaron en dH₂O. Se pipetearon 500 µl de solución de trabajo de Rojo Aceite O a cada pocillo para cubrir la capa de células. La placa se rotó lentamente en el movimiento de la figura 8 para esparcir el Rojo Aceite O sobre las células de manera uniforme y se dejó durante 5 minutos. La tinción se aspiró y el exceso de tinción se eliminó añadiendo 2 ml/pocillo de isopropanol al 60%. Las placas se removieron de nuevo en el movimiento de la figura 8 y se aspiró el isopropanol. Las placas se enjuagaron con agua del grifo hasta que el agua salió de la placa suavemente. Las muestras se almacenaron en dH₂O hasta que se tomaron las imágenes.

Extracción de lípidos teñidos

Después de obtener imágenes de las muestras, se aspiró el agua de los pocillos. Se extrajo el Rojo Aceite O pipeteando isopropanol (2x500 µl) sobre la superficie de los pocillos varias veces. El isopropanol y el tinte se transfirieron luego a un tubo Eppendorf. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 500 g para sedimentos y residuos en las muestras. Se añadieron 200 µl de la tinción extraída para cada muestra por triplicado a una placa de 96 pocillos. La tinción se midió usando un lector de placas a 520 nm.

Ejemplo 7 - Diferenciación osteogénica de SSC

La Tabla 7 muestra la composición de los medios de diferenciación osteogénicos.

Tabla 7:

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

Las células se descongelaron usando un baño de agua a 37° C y se transfirieron rápidamente al medio de cultivo en un tubo de 15 ml, lavando el criovial con 1 ml de medio. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo completo. Se realizó el recuento de células y se recogieron suficientes células para sembrar células en confluencia (4×10^4 células/pocillo) en una placa de 24 pocillos con fondo plano. Se instalaron 4 pocillos de prueba y 4 pocillos de control. Las células se sembraron en 1 ml de medio de cultivo en cada pocillo. Las células se incubaron a 37° C, 5% de CO₂ y después de 48 horas se observó que las células se habían adherido al plástico y parecían confluentes. El medio en los pocillos de prueba se reemplazó con medio osteogénico y el medio en los pocillos de control se reemplazó con medio de cultivo completo. El medio en todos los pocillos se cambió dos veces por semana. Las células se recogieron entre los días 10 y 17.

Ensayo osteogénico

Se usan 1 de 4 pocillos de prueba y pocillos de control para la tinción con rojo de Alizarina. Los otros 3 se usaron para la cuantificación de calcio.

Tinción con Rojo Alizarina

Se preparó solución de Rojo Alizarina S al 2% disolviendo 2 g de Rojo Alizarina S en 100 ml de dH₂O. La solución se mezcló y el pH se ajustó a aproximadamente 4,1-4,3 con hidróxido de amonio al 1%, ya que el pH es esencial para el proceso de tinción. El medio se aspiró de los pocillos. Las células se lavaron dos veces en D-PBS para eliminar los medios restantes para asegurar que no se produjera la tinción del medio. Se preparó 95% de metanol diluyendo 95 ml de metanol al 100% con 5 ml de agua. El metanol se almacenó luego en hielo a baja temperatura. Las células se fijaron en metanol helado durante 10 minutos. El metanol se aspiró y las células se enjuagaron en dH₂O. Se añadieron 500 µl de Rojo Alizarina S al 2% a los pocillos y se dejó durante 5 minutos, ocasionalmente removiendo suavemente la placa en el movimiento de la figura 8. Después de 5 minutos la tinción de calcio era visible. Las células se enjuagaron en dH₂O y se tomaron imágenes con una Olympus CKx41.

Ensayo de calcio

Se preparó HCl 0,5 M diluyendo 4,3 ml de HCl 11,6 M en 95,7 ml de agua. El medio se aspiró de los pocillos y los pocillos se lavaron dos veces en D-PBS para eliminar cualquier medio restante. Se añadieron 0,2 ml de HCl 0,5 M a cada pocillo y las células se rasparon de los pocillos usando un raspador de células y se recogieron en tubos Eppendorf etiquetados. La solución se dejó agitar durante la noche en un agitador de células en una habitación fría oscura. Las muestras se centrifugaron brevemente para sedimentar los residuos celulares. El ensayo de calcio se realizó usando un kit Stanbio. Se preparó una solución de trabajo de 1:1 de reactivo de unión y colorante de trabajo.

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

Tabla 8:

Concentración (µg/pocillo)	Volumen 10 mg/dl std/pocillo
0	0
0.05	0.5µl
0.10	1 µl
0.2	2µl
0.4	4 µl
0.6	6µl
0.8	8 µl
1.0	10µl

Los estándares y las muestras se sembraron por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 10 µl de HCl 0,5 M a cada pocillo estándar. Se añadieron 10 µl de muestras a cada pozo. Se añadieron 200 µl de solución de trabajo a cada pocillo estándar y de muestra. La absorbancia se leyó a 550-650 nm usando un Victor3™ 1420.

Se co-tiñó SDC2 con Sca1 en la superficie en BMMNC murino CD45-ve de la cepa C57/Bl6. Además, la clasificación FACS de MNC SDC2+/Sca1+ de médula murina revela que SDC2 marca una subpoblación autorenovable de SSC que puede formar CFU-F a frecuencias significativamente aumentadas en comparación con las MNC pre-clasificadas en placa.

10 **Ejemplo de referencia 8 - Células SDC2⁺ de células pluripotentes humanas**

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

Se colocaron en placas BM-SSC y ES-SSC (células madre mesenquimales humanas Millipore (derivadas de células hES)) a una densidad de 10^5 células por pocillo de una placa de 6 pocillos (Nunc) en medio completo (BM-SSC: α - MEM, 10% de FBS; ES-SSC: Kit de Medio Completo Millipore FibroGRO™ LS) y se dejaron adherir durante la noche. Las células se recogieron cuando alcanzaron niveles de subconfluencia (~60% de confluencia) y niveles de confluencia (100% de confluencia).

Los resultados del análisis de citometría de flujo de marcadores de SSC "clásicos" ilustraron que las BM-SSC y ES-SSC tenían una expresión similar de CD73. La expresión del marcador CD105 permaneció igual tanto para los cultivos confluentes como los subconfluentes; la expresión de CD105 pareció disminuir al aumentar la confluencia. La expresión de SDC2 por BM- y ES-SSC se mantuvo consistente en condiciones de cultivo confluyente y subconfluyente; el porcentaje de población de BM-SSC que expresa SDC2 aumenta en el cultivo confluyente y es consistentemente alto para las ES-SSC en cultivos confluentes y no confluentes. La RFI de la expresión de SDC2 por ES-SSC es más alta.

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

35 **Ejemplo 9 - Células SDC2⁺ en el tratamiento de lesiones pulmonares inducidas por respirador en métodos y materiales de ratas**

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

40 **Aislamiento y cultivo de hSSC**

Las SSC humanas (hSSC) se aislaron de voluntarios adultos como se ha descrito anteriormente. Después de la aspiración, la médula ósea se colocó en placas en matraces de cultivo de tejidos. Las células adherentes se cultivaron hasta un 80% de confluencia y luego se tripsinizaron y el cultivo se expandió al pase 4, después de lo cual se usaron para experimentos. Las SSC se caracterizaron de acuerdo con las directrices internacionales. Los fibroblastos, usados como células de control, se obtuvieron de una línea celular estable como se ha descrito anteriormente.

50 **Serie 1 [Lesión pulmonar inducida por respirador]**

- Se anestesiaron ratas Sprague Dawley macho adultas, se intubaron orotraquealmente y se aleatorizaron para someterse a una ventilación mecánica perjudicial.
- Se usaron los siguientes ajustes del respirador: P_{insp} 35 cmH₂O, frecuencia respiratoria 18 min⁻¹, y PEEP 0 cmH₂O. Cuando el cumplimiento de la estática respiratoria hubo disminuido en un 50%, los animales pudieron recuperarse.
- Tras la recuperación, los animales se asignaron al azar a la administración intravenosa de: (i) vehículo (PBS, 300 µl); (ii) fibroblastos (4×10^6 células); (iii) SSC humanas (4×10^6 células) o (iv) células de la divulgación, referidas como S2⁺SSC humanas (4×10^6 células); en un diseño de cuatro grupos.
- La extensión de la recuperación después de ALI y la respuesta inflamatoria se evaluaron después de 24 horas.

