

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 274**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2009 PCT/AU2009/001060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10019997**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2009 E 09807748 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2324359**

54 Título: **Uso de la proteína beta de shock térmico de 90 kDa como marcador para la identificación y/o enriquecimiento de las células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas**

30 Prioridad:

18.08.2008 US 189349 P

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

03.04.2019

73 Titular/es:

**MESOBLAST, INC. (100.0%)
275 Madison Avenue 4th Floor
New York, NY 10016, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 707 274 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

Uso de la proteína beta de shock térmico de 90 kDa como marcador para la identificación y/o enriquecimiento de las células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas

5

Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de la proteína beta de shock térmico de 90 kDa (HSP-90beta) como un marcador para identificar y/o aislar las células multipotenciales.

10

Antecedentes de la invención

Los componentes celulares que comprenden el estroma medular hematopoyético y tejidos esqueléticos asociados derivan de una población de células multipotenciales que incluyen células madre mesenquimales multipotenciales (CMM) y sus precursores [células precursoras mesenquimales (CPM)]. Las CPM residen dentro de los espacios de la médula ósea localizados principalmente en los nichos perivascuales que rodean los vasos sanguíneos (Gronthos S y col., 2003 y Shi S y col., 2003). Durante las últimas dos décadas, los estudios se han centrado en el potencial regenerativo de las diferentes poblaciones celulares mesenquimales/estromales humanas para reconstituir grasa, hueso, cartílago y músculo (Gronthos S y col., 2003 y Simmons PJ y col., 1991). No obstante, la aplicación con éxito de estas tecnologías depende de la capacidad de aislar poblaciones purificadas de CPM, así como de manipular subsiguientemente su crecimiento y diferenciación *ex vivo*. Además, existe una necesidad de superar los diversos problemas técnicos y en seguridad que a menudo se asocian con los tratamientos basados en células madre mediante la evaluación de la seguridad y la eficacia de preparados de CPM en amplios y apropiados modelos de animal preclínicos representativos de enfermedades humanas. Los modelos ovinos de enfermedad/traumatismo cardíaco y ortopédico se han usado ampliamente, ya que la oveja comparte similitudes con la anatomía, fisiología, inmunología y el desarrollo embrionario humanos (Airey JA y col., 2004; Liechty KW y col., 2000 y Mackenzie TC y col., 2001).

Así, mientras varios marcadores específicos de células multipotenciales humanas, tales como STRO-1, CD106, CD146, se han descrito en la bibliografía (Gronthos S y col., 2003 y Shi S y col., 2003), se ha limitado el significativo avance en la exploración del potencial terapéutico de las células multipotenciales en modelos ovinos de enfermedad humana debido a la falta de reactivos específicos que permiten el aislamiento y caracterización de una población celular multipotencial en tejidos de ovinos. El desarrollo de reactivos biológicos, tales como anticuerpos monoclonales, que reaccionan con tanto las células multipotenciales humanas como ovinas, facilitaría enormemente la capacidad para supervisar e igualar las propiedades funcionales de tanto las poblaciones celulares multipotenciales ovinas como humanas en ensayos preclínicos y clínicos, respectivamente.

Cid y col., 2005, *Journal of Neurochemistry* 95:349-360, describe que los anticuerpos de la proteína de antishock térmico 90 β disminuyen la población de preoligodendrocitos en cultivos de células perinatales y adultas, que tiene implicaciones para la remielinización en la esclerosis múltiple.

40

La publicación de solicitud de patente internacional con n.º WO 2006/032092 A1 describe la descendencia celular de un precursor mesenquimal expandido multipotencial caracterizada por los marcadores de desarrollo precoz STRO-1^{br} y ALP-1, los procedimientos para producir la descendencia y los usos terapéuticos de la misma.

Seo y col., 2004, *The Lancet* 364:149-155 describe una investigación de células madre postnatales multipotenciales a partir de ligamento periodontal humano.

Chen y col., 2007, *Nature Protocols* 2:1044-1051 describe el aislamiento y el cultivo de células precursoras de oligodendrocitos de ratón y rata.

50

Gronthos y col., 2008, *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, páginas 45-57 describe un procedimiento para aislar y purificar células estromales de médula ósea humanas con un anticuerpo STRO-1.

Cid y col., 2004, *The FASEB Journal* 18:40-411 describe la reacción de anticuerpos a la proteína de shock térmico de 90 kDa que inducen la muerte celular del precursor de oligodendrocitos en cultivos.

55

Sidera y col., 2004, *Journal of Biological Chemistry* 279:45379-45388 describe la implicación de la HSP90 en la superficie celular durante la migración de células, lo que revela un rol novedoso en el desarrollo del sistema nervioso.

Akama y col., 2008, *Biochimica et Biophysica Acta* 1784:773-782 describe la identificación proteómica de genes

60

expresados diferencialmente en las neuronas y células madre neuronales diferenciadas de las células madre embrionicas *in vitro*.

5 La publicación de la solicitud de patente europea con n.º 1 457 499 A1 describe los inhibidores de la Hsp90 extracelular, el uso de los cuales lleva a una reducción de la invasividad de las células tumorales.

La publicación de la solicitud de patente internacional con n.º WO 2006/050333 A2 describe las composiciones y procedimientos de utilidad en el tratamiento y diagnóstico de trastornos proliferativos celulares asociados con la Hsp90 y/o la ZAP-70.

10

Cualquier comentario sobre los documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se hayan incluido en la presente memoria descriptiva tiene solo el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte del estado de la técnica anterior o eran conocimientos generales comunes en el campo relevante para la presente invención tal como existía antes de

15

la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Resumen de la invención

20 La presente divulgación describe la generación y caracterización de un novedoso anticuerpo monoclonal (AcM), denominado STRO-4 que identifica y aísla células multipotenciales a partir de médula ósea humana y ovina no fraccionada. En particular, el anticuerpo STRO-4 es capaz de aislar esencialmente todas las células multipotenciales clonogénicas (UFC-F: unidades formadoras de colonias-fibroblastos) en ambas especies. Las células multipotenciales aisladas exhiben una alta diferenciación multilínea, potencial y proliferativa.

25 Sorprendentemente, los inventores presentes han hallado que la proteína beta de shock térmico de 90 (HSP-90beta) se expresa en la superficie celular de las células multipotenciales *in vivo* y que el anticuerpo monoclonal STRO-4 identifica un epítipo único expresado en la HSP-90beta.

30 En consecuencia, la presente invención se orienta a un procedimiento para enriquecer células precursoras mesenquimales multipotenciales (CPM), con un procedimiento que comprende enriquecer una muestra celular tomada de una fuente de tejido que contiene células precursoras mesenquimales multipotenciales que expresan el marcador HSP-90beta, donde enriquecer las células que expresan el marcador HSP-90beta comprende: poner en contacto la muestra celular con el agente de unión a HSP-90beta; y separar las células unidas al agente de unión a HSP-90beta de las células que no se unen al agente de unión a HSP-90beta; y donde el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la HSP-90beta.

35 La presente invención también se orienta a un procedimiento para identificar la presencia de células precursoras mesenquimales multipotenciales (CPM) en una muestra celular tomada de una fuente de tejido que contiene células precursoras mesenquimales multipotenciales, con un procedimiento que comprende identificar células en la muestra celular que expresan el marcador de la HSP-90beta, donde la identificación de células en una muestra celular que expresan el marcador de la HSP-90beta comprende: poner en contacto una muestra obtenida de una fuente de tejido con un agente de unión a HSP-90beta en condiciones adecuadas para la unión de la HSP-90beta con el agente de unión a HSP-90beta; y detectar la presencia del agente de unión a HSP-90beta unido a las células en la muestra, donde la presencia de células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas (CPM) es indicada por células que se unen al agente de unión a HSP-90beta; donde el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la HSP-90beta.

45 En una realización de la presente invención, el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo en las células madre mesenquimales como el anticuerpo STRO-4 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362. En una realización de la presente invención, el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo STRO-4 o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo STRO-4 y donde el anticuerpo STRO-4 es producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.

50

En una realización de la presente invención, el procedimiento también enriquece células que son positivas para uno o más de los marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en: STRO-1, STRO-3, CD146, LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, NGF-R, FGF-R, Leptina-R, RANKL o cualquier combinación de estos marcadores.

60

En una realización de la presente invención, la fuente de tejido es placenta, tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, nódulo linfático, timo, ovario, páncreas, hueso, ligamiento, médula ósea, tendón o músculo esquelético.

- 5 La presente invención también está orientada al uso de la HSP-90beta como un marcador para la identificación *in vitro* y/o enriquecimiento de células precursoras mesenquimales multipotenciales (CPM).

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

- 10 En otra realización, la población celular enriquecida de la invención es capaz de dar lugar a UFC-F clonogénicas.

En otra realización, la población celular enriquecida es homogénea en células HSP-90beta⁺/STRO-4⁺.