60 **Serie 2 [Ventilación protectora de elasticidad reducida]**

- Se anestesiaron ratas Sprague Dawley macho adultas, se intubaron orotraquealmente y se asignaron al azar a ventilación mecánica de elasticidad reducida.
- El protocolo de "elasticidad reducida" comprende la ventilación mecánica durante 90 minutos con los

siguientes ajustes: FiO_2 de 0,3, frecuencia respiratoria $80.\text{min}^{-1}$, volumen tidal 6 ml.kg^{-1} y presión espiratoria final positiva de $2 \text{ cm H}_2\text{O}$

- Tras la recuperación, los animales se asignaron al azar a la administración intravenosa de: (i) vehículo (PBS, $300 \mu\text{l}$); (ii) fibroblastos (4×10^6 células); o (iii) SSC humanas intra-traqueal (4×10^6 células); en un diseño de seis grupos.
- La extensión de la recuperación después de ALI y la respuesta inflamatoria se evaluaron después de 24 horas.

Análisis estadístico

La distribución de todos los datos se probó para determinar su normalidad mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido por Student-Newman-Keuls, o por Kruskalis-Wallis, seguido de la prueba U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, como fuese apropiado. Los supuestos del modelo subyacentes se consideraron apropiados en base a gráficos residuales adecuados. Un valor de p de dos colas de <0.05 se consideró significativo.

Resultados

Eficacia de las S2⁺SSC para mejorar la recuperación del ALI inducido por ventilación

Se introdujeron 40 animales en el protocolo experimental, con 10 asignados a cada uno de los grupos VILI. Cuatro animales VILI, dos asignados para recibir vehículo y dos asignados para recibir fibroblastos, no sobrevivieron al protocolo de lesiones. Todos los demás animales sobrevivieron al protocolo de lesiones y la posterior asignación de tratamiento. Se introdujeron 8 animales cada uno en el control del vehículo y los grupos de fibroblastos, mientras que 10 animales recibieron cada uno hSSC y S2⁺SSC.

Características de referencia: No hubo diferencias entre los grupos VILI en el valor de referencia en términos de variables antes de la lesión, la duración de la ventilación perjudicial o la extensión de la lesión pulmonar producida (**Tabla 9**).

Tabla 9 : Datos de referencia referentes a animales sometidos a ventilación de elasticidad alta.

Variable	Ventilación de alto estiramiento			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSC	S2 ⁺ SSC
Número de animales	8	8	10	10
Peso del animal (g)	400 ± 26	392 ± 51	410 ± 19	417 ± 18
Tiempo de ventilación (minutos)	76 ± 27	76 ± 16	77 ± 19	78 ± 14
Cumplimiento pulmonar Pre-lesión (ml/mmHg)	0.64 ± 0.09	0.66 ± 0.12	0.67 ± 0.13	0.66 ± 0.11
Cumplimiento pulmonar post-VILI	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03
Nota: Los datos se expresan como media $\pm$ SD.				

S2⁺SSC restauró la función y la estructura pulmonar después de VILI: La terapia con S2⁺SSC mejoró la restauración de la oxigenación arterial, como se evidencia por un gradiente de oxígeno alveolar-arterial reducido en comparación con el vehículo ($p < 0,05$). La recuperación funcional adicional en fisiología pulmonar en respuesta a la terapia S2⁺SSC se demostró por mejoras significativas ($p < 0,01$) en el cumplimiento estático del sistema respiratorio en comparación con el vehículo.

Las S2⁺SSC mejoraron la permeabilidad microvascular pulmonar, como se demuestra por una disminución en las relaciones pulmón húmedo:peso seco y una disminución en las concentraciones de proteína en el líquido alveolar (**Tabla 10**). Las hSSC mejoraron la recuperación de la estructura pulmonar. Las S2⁺SSC disminuyeron el engrosamiento alveolar, como se demuestra por la reducción de la fracción del volumen del tejido alveolar y la recuperación aumentada del volumen del espacio aéreo, como se demuestra por la mayor fracción del volumen del espacio aéreo alveolar (**Tabla 10**).

Tabla 10 : Datos referentes al alcance de la resolución 24 horas después de una ventilación de elasticidad alta.

Variable	Ventilación de elasticidad alta			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSC	S2 ⁺ SSC
Tensión de O ₂ arterial (FiO ₂ = 0,3; KPa)	13.4 ± 2.8	12.7 ± 2.8	16.9 ± 2.9*	17.0 ± 1.7*
Tensión de O ₂ arterial (FiO ₂ = 1.0; KPa)	32.1 ± 13.1	32.8 ± 16.0	65.3 ± 9.4*	56.2 ± 14.4*
Cumplimiento estático pulmonar (ml/mmHg)	0.37 ± 0.04	0.34 ± 0.08	0.55 ± 0.14*	0.53 ± 0.08*
Relaciones Humedad pulmonar: peso seco	5.9 ± 0.8	5.4 ± 0.9	4.6 ± 0.2*	4.3 ± 0.7*
Nota: Los datos se expresan como media ± SD. Los datos finales son datos recopilados una vez completado el protocolo experimental. * Grupos de vehículos y fibroblastos significativamente diferentes.				

Inflamación modulada por S2⁺SSC después de VILI: Las S2⁺SSC disminuyeron los recuentos de células inflamatorias totales en el líquido BAL (lavado broncoalveolar) y atenuaron sustancialmente (p <0,001) la acumulación de neutrófilos pulmonar. Tanto las S2⁺SSC como las hSSC indiferenciadas fueron igualmente eficaces para modular la respuesta inflamatoria después de VILI (**Tabla 11**).

Tabla 11 : Datos referentes a la respuesta inflamatoria 24 horas después de la ventilación de elasticidad alta.

Variable	Ventilación de elasticidad alta			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSC	S2 ⁺ SSC
Recuentos de células BAL (x 10 ⁶ /ml)	2.91 ± 1.0	3.42 ± 0.86	1.30 ± 0.32*	1.50 ± 0.51*
% Neutrófilos de BAL (%)	44.7 ± 12.2	56.7 ± 3.4	15.8 ± 8.5*	16.0 ± 8.5*
Recuentos de neutrófilos BAL (x 10 ⁶ / ml)	1.31 ± 0.60	1.92 ± 0.44	0.20 ± 0.10*	0.27 ± 0.22*
Recuentos de linfocitos BAL (x 10 ⁵ /ml)	1.57 ± 1.02	0.94 ± 0.44	0.57 ± 0.14†	1.03 ± 0.67
Nota: Los datos se expresan como media ± SD. Los datos finales son datos recopilados una vez completado el protocolo experimental. * Grupos de vehículo y fibroblastos significativamente diferentes. † Significativamente diferente del grupo de vehículo				

Efecto en los parámetros de 'no lesión': No hubo efecto de S2⁺SSC o hSSC indiferenciadas en el pH arterial, PCO₂, bicarbonato, exceso de base, lactato o presión arterial media (datos no mostrados).

Efecto de S2⁺SSC en animales después de la ventilación de baja elasticidad

Se introdujeron 16 animales en el protocolo experimental, con 4 asignados a cada uno de los grupos. Todos los animales sobrevivieron al protocolo de lesión y la posterior asignación de tratamiento.

Características de referencia: No hubo diferencias entre los grupos de ventilación protectora en el valor de referencia en términos de variables antes de la lesión, la duración de la ventilación perjudicial o la extensión de la lesión pulmonar producida (datos no mostrados).

Las SC⁺SSC no afectaron a la función o estructura pulmonar: la terapia con S2⁺SSC no tuvo ningún efecto sobre la estructura o la función pulmonar después de la ventilación protectora (**Tabla 12**).

Tabla 12: Datos referentes al alcance de la resolución 24 horas después de una ventilación de elasticidad baja.

Variable	Ventilación de baja elasticidad			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSC	S2 ⁺ SSC
Tensión de O ₂ arterial (FiO ₂ = 0,3; KPa)	17.6 ± 1.2	17.8 ± 0.8	17.8 ± 0.6	18.5 ± 0.7
Tensión de O ₂ arterial (FiO ₂ = 1.0; KPa)	65.8 ± 1.7	69.2 ± 1.7	68.8 ± 3.3	64.3 ± 6.3
Cumplimiento estático pulmonar (ml/mmHg)	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.64 ± 0.02	0.61 ± 0.04
Relaciones Humedad pulmonar: Peso seco	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.6
Nota: Los datos se expresan como media ± SD. Los datos finales son datos recopilados una vez completado el protocolo experimental.				

Las S2⁺SSC no provocaron inflamación: no hubo efecto de la terapia con S2⁺SSC sobre la respuesta inflamatoria en la estructura pulmonar después de la ventilación protectora (**Tabla 13**).