- 15 La muestra celular puede derivarse de cualquier fuente de tejido susceptible de contener células multipotenciales. Por ejemplo, la fuente de tejido puede ser placenta, tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, nódulo linfático, timo, ovario, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón o músculo esquelético. En una realización preferida, la fuente de tejido es médula ósea.

- 20 La fuente de células a partir de las que se enriquecen las células multipotenciales puede ser de origen ovino o humano. Sin embargo, la invención también es aplicable a células que derivan de otras especies animales, que incluyen: bóvidos, équidos, murinos, porcinos, caninos, o felinos.

- 25 La presente descripción también se relaciona con células de descendencia que se producen a partir del cultivo *in vitro* de células multipotenciales de la descripción. Las células expandidas de la descripción pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pases y similares.

- 30 En una realización adicional, cultivar la población enriquecida de la descripción da como resultado células multipotenciales que también expresan uno o más marcadores seleccionados de entre el grupo consistente en STRO-1, STRO-3 (TNSAP), LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R, (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-1^{bright} y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores. En otra realización de la descripción, las células multipotenciales de la descripción no son capaces de dar lugar, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

- 35 Los procedimientos de acuerdo con la invención también pueden incluir la etapa de recolección de una fuente de células multipotenciales antes de la primera etapa de enriquecimiento. Esto puede implicar, por ejemplo, la separación de las células obtenidas a partir de una fuente de tejido para formar una única suspensión celular. Esta separación puede conseguirse por medios físicos o enzimáticos. Tales medios serán conocidos para las personas expertas en la materia de la presente invención. En un ejemplo de la invención, esta etapa implica recolectar células de médula ósea usando técnicas conocidas.

- 45 El agente de unión a HSP-90beta usado en los procedimientos enseñados en la presente descripción puede ser cualquier polipéptido o compuesto identificado por tener afinidad de unión a HSP-90beta.

Preferentemente, el agente de unión a HSP-90beta se une específicamente a HSP-90beta.

- 50 Preferentemente, el agente de unión a HSP-90beta específicamente se une a un epítipo en HSP-90beta donde HSP-90beta comprende una secuencia de al menos aproximadamente un 75 % igual a la secuencia de la SEQ ID NO:1 (Figura 5), preferentemente al menos aproximadamente un 78 % igual, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, todavía más preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, todavía más preferentemente aproximadamente un 90 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % a la SEQ ID NO:1.

- 55 En una realización, el agente de unión a HSP-90beta se selecciona de entre el grupo que consiste en péptidos, peptidomiméticos, aptámeros de ácido nucleico, aptámeros de péptido, dendrímeros, y pequeñas moléculas orgánicas.

- 60 En un ejemplo, el agente de unión a HSP-90beta es un oligonucleótido. Preferentemente, el oligonucleótido es oligonucleótido marcado.

En otra realización, el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo anti-HSP-90beta purificado o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo. El anticuerpo anti-HSP-90beta puede ser un anticuerpo monoclonal, recombinante, quimérico o humanizado.

5

En una realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal de anti-HSP-90beta es un anticuerpo de STRO-4 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.

- 10 Otros anticuerpos monoclonales anti-HSP-90beta para uso en los procedimientos de la presente invención incluyen anticuerpos comercialmente disponibles tales como AcM contra Hsp90Beta humana de ratón, clon H9010 (Invitrogen), AcM contra Hsp90b de ratón, clon EMD-5E12 (Calbiochem), AcM contra HSP90beta humana de ratón, clon K3725B (Cosmo Bio Co., Ltd), y AcM contra Hsp90 beta humana de ratón, clon K3705 (Assay Designs/Stressgen Bioreagents). Otros anticuerpos disponibles en el mercado y no mencionados previamente, se encuentran también dentro del ámbito de la presente invención.

En otra realización, la descripción proporciona un agente de unión a HSP-90beta o bien un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo seleccionado de entre el grupo que consiste en:

(i) un anticuerpo monoclonal STRO-4;

- 20 (ii) un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera a partir de regiones constantes de cadena pesada y ligera humana y de STRO-4; y
(iii) un anticuerpo humanizado que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR por sus siglas en inglés) a partir de secuencias de región constantes y marco humano y de STRO-4.

- 25 En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende las seis CDR al completo a partir de STRO-4.

En otra realización, el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo recombinante que comprende una secuencia sustancialmente idéntica a la del anticuerpo STRO-4 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito

30 PTA-9362.

En una realización de la presente descripción, el agente de unión a HSP-90beta está marcado.

En un ejemplo, el marcado es un marcado fluorescente. En otro ejemplo, el marcado es un marcado enzimático.

35

En otra realización, se lleva a cabo la separación de células unidas al agente de unión a HSP-90beta mediante un clasificador celular mecánico.

- 40 En una realización adicional, el agente de unión a HSP-90beta se acopla al compuesto marcador fluorescente. En este caso, la separación de células unidas al agente de unión a HSP-90beta se lleva a cabo preferentemente usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS por sus siglas en inglés).

En una realización adicional, se liga el agente de unión a HSP-90beta a una partícula sólida. Preferentemente, la partícula sólida es una partícula magnética. En esta realización, se lleva a cabo la separación de las células unidas al agente de unión a HSP-90beta preferentemente por separación de la fase particulada de la fase líquida.

45

En una realización preferida adicional, previamente a la etapa de separación se pone en contacto la muestra celular con un anticuerpo dirigido contra el agente de unión a HSP-90beta ligado a una partícula sólida, y donde la separación de células unidas al agente de unión a HSP-90beta se lleva a cabo separando la fase particulada de la fase líquida.

50

En un ejemplo adicional, las células de la muestra celular son células adherentes cultivadas sobre un soporte sólido, y se lleva a cabo la retirada de los agentes de unión a HSP-90beta no unidos por aclarado.

- 55 En un ejemplo adicional, se cultivan las células de la muestra celular en suspensión y se lleva a cabo la retirada de los agentes de unión a HSP-90beta no unidos por centrifugación de la muestra celular y separación del sobrenadante resultante.

- 60 En una realización adicional, se somete la muestra celular a un procedimiento de clasificación celular adicional para enriquecer o disminuir la población celular en células que expresan al menos un marcador de células multipotenciales adicional. El marcador de células multipotenciales puede ser uno o más marcadores seleccionado de entre el grupo

consistente en: STRO-1, STRO-3 (TNSAP), CD106, CD146, LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R, (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, o cualquier combinación de estos marcadores.

5

La presente descripción también proporciona una población de células multipotenciales enriquecida y obtenida mediante un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

La presente descripción también proporciona una población enriquecida de células multipotenciales de HSP-90beta⁺.

10

Preferentemente, al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la población celular enriquecida total son células multipotenciales que tienen el fenotipo HSP-90beta⁺.

Preferentemente, la población enriquecida de las células multipotenciales se obtuvo mediante un procedimiento de acuerdo con la presente descripción.

15

La presente descripción proporciona también una población celular expandida obtenida cultivando una población de células multipotenciales enriquecidas de acuerdo con la descripción.

20 En una realización, la población celular enriquecida de la descripción, o una población celular expandida de la descripción, comprende al menos algunas células que están modificadas genéticamente.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de generación de una población celular comprometida específica de tejido, comprendiendo el procedimiento cultivar una población de células multipotenciales de la presente descripción en presencia de uno o más factores estimulantes, y someter dicha población cultivada a condiciones que sesgan la diferenciación de las células multipotenciales a un tipo de tejido específico.

25

En una realización de este procedimiento de la descripción, se selecciona el tipo de tejido del grupo consistente en tejido placentario músculo cardíaco, tejido vascular, tejido óseo, tejido de cartílago, tejido graso, tejido neural, músculo liso y tejido endotelial.

30

La presente descripción también proporciona una composición que comprende células multipotenciales enriquecidas de acuerdo con la presente descripción y/o una población celular expandida de acuerdo con la descripción.

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

En otra realización, la composición comprende además un factor para sesgar la diferenciación de las células multipotenciales de la presente descripción a un tipo de tejido específico. Preferentemente, el tipo de tejido se selecciona, aunque no exclusivamente, de entre el grupo consistente en músculo cardíaco, tejido vascular, tejido óseo, tejido de cartílago, tejido graso, tejido neural, tejido placentario, músculo liso y tejido endotelial.

40

En una realización adicional, la composición de la descripción comprende además una cola de fibrina.

45 La presente descripción también proporciona un procedimiento para generar o reparar tejido en un sujeto, con un procedimiento que comprende la administración al sujeto de una población de células multipotenciales expandidas y/o enriquecidas de la presente descripción.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para generar o reparar tejido en un sujeto, con un procedimiento que comprende la administración al sujeto de una composición de la presente descripción.

50

La presente descripción proporciona también el uso de una población celular multipotencial enriquecida y/o expandida de la presente descripción para la fabricación de un medicamento para generar o reparar tejido en un sujeto.