Tabla 13: Datos referentes a la respuesta inflamatoria a las 24 horas después de la ventilación de elasticidad baja.

Variable	Ventilación de baja elasticidad			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSC	S2 + SSC
Recuentos de células BAL (x 10 ⁶ /ml)	1.24 ± 0.24	1.08 ± 0.13	1.01 ± 0.10	1.14 ± 0.32
% de neutrófilos BAL (%)	11.3 ± 2.8	9.8 ± 2.1	20.8 ± 4.9	10.3 ± 2.0
Recuentos de neutrófilos BAL (x 10 ⁶ / ml)	0.14 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.11 ± 0.03
Recuentos de linfocitos BAL (x 10 ⁵ /ml)	0.64 ± 0.16	0.65 ± 0.38	0.65 ± 0.52	0.59 ± 0.31
Nota: Los datos se expresan como media ± SD. Los datos finales son datos recopilados una vez completado el protocolo experimental.				

Efecto sobre los parámetros de "no lesión": No hubo efecto de S2+SSC o hSSC indiferenciadas sobre el pH arterial, PCO₂, bicarbonato, exceso de base, lactato o presión arterial media (Tabla 14).

Tabla 14: Datos referentes a los parámetros de "no lesión" 24 horas después de una ventilación de elasticidad baja

Variable	Ventilación de baja elasticidad			
	Vehículo	Fibroblastos	hSSC	S2+SSC
PH arterial	7.40 ± 0.04	7.39 ± 0.03	7.38 ± 0.03	7.40 ± 0.04
PCO ₂ arterial (KPa)	5.4 ± 0.8	5.5 ± 0.2	5.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3
Bicarbonato arterial (mMol/L)	20.5 ± 2.0	22.0 ± 1.5	20.9 ± 1.0	21.7 ± 2.1
Exceso de Base	3.4 ± 1.5	3.3 ± 1.7	3.4 ± 2.0	2.8 ± 1.8
Lactato arterial (mMol/L)	3.1 ± 1.4	2.2 ± 0.6	2.1 ± 0.8	2.0 ± 1.2
Presión arterial Media (mmHg)	113.2 ± 2.7	101.0 ± 10.7	98.0 ± 13.7	99.5 ± 17.1
Nota: Los datos se expresan como media ± SD. Los datos finales son datos recopilados una vez completado el protocolo experimental.				

Conclusiones

Las S2+SSC de la divulgación restauraron la función y la estructura pulmonar después de VILI, como se demuestra por un gradiente de oxígeno alveolar-arterial reducido, mejoras significativas ($p < 0.01$) en el cumplimiento estático del sistema respiratorio, y una permeabilidad microvascular pulmonar mejorada. Además, mejoraron la recuperación de la estructura pulmonar después de VILI. Las células modularon la inflamación después de VILI, disminuyendo los recuentos de células inflamatorias totales en el líquido BAL y atenuando sustancialmente la acumulación de neutrófilos en los pulmones ($p < 0.001$). No hubo efecto de la terapia con S2+SSC en la estructura o función pulmonar, o en la respuesta inflamatoria, después de la ventilación protectora. Estos descubrimientos sugieren que las células de la divulgación son bien toleradas en este modelo.

La invención proporciona por tanto métodos para obtener poblaciones de células madre estromales definidas y usos de las mismas.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de aislamiento de una célula madre estromal, que comprende el aislamiento de una célula a partir de una población mixta de células de mamífero basada en la expresión de Sindecán-2, y en donde la población de células mixta comprende células del cordón umbilical o células de sangre del cordón umbilical.
- 10 **2.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un anticuerpo reconoce Sindecán-2 en una célula humana y reacciona de forma cruzada con un marcador de superficie celular en una célula de ratón y opcionalmente con un marcador de superficie celular en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de rata, caballo, conejo y cerdo.
- 15 **3.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que un anticuerpo reconoce Sindecán-2 en una célula humana y reacciona de forma cruzada con un marcador de superficie celular en una célula de rata y opcionalmente con un marcador de superficie celular en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de ratón, caballo, conejo y cerdo.
- 20 **4.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un anticuerpo reconoce Sindecán-2 en una célula equina y reacciona de forma cruzada con un marcador de superficie celular en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, rata, conejo y cerdo.
- 25 **5.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el Sindecán-2 se expresa en una célula humana y el Sindecán-2 correspondiente se expresa en una célula de ratón y opcionalmente también en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de rata, caballo, conejo y cerdo.
- 30 **6.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el Sindecán-2 se expresa en una célula humana y el Sindecán-2 correspondiente se expresa en una célula de rata y opcionalmente también en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células de ratón, caballo, conejo y cerdo.
- 35 **7.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el Sindecán-2 se expresa en una célula equina y el Sindecán-2 correspondiente se expresa en por lo menos otra célula de mamífero seleccionada de células humanas, de ratón, rata, conejo y cerdo.
- 40 **8.** Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para el aislamiento de células humanas.
- 45 **9.** Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el 30% o más de las células son positivas para Sindecán-2.
- 50 **10.** Un método para obtener una población de células, que comprende aislar células de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y derivar la población a partir de esas células aisladas.
- 55 **11.** Un método para obtener una población clonal de células, que comprende aislar una célula individual de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y derivar una población clonal de células a partir de la célula individual.
- 60 **12.** Un método para obtener una población de células, que comprende obtener una población inicial de células de acuerdo con el método de la reivindicación 10 u 11 y luego seguir creciendo y/o expandiendo y/o pasando las células en cultivo.
- 65 **13.** Un método para obtener tejido para su uso en terapia, que comprende obtener células de acuerdo con el método de cualquier reivindicación anterior, y obtener tejido de las mismas.