55 Se proporciona también el uso de una composición de la presente descripción para la fabricación de un medicamento para generar o reparar tejido en un sujeto. Preferentemente, el tipo de tejido que se genera se selecciona, aunque no exclusivamente, de entre el grupo consistente en músculo cardíaco, tejido vascular, tejido óseo, tejido de cartílago, tejido graso, tejido neural, tejido placentario, músculo liso y tejido endotelial.

60 Preferentemente, las células multipotenciales de acuerdo con esta descripción son de origen humano.

La presente descripción también proporciona una célula aislada que se ha obtenido mediante un procedimiento de la descripción, o una célula de descendencia de la misma, donde la célula está modificada genéticamente.

- 5 La presente descripción también proporciona una línea celular de hibridoma STRO-4 depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo STRO-4 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo en células multipotenciales que el anticuerpo STRO-4 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.

15 La presente descripción también proporciona una composición que comprende un agente de unión a HSP-90beta o un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo. Preferentemente, la composición comprende además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y/o adyuvantes o excipientes.

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

25 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. El antígeno STRO-4 se expresa mediante una población menor de CMN de MO humana que incluye CPM clonogénicas.

30 La inmunofluorescencia de color único y la citometría de flujo se llevaron a cabo en muestras de CMN de MO humana y ovina separadas por Ficoll para examinar la expresión del antígeno STRO-4. La incidencia media de las células STRO-4⁺ en las muestras de CMN de MO ovinas (A) y humanas (B) fue de 4,0 % ± 1,2 y 3,0 % ± 1,0 (n=3), para cada población, respectivamente. Los datos se muestran como histogramas de fluorescencia un parámetro [ficoeritina (PE)] de 1 x 10⁴ eventos activados por dispersión de luz, recogidos como datos en modo de lista. Control de IgG (línea de puntos); AcM STRO-3 (línea continua). Se sembró en placas una suspensión monocelular de MO no fraccionada y CMN de MO ovina (C) y humana (D) de STRO-4⁺ y STRO-4⁻ seleccionadas por MACS en medio de crecimiento regular para valorar la incidencia de las células formadoras de colonias adherentes en cada fracción celular. Después de 12 días de cultivo, se tiñeron las colonias (agregados de 50 células o más) y se puntuaron como se describe en los Procedimientos. El gráfico de barras representa el número de colonias clonogénicas por 10⁵ células sembradas para cada fracción celular promediado de 3 experimentos separados. Estos datos demuestran que la mayoría de CPM clonogénicas están limitadas exclusivamente a la fracción STRO-4⁺ de MO.

Figura 2. Las CPM ampliadas ex vivo expresan altos niveles del antígeno STRO-4.

45 Las suspensiones monocelulares del pase dos de CPM (A) ovinas y CPM (B) humanas y las células MG63 (C) se obtuvieron mediante digestión por tripsina/EDTA y después se procesaron para citometría de flujo de color único. Las células se incubaron secuencialmente con sobrenadante de STRO-4 y después se marcaron indirectamente con una IgG de cabra antimurino acoplada con PE. El histograma de representa 2 x 10⁴ eventos recogidos como datos en modo de lista. La positividad (tal como destaca el marcador estadístico horizontal) para STRO-4 se definió como el nivel de fluorescencia mayor al 99 % de lo que se observó cuando coincidió el isotipo, anticuerpo de control no uniente (1B5; línea negra). Los resultados demostraron que la mayoría de CPM humanas y ovinas expandidas ex vivo expresaron el STRO-4 (línea gruesa).

Figura 3. Potencial de desarrollo de CPM humanas y ovinas seleccionadas del antígeno STRO-4

55 Los cultivos secundarios de células derivados de CPM humanas y ovinas seleccionadas del antígeno STRO-4 fueron inducidos bajo condiciones adipocíticas, osteogénicas, o condrogénicas. La presencia de clústeres de lípidos que contenían adipocitos se detectó mediante tinción con aceite rojo O (flecha) en las 2 semanas de inducción adipogénica en cultivos de CPM (A) humanas y CPM (B) ovinas (x200). Los depósitos mineralizados se tiñeron positivamente con el reactivo de rojo de alizarina (flecha) formados dentro de las 4 semanas de cultivo bajo condiciones osteoinductivas

en los cultivos de CPM (C) humanos y de CPM (D) ovinos (x200). En cultivos agregados, la tinción positiva de azul de toluidina para proteoglicanos estuvo presente a lo largo de la masa celular que rodea las células de tipo condrocítico (flecha) después de 3 semanas de inducción condrocítica en los cultivos (flecha) de CPM (E) humanas y CPM (F) ovinas (x200).

5

Figura 4. El anticuerpo STRO-4 identifica una proteína de peso molecular de 90 kDa.

Los lisados de la membrana de plasma se prepararon a partir de suspensiones monocelulares de CPM humanas de STRO-4⁺ expandidas y cultivadas tal como se describe en los procedimientos. Los lisados celulares se incubaron con tanto sobrenadante de STRO-4 como el anticuerpo de control de isotipo coincidente, 1B5, después se inmunoprecipitaron mediante separación de perlas magnéticas. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis con un gel de poliacrilamida SDS al 10 % (p/v) y se visualizaron después de la tinción con azul de Coomassie.

15 Figura 5. El anticuerpo STRO-4 identifica la proteína beta de shock térmico de 90 kDa.

Los lisados de la membrana de plasma se prepararon a partir de suspensiones monocelulares de las MG63 humanas de STRO-4⁺ expandidas y cultivadas tal como se describe en los procedimientos. Los lisados celulares se incubaron con tanto sobrenadante de STRO-4, después se inmunoprecipitaron mediante separación de perlas magnéticas. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis con un gel de poliacrilamida SDS al 10 % (p/v) y se visualizaron después de la tinción con azul de Coomassie. Las bandas de 90 kDa se escindieron de los geles, sujetas a digestión trípica y se analizaron mediante espectrometría de masas con un 4700 Proteomics Analyser de Applied Biosystems con óptica TOF/TOF en modo MS. La microsecuenciación del análisis de péptidos demostró la coincidencia de los péptidos secuenciados de STRO-4 (negrita) con la proteína beta de shock térmico humana de 90 kDa (NCBI, número de acceso, P08238).

Figura 6. Confirmación de la reactividad específica del anticuerpo STRO-4 con la proteína beta de shock térmico de 90 kDa.

Las CPM humanas de STRO-4⁺ expandidas y cultivadas se prepararon como lisados celulares aislados y completos o se usaron para generar inmunoprecipitados de STRO-4 o 1B5 tal como se describió en los procedimientos. Los lisados celulares completos y los inmunoprecipitados de STRO-4 o 1B5 se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10 % (p/v). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, para después bloquearse con un 5 % de leche desnatada en polvo (0,05 % de Tween 20) antes de que se incubaran los filtros con un anticuerpo policlonal disponible en el mercado para HSP-90beta. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron usando FluorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California) gracias al software ImageQuant (Molecular Dynamics). El anticuerpo de anti-HSP-90beta detectó una banda característica de 90 kDa en ambas, la preparación de lisado celular completo de control y en la muestra de inmunoprecipitado de STRO-4.

40 Descripción detallada de la invención

La expresión "y/o", p. ej., "X y/o Y" se entenderá como tanto "X e Y" como "X o Y" y se tendrá en cuenta para proporcionar un apoyo expreso para ambos significados o bien para cada significado.

45 Detalles del depósito de microorganismos

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal designado STRO-4 se depositó el 10 de julio de 2008 en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-9362.

Se realizó este depósito bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes y los reglamentos según el mismo. Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años desde la fecha del depósito. Los organismos se pondrán a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, que asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la descendencia del cultivo al público tras la emisión de la patente pertinente.

55

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

60

Técnicas generales

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

10 A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándares, bien conocidos por los especialistas en la materia. Dichas técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1-4, IRL Press
15 (1995 y 1996), y F.M. Ausubel y col. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, se incluyen todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow y David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan y col. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

20 Células multipotenciales

Las células multipotenciales son células que son capaces de originar cualquiera de los diversos tipos celulares maduros. En una realización, las células multipotenciales se derivan de tejido adulto. El término abarca, por ejemplo, las células precursoras mesenquimales (CPM), las células madre mesenquimales (CMM) y la descendencia de CPM
25 expandidas multipotenciales (MEMP, por sus siglas en inglés).

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

Enriquecimiento de células multipotenciales

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

El procedimiento de enriquecer células multipotenciales de acuerdo con esta descripción puede basarse en detectar
45 la presencia de un marcador de HSP90beta solo o en combinación con uno o más marcadores adicionales. Por ejemplo, el procedimiento de enriquecer células multipotenciales puede también basarse en enriquecer células que son positivas para uno o más marcadores seleccionado(s) de entre el grupo consistente en: STRO-1, STRO-3 (TNSAP), CD106, CD146, LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R,
50 EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R, (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, o cualquier combinación de estos marcadores. Asimismo, una población enriquecida de células multipotenciales de la presente descripción puede ser también positiva para uno o más de estos marcadores o una combinación de los mismos.

Con la referencia a una célula como "positiva" de un marcador dado, se indica que puede ser una expresión baja (lo
55 o dim) o alta (bright, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia u otro color usado en el proceso de clasificación por color de las células. La distinción de lo (o dim o dull) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población celular particular que se está clasificando.

60 El término "bright", cuando se usa en el presente documento, hace referencia a un marcador sobre una superficie

celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca detectablemente. Aunque no se desea limitarse a una teoría, se propone que las células "bright" expresan más del antígeno marcador diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una mayor señal de fluorescencia cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado fluorescentemente, como se determina por análisis de FACS, que las células no bright (STRO-1^{dull/dim}).

En otro ejemplo, las células STRO-1^{bright} tienen una expresión 2 órdenes de magnitud superior de expresión en superficie de STRO-1. Esto se calcula en relación con un control negativo coincidente de isotipo. En comparación, las células STRO-1^{dim} y/o STRO-1^{intermediate} tienen una expresión menos de 2 órdenes de magnitud mayor de expresión en superficie de STRO-1, típica y aproximadamente una expresión de una orden o menos en el control negativo coincidente de isotipo.

Por ejemplo, el procedimiento puede incluir la etapa de elaborar un primer agrupamiento parcialmente enriquecido de células enriqueciendo la expresión de un primer marcador específico de células multipotenciales, seguido de una etapa de enriquecimiento de la expresión de HSP-90beta a partir del agrupamiento parcialmente enriquecido de células. En otro ejemplo, el procedimiento puede incluir una etapa de enriquecimiento inicial basada en la selección de células que expresan HSP-90beta, seguida de una etapa que implica enriquecer un marcador de células multipotenciales diferente. En aún otro ejemplo, el procedimiento implica seleccionar simultáneamente células que expresan HSP-90beta y uno o más marcadores de células multipotenciales adicionales.

Se prefiere que una proporción significativa de las células multipotenciales sea capaz de diferenciación en al menos dos tipos celulares comprometidos. Los ejemplos no limitantes de linajes con los que pueden diferenciarse las células multipotenciales, incluyen células precursoras óseas; progenitores hepatocíticos, que son pluripotentes para células epiteliales de conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que evolucionan hasta oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que evolucionan hasta neuronas; precursores de músculo cardíaco y cardiomiocitos y líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero sin limitación, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos y células precursoras de las siguientes: células epiteliales de pigmento retinal, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartilago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocíticas y oligodendrocíticas. En una realización preferida, las células multipotenciales son al menos aptas para cultivarse *in vivo* o *in vitro* produciendo adipocitos, osteoblastos y/o condrocitos.

Se entenderá que la separación de células que expresen HSP-90beta de superficie celular pueda efectuarse mediante una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, todos estos procedimientos se basan en algún punto en la unión de células al agente de unión a HSP-90beta seguida de la separación de aquellas células que exhiben unión, sea unión de alto nivel o unión de bajo nivel o unión nula.

Antígeno HSP-90beta/STRO-4

La HSP-90beta está presente normalmente en el citoplasma de las células donde actúa como una chaperona molecular para facilitar el plegamiento normal, la deposición intracelular y el recambio proteolítico de muchos reguladores clave del crecimiento celular postnatal y su diferenciación. Forma parte de una familia altamente conservada de proteínas de respuesta al estrés. Las HSP se expresan habitualmente a niveles bajos dentro de las condiciones fisiológicas normales, pero muestran marcadamente una expresión aumentada en respuesta al estrés celular.

Se entenderá que el término "HSP-90beta" no está limitado a la secuencia de origen humano u ovino, sino que incluye también secuencias homólogas obtenidas de cualquier fuente, por ejemplo, homólogos, particularmente ortólogos (es decir, homólogos obtenidos de especies distintas de seres humanos), variantes alélicas, así como fragmentos y péptidos sintéticos o derivados los mismos.

La identidad de secuencia (% de identidad) de un polipéptido se determina por análisis FASTA [Pearson y Lipman, (1988)] (programa GCG) usando los ajustes por defecto y una secuencia de consulta de al menos 50 aminoácidos de longitud, con lo que el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferentemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Más preferentemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 250 aminoácidos. Incluso más preferentemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 350 aminoácidos.

El término "HSP-90beta" también abarca fragmentos de los polipéptidos de longitud completa mencionados anteriormente y variantes de los mismos, incluyendo fragmentos de la secuencia de HSP-90beta. Los fragmentos preferidos incluyen aquellos que incluyen un epítipo. Los fragmentos adecuados serán de al menos aproximadamente 5 6 o 7 aminoácidos de longitud, p.ej. de al menos 10, 12, 15 o 20 aminoácidos de longitud. Pueden ser también menores de 200, 100 o 50 aminoácidos de longitud.

Agentes de unión a HSP-90beta

10 Cuando en el presente documento se usa la expresión "agente de unión a HSP-90beta", indica un resto que reconoce y/o específicamente se une a HSP-90beta.

Con "se une específicamente a" se entiende que el agente de unión a HSP-90beta es capaz de unirse a HSP-90beta con la avidez y/o afinidad adecuada a fin de proporcionar una herramienta útil para el enriquecimiento selectivo de 15 células que expresan HSP-90beta. Esto es, se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con la HSP-90beta de lo que hace con dianas alternativas (p. ej., no HSP-90beta). Por ejemplo, un agente de unión a HSP-90beta que se une específicamente a HSP-90beta o a un epítipo o fragmento inmunogénico del mismo, se une con mayor afinidad, avidez, más rápidamente, y/o con mayor duración de lo que se une con otras dianas diferentes de HSP-90beta.

20 Los agentes de unión a HSP-90beta preferidos son polipéptidos o compuestos identificados por tener afinidad de unión por HSP-90beta.

Agentes de unión no basados en anticuerpos

25 El agente de unión a HSP-90beta de la descripción incluye péptidos, peptidomiméticos, aptámeros de ácido nucleico, aptámeros de péptido, dendrímeros, y pequeñas moléculas orgánicas.

Un aptámero de ácido nucleico (oligómero adaptable) es una molécula de ácido nucleico que es capaz de formar una 30 estructura secundaria y/o terciaria que proporciona la capacidad de unión a una diana molecular. Una biblioteca de aptámeros se produce, por ejemplo, mediante clonación aleatoria de oligonucleótidos en un vector (o un vector de expresión en el caso de un aptámero de ARN), donde la secuencia aleatoria está flanqueada por secuencias conocidas que proporcionan el lugar de unión a cebadores de PCR. Un aptámero con actividad aumentada se selecciona, por ejemplo, usando SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment o evolución sistemática de 35 ligandos mediante enriquecimiento exponencial). Los procedimientos apropiados para producir y/o cribar una biblioteca de aptámeros se describen, por ejemplo, en Elloington y Szostak, Nature 346:818-22, 1990.

Las técnicas para sintetizar pequeños compuestos orgánicos variarán considerablemente dependiendo del compuesto; no obstante, dichos procedimientos serán bien conocidos por aquellos expertos en la materia. En una 40 realización, se utiliza la informática para seleccionar bloques de construcción química de los compuestos conocidos, para producir una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, el enfoque del modelo QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship* o Relación de actividad de estructura cuantitativa) usa regresiones lineales o árboles de regresión de estructuras de compuestos para determinar la idoneidad. El software del Chemical Computing Group, Inc. (Montreal, Canadá) utiliza datos experimentales de selección de alto rendimiento en compuestos tanto activos como inactivos, 45 para crear un modelo QSAR probabilístico, que es subsiguientemente usado para seleccionar compuestos importantes. El procedimiento Binary QSAR está basado en tres propiedades características de compuestos que forman un "descriptor" de la probabilidad de que un compuesto particular realice o no una función requerida: carga parcial, refractividad molar (interacciones de enlace), y logP (lipofiliidad de molécula). Cada átomo posee un área superficial en la molécula y cuenta con estas tres propiedades asociadas con ella. Se determinan todos los átomos de 50 un compuesto que tienen una carga parcial en un intervalo concreto y se suman las áreas superficiales (descriptor de Área superficial de Van der Waals). Los modelos binarios de QSAR son usados entonces para formar modelos de actividad o modelos ADMET, que son utilizados para construir una biblioteca combinatoria. En consecuencia, los compuestos importantes identificados en los cribados iniciales pueden usarse para expandir la lista de los compuestos que son cribados para, de este modo, identificar los compuestos altamente activos.

55 **Agentes de unión basados en anticuerpos**

Los agentes particularmente preferidos de unión a HSP-90beta son los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o derivados/variantes de los mismos (en su forma natural o recombinantes, de cualquier fuente).