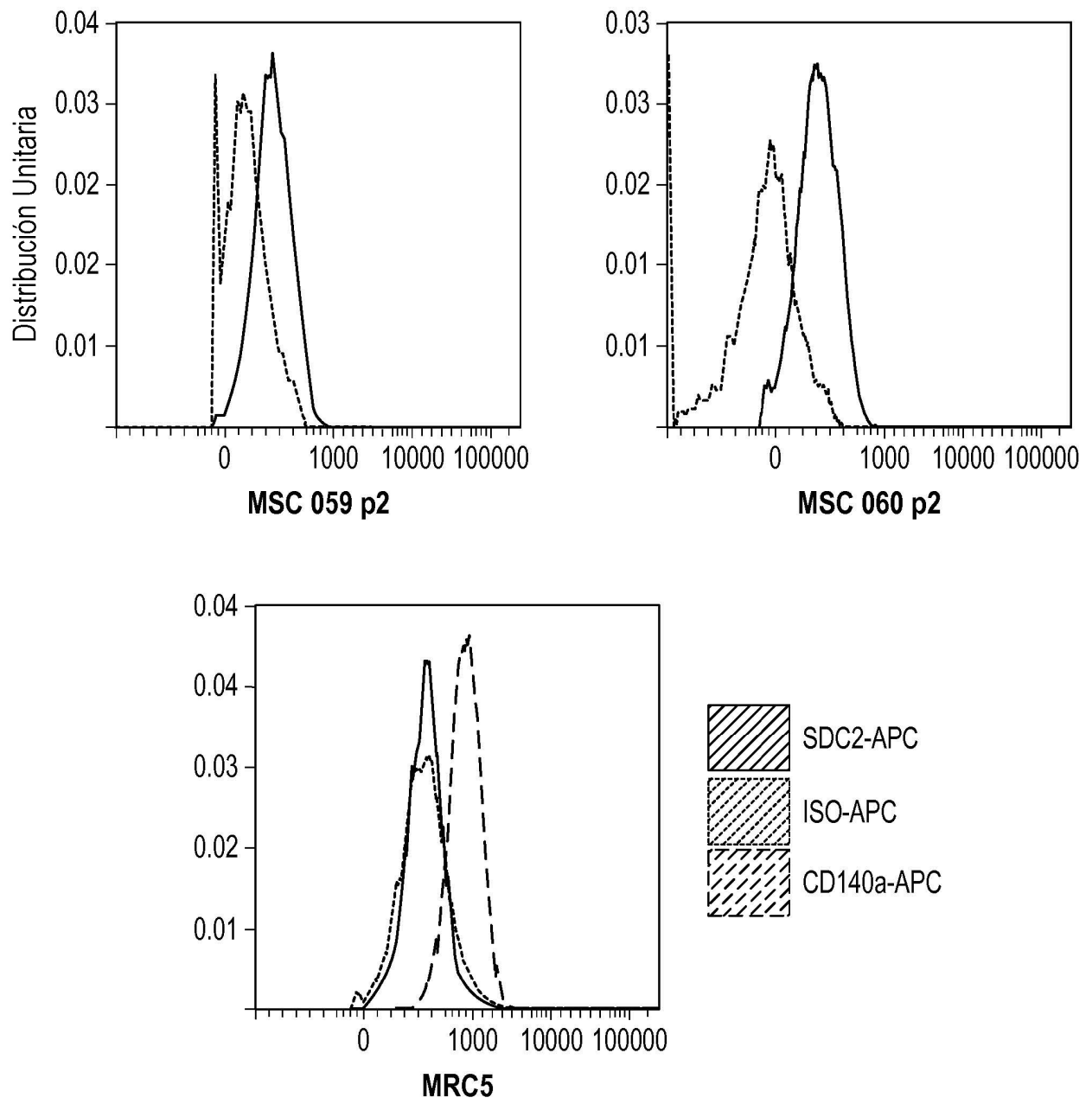
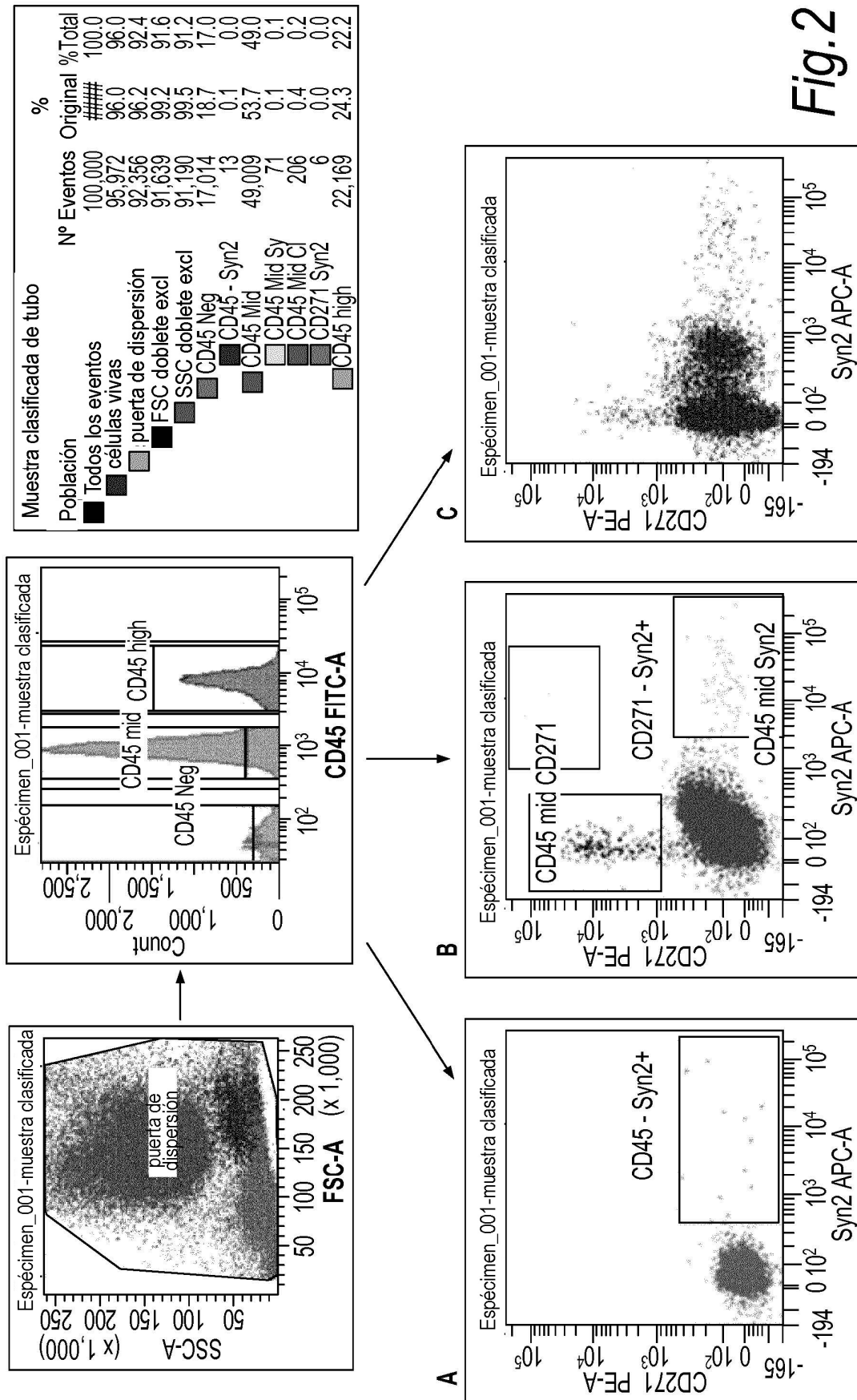