60

- Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse a una diana, tal como HSP-90beta y/o un epítipo de la misma y/o un fragmento inmunogénico de la misma y/o una forma modificada de la misma (p. ej., glicosilado, glucosilado, etc.) a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítipo, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Este término abarca
- 5 no solo los anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también variantes, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento de epítipo de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de epítipo de la especificidad requerida.
- 10 El término "fragmento de unión a anticuerpo" tal como se usa en este documento significará cualquier fragmento de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse a HSP-90beta, preferentemente con especificidad para HSP-90beta. Esto incluye:
- (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína, procurando una cadena ligera intacta
- 15 y una porción de una cadena pesada;
- (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo, puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, procurando una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
- (3) (Fab')₂, el fragmento de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina
- 20 sin reducción posterior; F(ab)₂ es un dímero de los dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro;
- (4) Fv, definido como un fragmento genomanipulado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y
- (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), definido como una molécula genomanipulada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, ligadas por un ligador polipeptídico adecuado en forma
- 25 de una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.
- (6) Anticuerpo de dominio simple, preferentemente un dominio pesado variable desprovisto de cadena ligera.

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

- 30 El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogéneos capaz de unirse al/a los mismo/s antígeno/s y, preferentemente, al mismo determinante epitópico dentro del/de lo/s antígeno/s. No se pretende limitar este término en relación con la fuente del anticuerpo o en la manera en que se realiza.
- 35 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera resulta idéntica con su homóloga con las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular (p. ej., un murino, tal como un ratón) o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico con su homólogo con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies (p. ej., primates, tales como humanos) o que pertenece a otra clase o subclase
- 40 de anticuerpo además de a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la deseada actividad biológica (patente de EE. UU. con n.º 4.816.567; y Morrison y col. (1984) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 81:6851-6855).

- El término "anticuerpo humanizado" se entenderá como referencia a una molécula quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a epítipo derivado de una inmunoglobulina a partir
- 45 especies no humanas, así como la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno comprende preferentemente las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) a partir de anticuerpos no humanos injertados en las regiones estructurales apropiadas en los dominios variables de anticuerpos humanos, así como las regiones restantes a partir de un anticuerpo humano. Los sitios de unión a epítipo pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más
- 50 sustituciones de aminoácidos. Es conocido que las regiones variables de tanto la cadena pesada como la ligera contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los epítopos en liza y determinan la capacidad de unión, flanqueados por cuatro regiones estructurales (FR) que son relativamente conservadas en una especie dada y que proporcionan supuestamente un sustento para las CDR. Cuando los anticuerpos no humanos son preparados con respecto a un epítipo particular, las regiones variables son
- 55 "redimensionadas" o "humanizadas" mediante el injerto de CDR derivadas de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano a modificar. La aplicación de este enfoque es conocida en la técnica y/o descrita con mayor detalle en el presente documento.

- El término "región constante" (RC) tal como se usa en este documento, se refiere a la porción de la molécula de
- 60 anticuerpo que confiere funciones efectoras. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados del sujeto

derivan de inmunoglobulinas humanas. La región constante de cadena pesada puede seleccionarse de entre cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Además, las cadenas pesadas de varias subclases (tales como las subclases de IgG de cadenas pesadas) son responsables de diferentes funciones efectoras y, en consecuencia, al elegir la región constante de cadena pesada deseada, pueden producirse anticuerpos con la función 5 efectora deseada. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas son: gamma 1 (IgG1), gamma 2 (IgG2), gamma 3 (IgG3) y gamma 4 (IgG4). Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser del tipo: kappa o lambda, preferentemente del tipo kappa.

"Regiones estructurales" son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de la CDR. Cada 10 dominio variable de un anticuerpo de origen natural posee habitualmente cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los residuos FR de cadena ligera están ubicados en aproximadamente los residuos 1 a 23 (LCFR1), 35 a 49 o 40 a 54 (LCFR2), 57 a 88 o 62 a 93 (LCFR3), y 98 a 107 o 103 a 112 (LCFR4) y los residuos FR de cadena pesada están ubicados en aproximadamente los residuos 1 a 30 o 1 a 30 (HCFR1), 36 a 49 (HCFR2), 66 a 94 o 67 a 96 (HCFR3), y 103 a 113 o 109 a 119 (HCFR4) en los residuos de 15 cadena pesada. Si las CDR comprenden residuos de aminoácidos a partir de bucles hipervariables, los residuos FR de cadena ligera están ubicados aproximadamente en los residuos aproximados de 1 a 25 (LCFR1), 33 a 49 (LCFR2), 53 a 90 (LCFR3), y 97 a 107 (LCFR4) en la cadena ligera y los residuos FR de cadena pesada están ubicados aproximadamente en los residuos aproximados de 1 a 25 (HCFR1), 33 a 52 (HCFR2), 56 a 95 (HCFR3), y 102 a 113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. En algunos aspectos, cuando la CDR comprende aminoácidos de tanto 20 un CDR, como define Kabat, como de aquellos de un bucle hipervariable, los residuos FR se ajustarán adecuadamente. El experto en la materia será consciente de alguna variación en la ubicación de los FR, p. ej., como un resultado de las mutaciones (p. ej., deleciones y/o inserciones), p. ej., hasta una variación de 5 residuos, o una variación de 4 residuos, o una variación de 2 residuos, o una variación de 1 residuo (p. ej., como los anticuerpos de ejemplo en este documento).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR sin.; p. ej., CDR1, CDR2, y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para una unión a antígeno. Cada dominio variable posee habitualmente tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender 30 residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" tal como define Kabat [es decir, aproximadamente los residuos 24 a 34 o 24 a 39 (L1)], 50 a 56 o 55 a 61 (L2) y 89 a 97 o 93 a 102 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31 a 35 o 26 a 35 (H1), 50 a 65 o 50 a 66 (H2) y 95 a 102 o 97 a 108 (H3) en el dominio variable de cadena pesada;Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o estos residuos de un "bucle hipervariable" es decir 35 aproximadamente los residuos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) y 91 a 96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) y 96 a 101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada;Chothia y Lesk (1987) J. Mol Biol. 196:901 -917). En algunos aspectos, una región determinante de la complementariedad puede incluir aminoácidos de tanto una región CDR definida de acuerdo con Kabat, como un bucle hipervariable. El experto en la materia será consciente de alguna variación en la ubicación de los FR, p. ej., como un resultado de las mutaciones (p. ej., deleciones 40 y/o inserciones), p. ej., hasta una variación de 5 residuos, o una variación de 4 residuos, o una variación de 2 residuos, o una variación de 1 residuo (p. ej., como los anticuerpos de ejemplo en este documento).

El término "derivado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo anti-HSP-90beta o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. El 45 término "sustitución conservativa" se usará para indicar sustituciones de aminoácidos conservativas expuestas en la Tabla 1.

Tabla 1. Sustituciones ejemplares

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gli
Arg (R)	lis
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cis (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gli (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; fe

Lis (K)	arg
Met (M)	leu; fe
Fe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gli
Ser (S)	tr
Tr (T)	ser
Trp (W)	tir
Tir (Y)	trp; fe
Val (V)	ile; leu; met; fe; ala

El término "sustitución conservativa" también abarca sustituciones de aminoácidos que poseen una puntuación o índice hidropático similar. A cada aminoácido se ha asignado un índice hidropático en base a su hidrofobicidad y características de carga, como sigue: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Al realizar cambios en base a su índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices están dentro de +/- 0,2. Más preferentemente, la sustitución implicará aminoácidos que tienen índices hidropáticos dentro de +/- 0,1, y más preferentemente dentro de aproximadamente +/- 0,05.

10

El término "sustitución de aminoácidos conservativa" también abarca la sustitución de aminoácidos semejantes en base a su hidrofiliidad, en particular cuando la proteína equivalente funcional o péptido así creado está destinado al uso de realizaciones inmunológicas, como en el caso presente. Por ejemplo, la máxima hidrofiliidad media local de una proteína, como se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad. Tal como se detalla en la patente de EE. UU. con n.º 4.554.101, a los residuos de aminoácidos se han asignado los valores de hidrofiliidad siguientes : arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/-0,1); glutamato (+3,0 +/- 0,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 +/- 0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al hacer cambios en base a valores de hidrofiliidad similares, se prefiere sustituir los aminoácidos que poseen valores de hidrofiliidad dentro de aproximadamente +/- 0,2 en relación al otro, más preferentemente dentro de aproximadamente +/- 0,1, e incluso más preferentemente dentro de aproximadamente +/- 0,05.

El término "derivado" con relación a las secuencias aminoacídicas de la presente descripción y/o para uso en la presente descripción incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia, proporcionando una secuencia aminoacídica resultante que preferentemente tiene al menos de 50 % de la actividad biológica de una HSP-90beta de origen natural, más preferentemente al menos sustancialmente la misma actividad.

El término "derivado" tal como se usa en el presente documento también comprende un componente adicional directa o indirectamente unido al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, el derivado comprende un compuesto que mejora o aumenta la vida media de un anticuerpo *in vivo*, p. ej., polietilenglicol o albúmina. En otro ejemplo, el derivado comprende adicionalmente un compuesto detectable, p. ej., un compuesto fluorescente o un compuesto radioactivo o una enzima, p. ej., para facilitar la detección y/o la exploración por imágenes. En un ejemplo adicional, el derivado comprende adicionalmente un compuesto tóxico, p. ej., un compuesto radioactivo o una toxina celular.

Los procedimientos para producir anticuerpos de forma recombinante serán conocidos para las personas expertas en la materia de la presente descripción. Dichas técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991).

Los anticuerpos de la presente descripción pueden prepararse usando células que expresen HSP-90beta de longitud completa o fragmentos de la misma como el antígeno inmunizante. Un péptido usado para inmunizar un animal puede derivar de ADNc traducido o síntesis química y se purifica y conjuga con una proteína vehículo, si se desea. Tales vehículos usados comúnmente que se acoplan químicamente con el péptido incluyen hemocianina de lapa bocallave (KLH), tiroglobulina, seroalbúmina bovina (BSA) y toxoide del tétanos. El péptido acoplado puede usarse entonces para inmunizar el animal (p. ej., un ratón o un conejo).

50

Si se desea, los anticuerpos policlonales pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por unión a y elución de una matriz a la que se une el péptido ante el que se crearon los anticuerpos. Los especialistas en la materia conocerán diversas técnicas comunes en la materia de la inmunología para la purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Coligan y col., Unidad 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991).

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

Los procedimientos conocidos en la materia permiten también identificar anticuerpos que exhiben unión a HSP-90beta y aislarlos de colecciones de expresión de anticuerpo.

15 Pueden identificarse anticuerpos con una especificidad epitópica que es la misma o similar a la del AcM STRO-4 por su capacidad de competir con ese AcM particular por la unión a HSP-90beta (p. ej., a células portadoras de HSP-90beta tales como CPM, o a proteína HSP-90 aislada o fragmentos de la misma). Usando receptores quiméricos (Rucker y col., 1996) u otras técnicas conocidas por los especialistas en la materia, puede cartografiarse el sitio de unión del AcM STRO-4.

20 También es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que el AcM STRO-4 verificando si el primero previene que el último se una a HSP-90beta. Si el anticuerpo monoclonal que se ensaya compite con el AcM STRO-4, como se muestra por una disminución de la unión por AcM STRO-4, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o uno estrechamente relacionado.

25 Es todavía otro modo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad del AcM STRO-4 preincubar el anticuerpo monoclonal que se está ensayando con HSP-90beta, y añadir entonces AcM STRO-4 para determinar si se inhibe la capacidad del AcM STRO-4 de unirse a HSP-90beta. Si se inhibe la unión del AcM STRO-4, entonces, muy probablemente, el anticuerpo monoclonal que se está ensayando tenga la misma especificidad epitópica, o funcionalmente equivalente, que el AcM STRO-4.

Los anticuerpos monoclonales que resultan útiles en la presente invención pueden diseñarse a fin de cambiar el isotipo del anticuerpo. Por ejemplo, puede genomanipularse un isotipo IgG2A como un IgG1, IgG2B u otros isotipos.

35 Se apreciará que un agente de unión a HSP-90beta tal como un anticuerpo de la descripción puede estar conjugado con un compuesto que sea útil, por ejemplo, en separación celular, aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. En un ejemplo, se conjuga un anticuerpo de la descripción con un marcaje. El marcaje puede ser cualquier entidad cuya presencia pueda detectarse fácilmente. Por ejemplo, el marcaje puede ser un marcaje directo, tal como los descritos con detalle en May y col., patente de EE.UU. n.º 5.656.503. Los marcajes directos no se limitan a, pero incluyen 40 entidades que, en su estado natural, son fácilmente visibles a simple vista, o con la ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, p. ej. luz UV para promover la fluorescencia. Los ejemplos incluyen compuestos radiactivos, quimioluminiscentes, electroactivos (tales como marcajes redox) y fluorescentes. Los marcajes particulados directos, tales como soles de tinte, soles metálicos (p. ej. oro) y partículas de látex coloreadas, son también muy adecuados, y se prefieren junto con los compuestos fluorescentes. De estas opciones, son las más preferidas las partículas de látex 45 coloreadas y los compuestos fluorescentes. La concentración del marcaje en una zona o volumen pequeño debería dar lugar a una señal fácilmente detectable, p. ej. un área fuertemente coloreada. Pueden usarse también marcajes indirectos, tales como enzimas, p. ej. fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante, aunque estos requieren habitualmente la adición de uno o más reactivos de revelado tales como sustratos antes de poder detectar una señal visible.

50 La conjugación de un marcaje con un agente de unión tal como un anticuerpo de la descripción puede ser mediante unión covalente o no covalente (incluyendo hidrófoba) o mediante adsorción. Las técnicas para tal conjugación son corrientes en la materia y pueden adaptarse fácilmente para los reactivos particulares empleados.

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

60

Los agentes de unión a HSP-90beta pueden enlazarse con un soporte sólido para permitir una separación bruta. Las técnicas de separación maximizan preferentemente la retención de viabilidad de la fracción para recoger. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente brutas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad e "inmunopurificación" con anticuerpo enlazado con una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, pero sin limitación, MACS, selección de perlas magnéticas Dynal y FACS.

10 Técnicas de clasificación celular

La capacidad de reconocer células precursoras mesenquimales con agentes de unión a HSP-90beta tales como anticuerpos anti-HSP-90beta, permite no solo la identificación y cuantificación de estas células en muestras de tejido, sino también su separación y enriquecimiento en suspensión. Esto puede conseguirse mediante una serie de técnicas de clasificación celular mediante las cuales se separan físicamente las células por referencia a una propiedad asociada al complejo de célula-anticuerpo, o un marcaje enlazado con el anticuerpo. Este marcaje puede ser una partícula magnética o una molécula fluorescente. Los anticuerpos pueden reticularse de tal modo que formen agregados de múltiples células, que son separables por su densidad. Como alternativa, los anticuerpos pueden enlazarse con una matriz estacionaria a la que se adhieren las células deseadas.

Son conocidos diversos procedimientos de separación de células unidas a anticuerpo de células no unidas. Por ejemplo, puede marcarse el anticuerpo unido a la célula (o un anticuerpo antiisotópico) y separarse entonces las células por un clasificador celular mecánico que detecta la presencia del marcaje. Los clasificadores celulares activados por fluorescencia son bien conocidos en la materia.

En una realización, el anticuerpo anti-HSP-90beta está enlazado con un soporte sólido. Son conocidos diversos soportes sólidos por los especialistas en la materia incluyendo, pero sin limitación perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibra hueca, polímeros y placas de Petri plásticas. Las células que están unidas por el anticuerpo pueden retirarse de la suspensión celular simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular.

Pueden usarse micropartículas superparamagnéticas para separaciones celulares. Por ejemplo, las micropartículas pueden recubrirse con anticuerpos anti-HSP-90beta. Las micropartículas superparamagnéticas marcadas con anticuerpo pueden incubarse entonces con una solución que contiene las células de interés. Las micropartículas se unen a las superficies de las células multipotenciales deseadas, y estas células pueden recogerse entonces en un campo magnético.

En otro ejemplo, se deja entrar físicamente en contacto la muestra celular, por ejemplo, con un anticuerpo monoclonal anti-HSP-90beta ligado a una fase sólida. La ligadura con fase sólida puede comprender, por ejemplo, adsorción de los anticuerpos en nitrocelulosa plástica u otra superficie. Los anticuerpos pueden adsorberse también sobre las paredes de poros grandes (suficientemente grandes para permitir la circulación de células) de una membrana de fibra hueca. Como alternativa, los anticuerpos pueden ligarse covalentemente con una superficie o perla, tal como macropérlas Sepharose 6 MB de Pharmacia. Las condiciones exactas y duración de la incubación de los anticuerpos ligados con fase sólida con la suspensión que contiene células multipotenciales dependerán de varios factores específicos del sistema empleado. La selección de las condiciones apropiadas, sin embargo, está dentro de las habilidades del especialista en la materia.

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

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

Diferenciación de células multipotenciales

- Las condiciones que sesgan la diferenciación de las células multipotenciales de la presente descripción a células precursoras óseas o hueso pueden implicar, por ejemplo, cultivar en α MEM suplementado con 10 % de FCS, L-ascorbato-2-fosfato 100 μ M, dexametasona 10^{-7} M y fosfato inorgánico 3 mM. Se ha mostrado que estas condiciones inducen a las células estromales de médula ósea humana a desarrollar una matriz ósea mineralizada *in vitro* (Gronthos y col., 1994).
- 10 Las condiciones adecuadas para diferenciar las células multipotenciales de la presente descripción en osteoblastos pueden implicar cultivar las células en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, osteocalcina u osteonectina. En un ejemplo particular, se cultivan las células en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno y fibrina. En un ejemplo alternativo, se cultivan las células en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, osteocalcina y osteonectina. En el contexto de este procedimiento, pueden usarse colágeno de
- 15 tipo I, fibrinógeno, fibrina, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, osteocalcina u osteonectina solos o en presencia de un factor de crecimiento. Se entenderá que está contemplada por la presente divulgación cualquier combinación de los compuestos enumerados anteriormente en este párrafo.