Fig.1



MNC seleccionada S2+/CD27 1 muestra 3000 veces de enriquecimiento en CFU-F

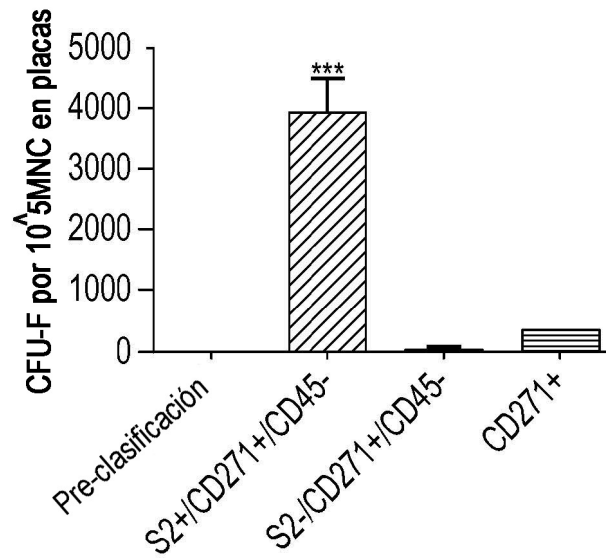


Fig.3

Análisis de Dilución de Limitación de Clones SDC2+/CD271+

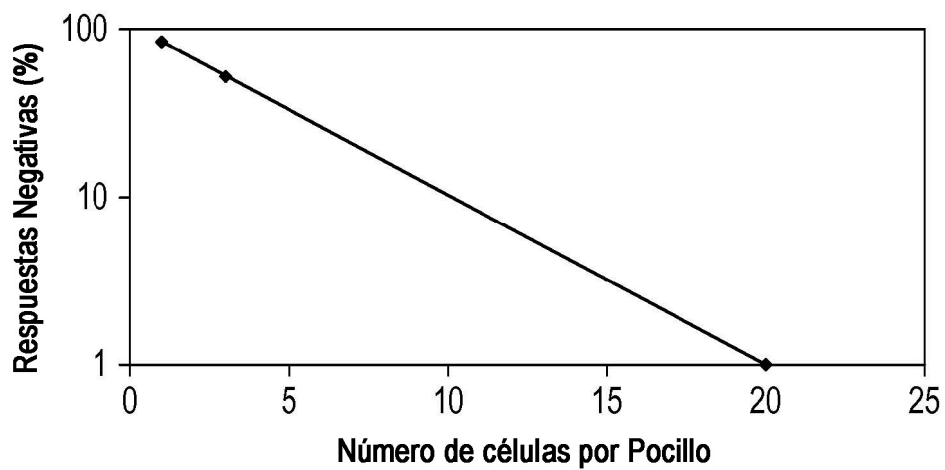


Fig.4

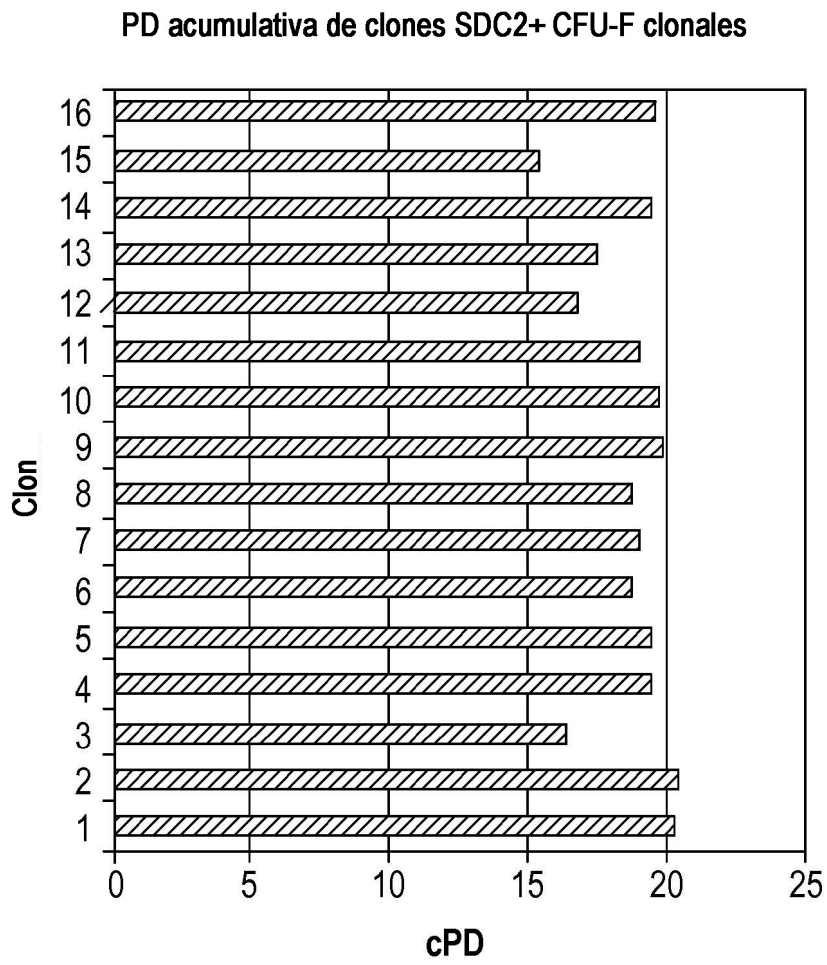
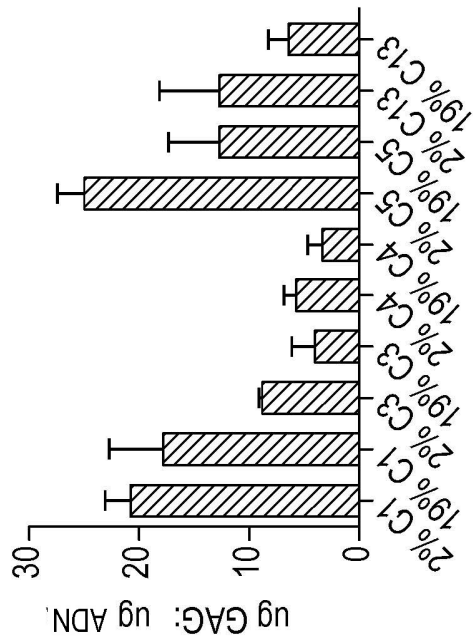


Fig.5

GAG: PROPORCION DE ADN 087 CLONES



GAG POR SEDIMENTO 087 CLONES

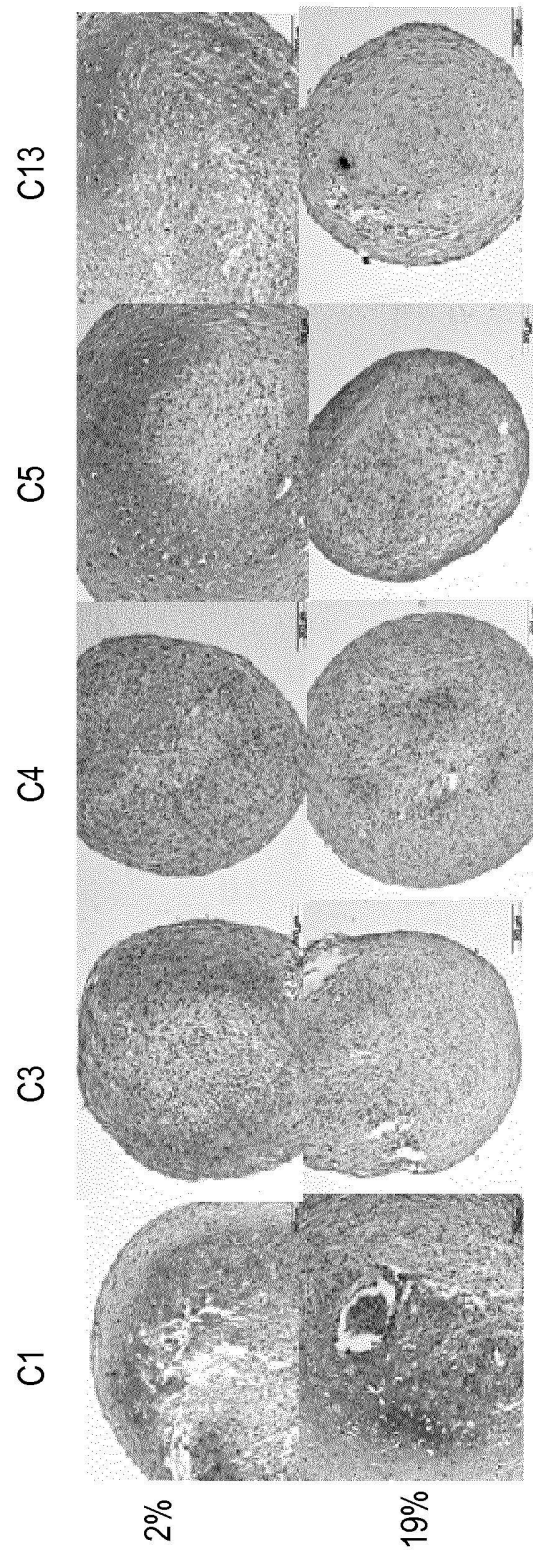
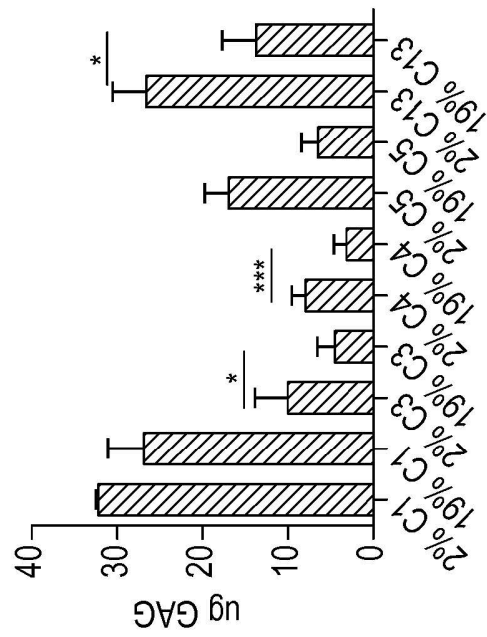