Producción de células modificadas genéticamente

- 20 En una realización, la presente descripción se refiere a células modificadas genéticamente, en particular a células multipotenciales modificadas genéticamente de la descripción. Preferentemente, las células se modifican genéticamente para producir una proteína heteróloga. Típicamente, las células se modificarán genéticamente de tal modo que la proteína heteróloga se secrete de las células. La proteína heteróloga puede ser cualquier proteína de
- 25 interés. Por ejemplo, la proteína heteróloga puede ser un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) y un factor derivado de estroma 1 α (SDF-1 α).

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

- En una realización, las células pueden modificarse para expresar un polinucleótido que codifica una no proteína funcional tal como dsARN (típicamente para silenciamiento de ARN), un oligonucleótido antisentido o un ácido nucleico catalítico (tal como una ribozima o ADNzima).
- 35

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

- Modificación genética tal como se usa en el presente documento abarca cualquier procedimiento de modificación genética que implique la introducción de un polinucleótido exógeno o extraño en una célula multipotencial o bien la modificación de un gen endógeno en células multipotenciales. La modificación genética incluye, pero sin limitación,
- 45 transducción (transferencia mediada por virus de ADN huésped desde un huésped o donante a un receptor, *in vitro* o *in vivo*), transfección (transformación de células con genomas de ADN vírico aislados), transferencia mediada por liposoma, electroporación, transfección con fosfato de calcio o coprecipitación y otras. Los procedimientos de transducción incluyen el cocultivo directo de células con células productoras (Bregni y col., 1992) o el cultivo con sobrenadante vírico solo con o sin factores de crecimiento y policaciones apropiados (Xu y col., 1994).
- 50

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

- Los vectores pueden incluir, pero sin limitación, vectores víricos tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus simple; cósmidos; vectores de plásmido; vectores sintéticos y otros vehículos
- 60 recombinantes usados habitualmente en la técnica. Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de

clonación en que puede ligarse operativamente un polinucleótido son bien conocidos en la materia. Tales vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están comercialmente disponibles en fuentes tales como Stratagene (La Jolla, Calif.) y Promega Biotech (Madison, Wis.). Los ejemplos específicos incluyen pSG, pSV2CAT, pXtl de Stratagene y pMSG, pSVL, pBPV y pSVK3 de Pharmacia.

5

Los vectores preferidos incluyen vectores retrovéricos (véase Coffin y col., "Retroviruses", capítulo 9, pág. 437-473, Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1997). Los vectores útiles en la descripción pueden producirse recombinantemente mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los documentos WO94/29438, WO97/21824 y WO97/21825 describen la construcción de plásmidos de empaquetamiento retrovérico y

10 líneas celulares de empaquetamiento. Los vectores ejemplares incluyen los vectores de expresión de mamífero pCMV, tales como pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp.), pSFFV-Neo y pBluescript-Sk+. Son ejemplos no limitantes de vectores retrovéricos útiles aquellos derivados de retrovirus de murino, ave o primate. Los vectores retrovéricos comunes incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (vector MoMLV). Otros vectores derivados de MoMLV incluyen Lmily, LINGFER, MINGFR y MINT. Los vectores adicionales incluyen aquellos basados en el virus

15 de la leucemia de gibón (GALV) y virus de sarcoma murino de Moloney (MOMSV) y el virus formador de focos en bazo (SFFV). Los vectores derivados del virus de la célula madre murina (MESV) incluyen MESV-MiLy. Los vectores retrovéricos incluyen también vectores basados en lentivirus, y los ejemplos no limitantes incluyen vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).

20 En la producción de constructos de vector retrovérico, pueden retirarse las secuencias gag, pol y env víricas del virus, creando espacio para la inserción de secuencias de ADN extraño. Los genes codificados por ADN extraño se expresan habitualmente bajo el control de un promotor vírico fuerte en la repetición terminal larga (LTR). La selección de las secuencias reguladoras de control apropiadas depende de la célula huésped usada y la selección está dentro de las habilidades del especialista en la materia. Son conocidos numerosos promotores además del promotor de la LTR. Los

25 ejemplos no limitantes incluyen el promotor del fago lambda PL, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), el promotor de la región U3 del virus de sarcoma murino de Moloney (MMSV), virus de sarcoma de Rous (RSV) o virus formador de focos en bazo (SFFV); el promotor de granzima A y el promotor de granzima B. Pueden usarse adicionalmente elementos de control inducibles o múltiples. La selección de un promotor adecuado será evidente para aquellos especialistas en la materia.

30

Tal constructo puede empaquetarse en partículas víricas eficientemente si se proporcionan las funciones gag, pol y env en trans por una línea celular de empaquetamiento. Por lo tanto, cuando se introduce el constructo de vector en la célula de empaquetamiento, las proteínas gag-pol y env producidas por la célula se ensamblan con el ARN de vector produciendo viriones infecciosos que se secretan al medio de cultivo. El virus así producido puede infectar e integrarse

35 en el ADN de la célula diana, pero no produce partículas víricas infecciosas puesto que carece de secuencias de empaquetamiento esenciales. La mayoría de las líneas celulares de empaquetamiento actualmente en uso se han transfectado con plásmidos separados, conteniendo cada uno una de las secuencias de codificación necesarias, de modo que son necesarios múltiples eventos de recombinación antes de poder producir un virus competente de replicación. Como alternativa, la línea celular de empaquetamiento alberga un provirus. El provirus se ha incapacitado

40 de modo que, aunque puede producir todas las proteínas requeridas para ensamblar virus infecciosos, su propio ARN no puede empaquetarse en virus. En cambio, se empaqueta el ARN producido a partir del virus recombinante. Por lo tanto, la solución madre de virus liberada de las células de empaquetamiento contiene solo virus recombinantes. Los ejemplos no limitantes de líneas de empaquetamiento retrovéricas incluyen PA12, PA317, PE501, PG13, PSI.CRIP, RDI 14, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6) y PT67. Se hace referencia a Miller y col., 1986; Danos y col., 1988; Pear

45 y col., 1993 y Finer y col., 1994.

Otros vectores adecuados incluyen vectores adenovéricos (véanse Frey y col., 1998 y WO 95/27071) y vectores víricos adenoasociados. Estos vectores son todos bien conocidos en la materia, p. ej. como se describe en Chatterjee y col., 1996 y Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds. Quesenberry y col., John Wiley & Sons, 1998 y las patentes de EE.

50 UU. n.º 5.693.531 y n.º 5.691.176). El uso de vectores derivados de adenovirus puede ser ventajoso en ciertas situaciones, porque no son capaces de infectar células no en división. Al contrario que el ADN retrovérico, el ADN adenovérico no se integra en el genoma de la célula diana. Además, la capacidad de portar ADN extraño es mucho mayor en vectores adenovéricos que vectores retrovéricos. Los vectores víricos adenoasociados son otro sistema de suministro útil. El ADN de este virus puede integrarse en células no en división y se han introducido exitosamente una

55 serie de polinucleótidos en diferentes tipos celulares usando vectores víricos adenoasociados.

En algunas realizaciones, el constructo o vector incluirá dos o más secuencias polinucleotídicas heterólogas. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico adicional es un polinucleótido que codifica un marcador selectivo, un gen estructural, un gen terapéutico o un gen de citocina/quimiocina.

60

- Puede incluirse un marcador selectivo en el constructo o vector con fines de monitorizar la modificación genética exitosa y para la selección de células en que se ha integrado el ADN. Los ejemplos no limitantes incluyen marcadores de resistencia a fármacos, tales como G418 (sulfato de neomicina) o higromicina. Puede usarse selección negativa adicionalmente, por ejemplo, donde el marcador es el gen HSV-tk. Este gen hará a las células sensibles a agentes tales como aciclovir y ganciclovir. El gen NeoR (resistencia a neomicina/G418) se usa comúnmente, pero puede usarse cualquier gen marcador conveniente cuyas secuencias génicas no estén ya presentes en la célula diana. Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR), proteína fluorescente verde potenciada (EFGP), gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen bacteriano hisD, CD24 de murino (HSA), CD8a(Iyt) de murino, genes bacterianos que confieren resistencia a puromicina o fleomicina y β -galactosidasa.
- 5 La secuencia o secuencias polinucleotídicas adicionales pueden introducirse en la célula huésped en el mismo vector o pueden introducirse en las células huésped en un segundo vector. En una realización preferida, se incluirá un marcador selectivo en el mismo vector que el polinucleótido.
- 10 La presente descripción también abarca la modificación genética de la región promotora de un gen endógeno de tal modo que la expresión del gen endógeno se regule positivamente, dando como resultado una producción aumentada de la proteína codificada en comparación con células multipotenciales de tipo silvestre.
- 15