Fig.6

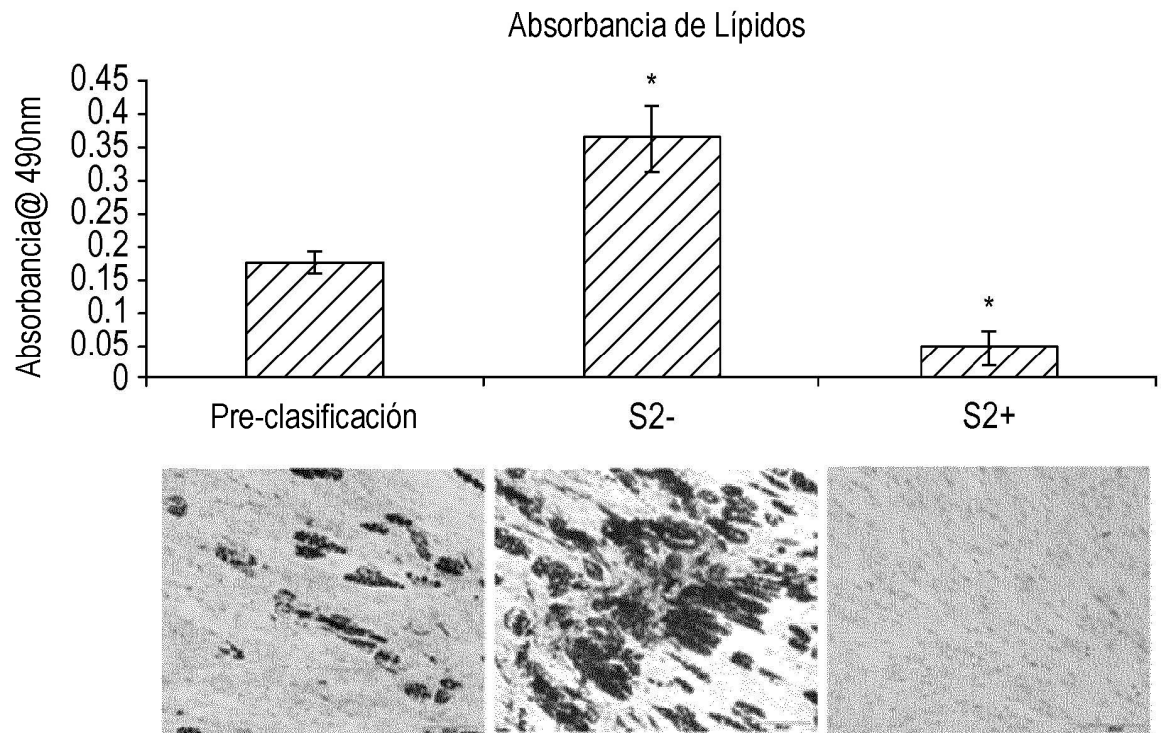


Fig.7

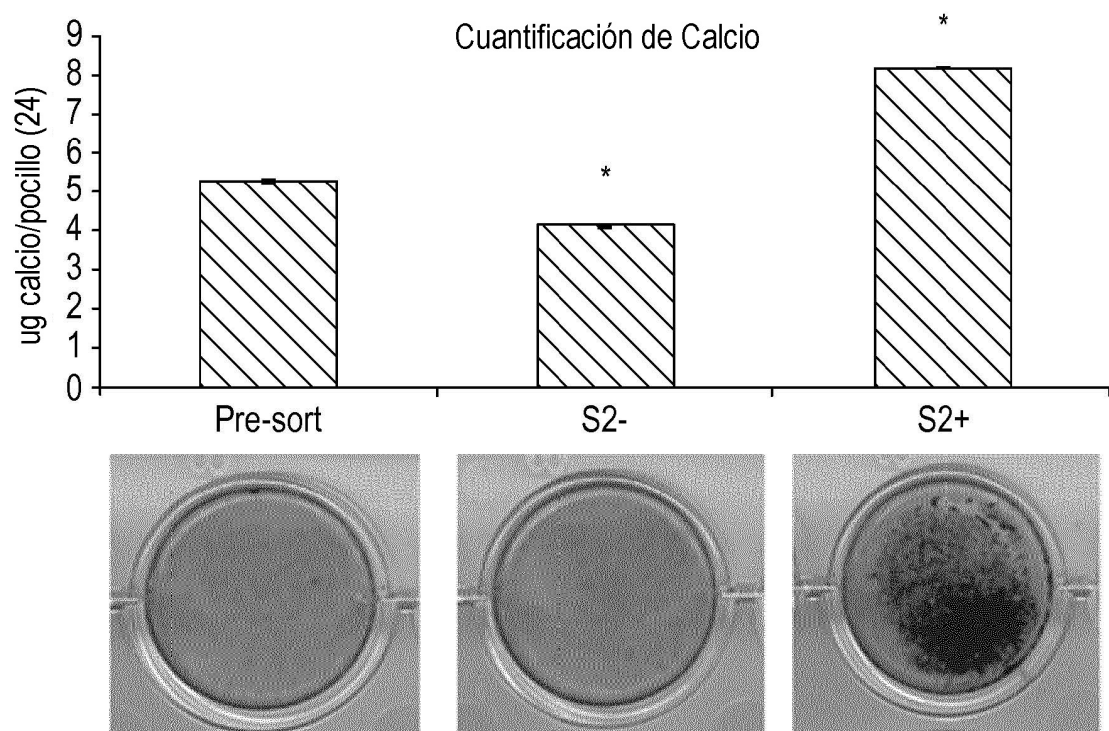


Fig.8

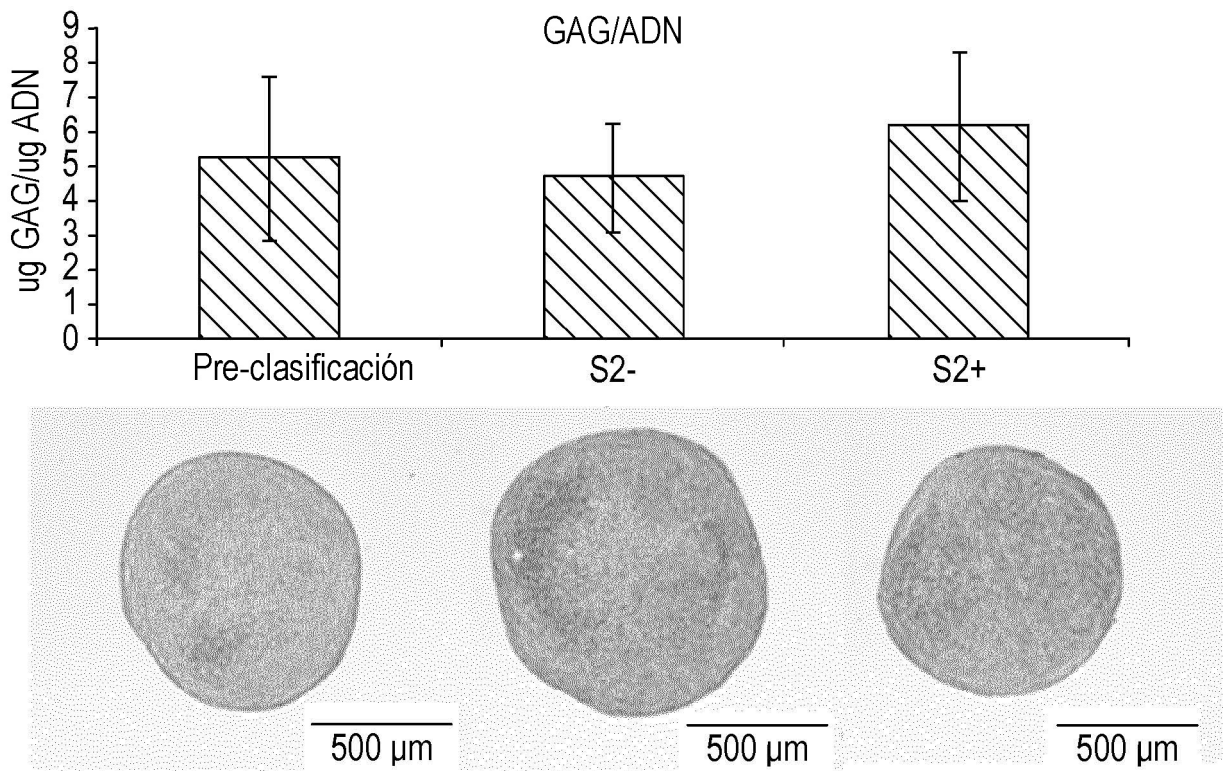


Fig.9

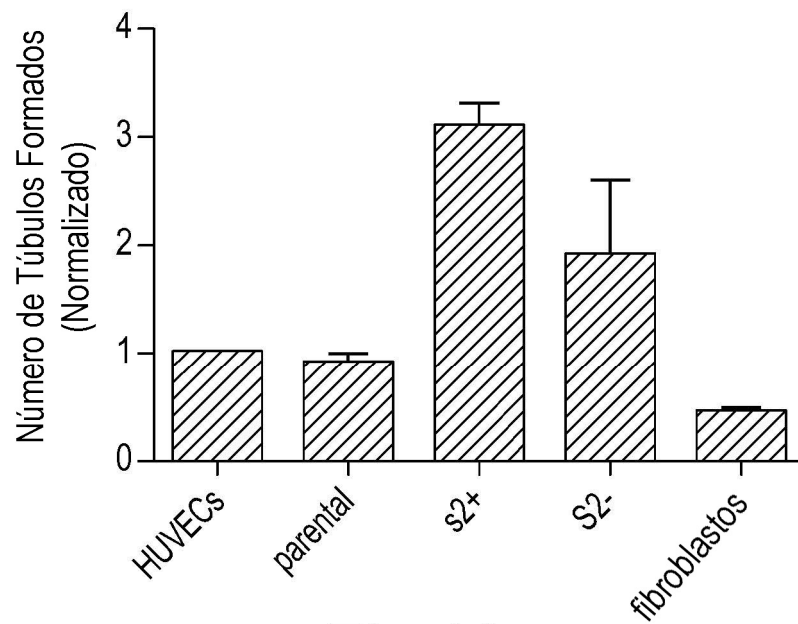


Fig.10

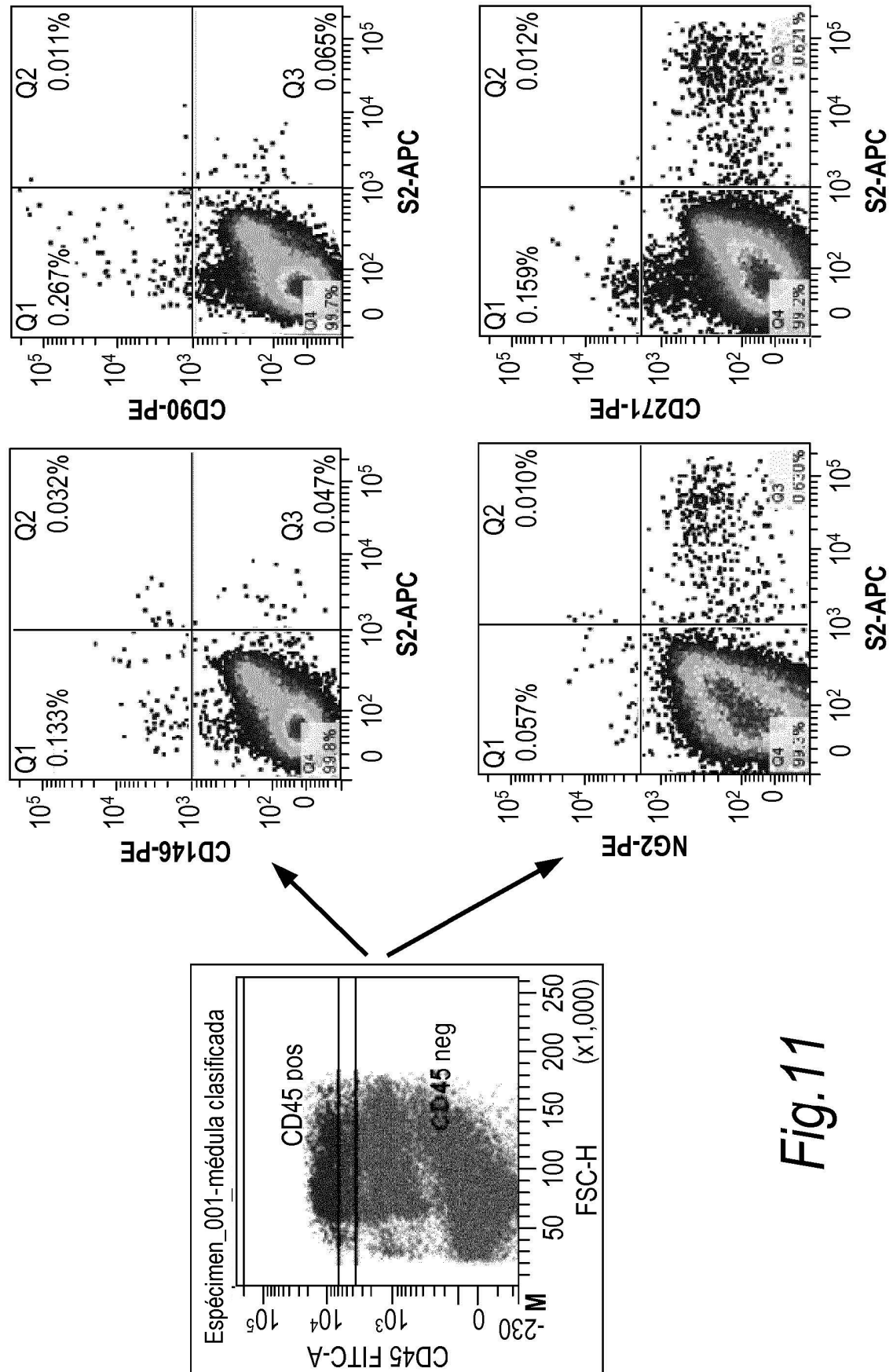


Fig.11

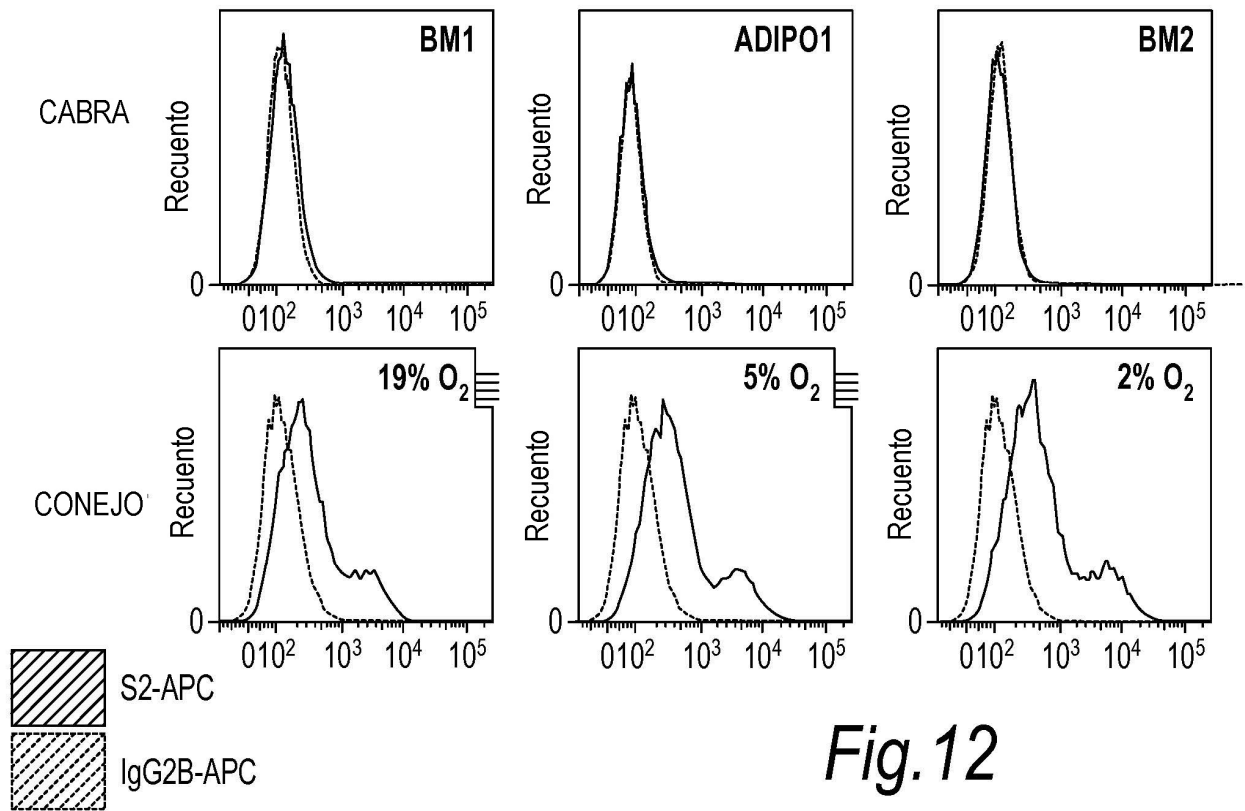


Fig.12

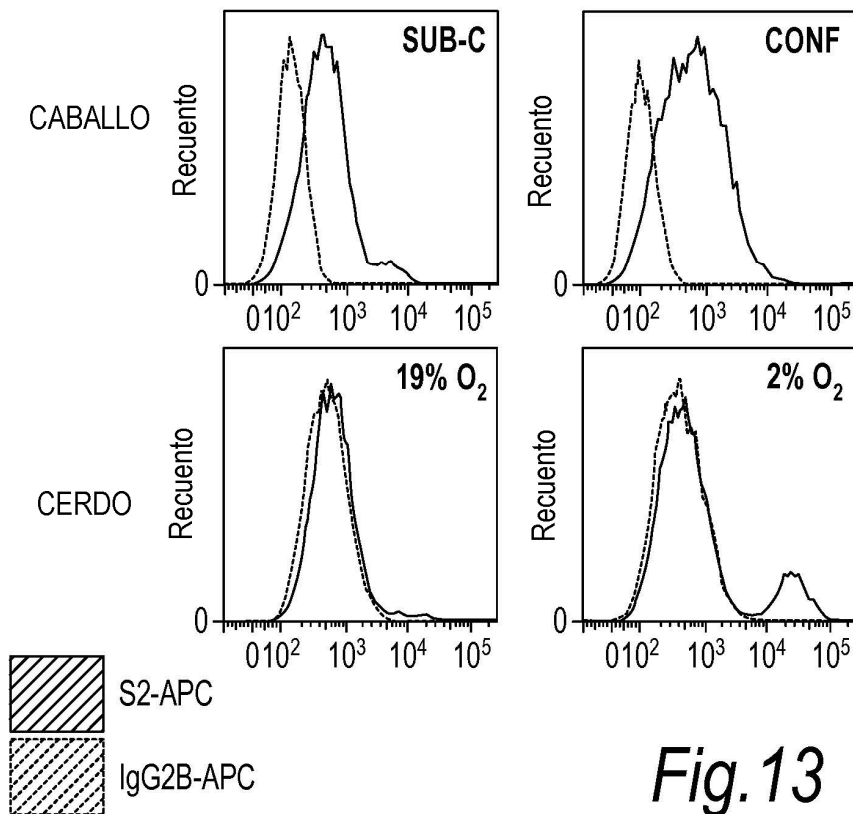


Fig.13

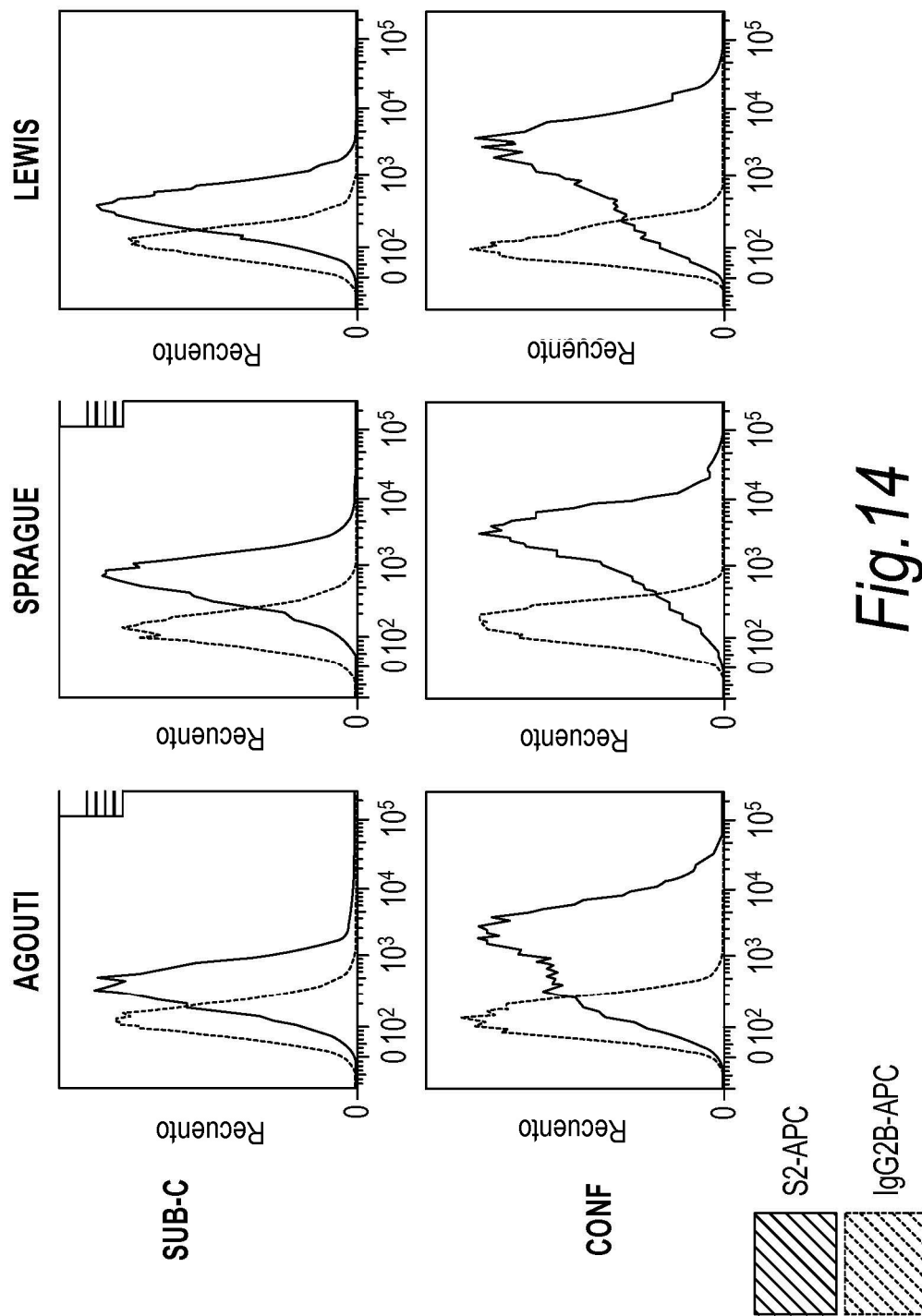


Fig.14

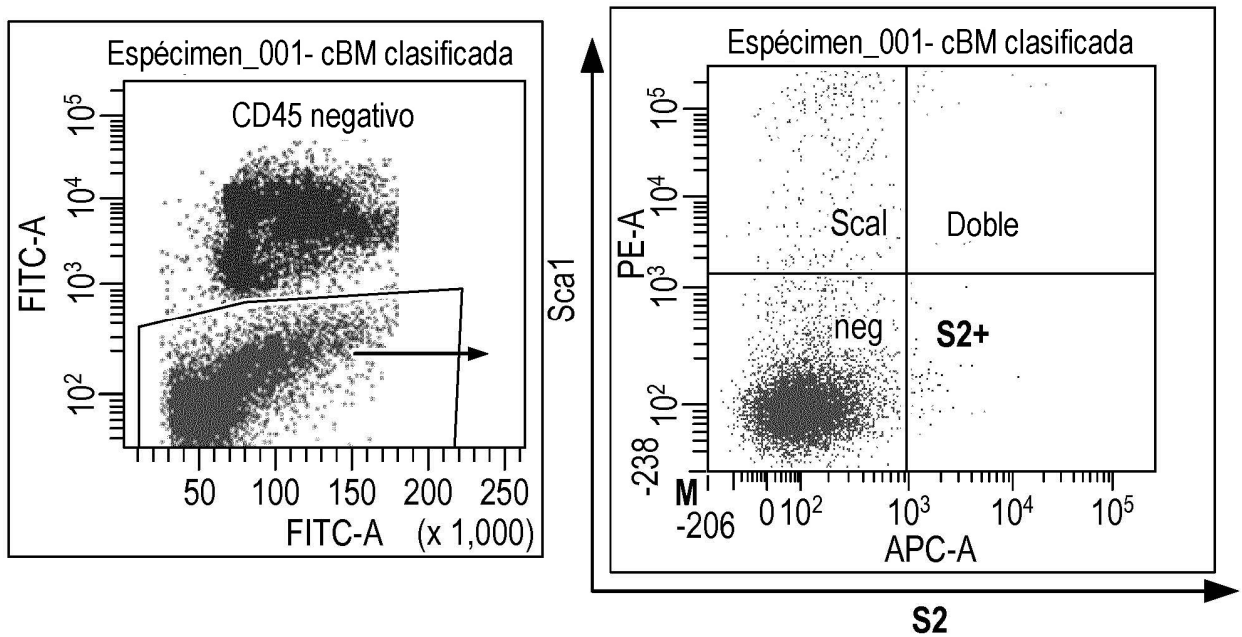


Fig. 15

MNC de ratón seleccionado S2 muestra ~1500 veces de enriquecimiento en CFU-F

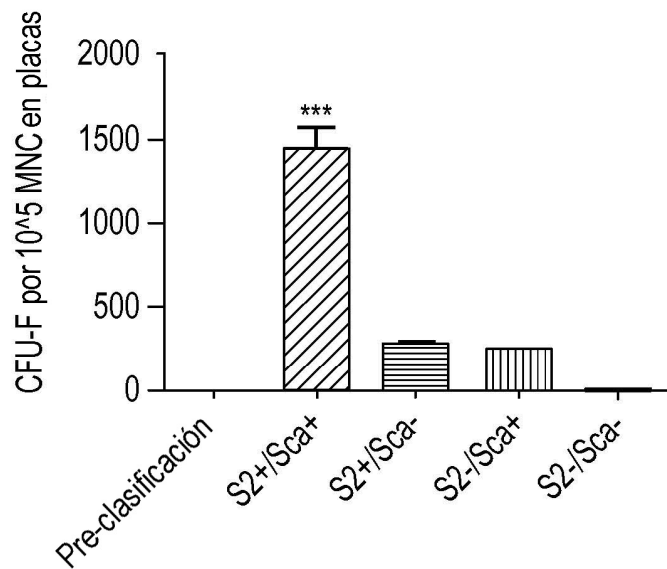


Fig. 16