Uso de composiciones de células multipotenciales enriquecidas

- 20 El enriquecimiento de células multipotenciales tales como las CPM es deseable para diversidad de fines terapéuticos. Estos incluyen la regeneración de tejido esquelético dañado o perdido, mejorando la implantación de diversos dispositivos protésicos metálicos o de plástico a través de la unión de células mesenquimales derivadas de médula ósea aisladas o expandidas en cultivo sobre las superficies porosas de los dispositivos protésicos, los cuales, tras
- 25 activación y subsiguiente diferenciación de las células mesenquimales derivadas de médula, producen puentes óseos naturales.
- Los injertos compuestos de las células mesenquimales cultivadas podrían usarse para aumentar la tasa de reserva celular hematopoyética durante el trasplante de médula ósea.
- 30 Una clase de defecto que puede repararse mediante células mesenquimales derivadas de médula cultivadas y expandidas a partir de células multipotenciales de la presente descripción es la clase de grandes defectos esqueléticos en huesos causados por daño o producidos mediante la eliminación de grandes secciones de hueso infectadas por tumores. En circunstancias normales, este tipo de defecto no cicatriza y crea una no unión del hueso. Este tipo de
- 35 defecto puede tratarse mediante la implantación de células mesenquimales cultivadas y contenidas en los vehículos cerámicos de fosfato de calcio en el mismo sitio de defecto.
- Otra clase de defecto que puede repararse mediante células mesenquimales derivadas de médula cultivadas y expandidas a partir de células multipotenciales de la presente descripción es el cartílago articular dañado a causa de
- 40 traumatismos o enfermedades tales como osteoartritis y artritis reumatoide.
- La población celular enriquecida o expandida de células multipotenciales obtenida puede usarse, de acuerdo con la invención, por ejemplo, en la formación y reparación de huesos, y como tal puede introducirse una combinación de células multipotenciales, así como un soporte adecuado, en un sitio que requiera la formación de hueso. Por tanto,
- 45 por ejemplo, pueden repararse los defectos esqueléticos causados por lesión ósea o la retirada de secciones de hueso infiltradas por tumores implantando células multipotenciales cultivadas o expandidas contenidas en vehículos cerámicos de fosfato de calcio en el sitio de defecto. Para procedimientos y técnicas apropiados, véanse Caplan y col. en la patente de EE.UU. 5.226.914 y la patente de EE.UU. 5.837.539, usando ambas preparaciones más brutas de células madre en comparación con la presente descripción.
- 50 Además, la población o composición de células enriquecidas puede usarse para ayudar a anclar dispositivos protésicos. Por tanto, la superficie de un dispositivo protésico tal como los usados en reemplazos de cadera, rodilla y hombro pueden recubrirse con las células multipotenciales enriquecidas previamente a la implantación. Las células multipotenciales pueden diferenciarse entonces en células osteogénicas para acelerar así el proceso de crecimiento
- 55 óseo y la incorporación del dispositivo protésico (véanse Caplan y col. en la patente de EE.UU. 5.226.914 y la patente de EE.UU. 5.837.539).
- La población o composición de células enriquecidas podría usarse también en terapia génica de modo que, por ejemplo, una población enriquecida pueda transformarse con ácido nucleico exógeno, y entonces tal población pueda
- 60 introducirse en el cuerpo del paciente para tratar una enfermedad o afección. Como alternativa, podría usarse para la

liberación de productos terapéuticos. Para técnicas apropiadas, se hace referencia a la patente de EE.UU. 5.591.625 de Gerson y col., que usa preparaciones más brutas de células madre en comparación con la presente descripción.

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

10 Composiciones celulares

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

20 Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye, aunque sin limitación, todos y cada uno los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para administración parenteral. Como alternativa, el vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que un medio o agente 25 convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la descripción. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

30 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente descripción pueden administrarse en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo para soportar las células y proporcionar una superficie para el crecimiento de hueso, cartílago, músculo, nervio, epidermis y/u otro tejido conectivo. La matriz puede estar en forma de biomateriales de matriz tradicionales. La matriz puede proporcionar una liberación lenta de células y/o el entorno apropiado para la presentación de las mismas. En algunas realizaciones, se espera que diversas proteínas colagenosas y no colagenosas estén reguladas positivamente y secretadas por las células. Este fenómeno acelera la regeneración de 35 tejido al potenciar la deposición de matriz. Las proteínas de matriz pueden expresarse también en células genomanipuladas y potenciar el injerto y adhesión de las células trasplantadas en el área de trasplante.

Las composiciones celulares de la descripción pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, 40 otras células multipotentes o pluripotentes o condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, células madre o células de médula ósea. Pueden mezclarse células de diferentes tipos con una composición de la descripción inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un periodo de tiempo previamente a la administración.

45 Las composiciones celulares de la descripción pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas (factores de crecimiento, factores tróficos) beneficiosos. Cuando se administran las células multipotenciales con otros agentes, pueden administrarse conjuntamente en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente a los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (p.ej., EPO, 50 mimeticuerpos de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (p.ej., inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMÚS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; p.ej., TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (p.ej., inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina, tacrolimús; inhibidores de mTOR (p.ej., SIROLIMÚS, EVEROLIMÚS); antiproliferativos (p.ej., azatioprina, micofenolato de 55 mofetilo); corticosteroides (p.ej., prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (p.ej., basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T [p.ej., globulina antitimocítica (ATG); globulina antilinfocítica (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3]); agentes antitrombogénicos (p.ej., heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPACK (dextrofenilalanina, prolina, arginina, clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, 60 anticuerpos anti-receptor de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e

inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (p.ej., probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína) así como anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden coadministrarse con un factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.827.735.

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

10 **Cola de fibrina**

Las colas de fibrina son una clase de sellantes quirúrgicos que se han usado en diversos ambientes médicos. Como será consciente el destinatario especialista, son útiles numerosos sellantes en las composiciones de la descripción. Sin embargo, una realización preferida de la descripción se refiere al uso de colas de fibrina con células de la descripción.

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

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

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

40 Son descritos el uso de cola de fibrina y sus procedimientos para preparación por Hirsh y col. en la patente de EE.UU. n.º 5.643.192. Hirsh divulga la extracción de los componentes fibrinógeno y trombina de un solo donante, y la combinación de solo estos componentes para uso como cola de fibrina. Marx, en la patente de EE.UU. n.º 5.651.982, describe otra preparación y procedimiento de uso de cola de fibrina. Marx proporciona una cola de fibrina con liposomas para uso como sellante tópico en mamíferos. La preparación y uso de un complejo de fibrinógeno tópico (CFT) para la curación de heridas son conocidos en el campo. La solicitud de PCT n.º PCT/US95/15876 y la publicación PCT n.º WO96/17633, de la Cruz Roja Americana, exponen preparaciones de CFT que contienen fibrinógeno, trombina y cloruro de calcio, por ejemplo, en las páginas 16-18 de la publicación PCT n.º WO96/17633.

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

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1. Materiales y procedimientos

Inmunización de ratones y producción de líneas celulares de hibridoma que secreta anticuerpos

60

Se recogieron CPM ovinas inmunoseleccionadas positivas de VCAM-1 y -CD106 y se resuspendieron en 300 µl de PBS suplementado con 20 µg de dipéptido muramil (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) como adyuvante. Se inmunizaron intraperitonealmente ratones Balb C con 5×10^6 BMMNC y subsiguientemente se reforzaron 3 veces más en intervalos de tres semanas para garantizar una maduración de afinidad adecuada de la respuesta inmunitaria. Tres días antes de la fusión, 5×10^6 células resuspendidas en 100 µl de PBS se administraron a través de la vena de cola. Inmediatamente antes de la fusión, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron sus bazos asépticamente. El reactivo de hibridomas secretores de anticuerpos con BMMNC cultivadas se realizó mediante la fusión de la línea celular del mieloma murino NS1-Ag4-1 y las células del bazo derivadas de ratones Balb C inmunizados con CPM ovinas cultivadas tripsinizadas. La fusión de esplenocitos y células de mieloma se llevó a cabo esencialmente como se describió anteriormente (Filshie RJ y col., 1998 y Zannettino AC y col., 1996).

Los hibridomas se cribaron según su baja reactividad con células mononucleares de médula ósea y por reactividad con el inmunógeno primario (CPM ovinas cultivadas) y las CPM humanas cultivadas. El hibridoma STRO-4 también se seleccionó por su reactividad y enriquecimiento de las CPM formadoras de colonias humanas (UFC-F).

15

Muestras de médula ósea

Se obtuvieron aspirados de médula ósea adulta humana según las directrices aprobadas por el Comité de ética humana del Royal Adelaide Hospital. Los aspirados de médula ósea ovina se obtuvieron según las directrices aprobadas por el Comité de ética animal del Instituto de Ciencias Médicas y Veterinarias. Las células mononucleares de médula ósea humana y ovina (CMN de MO) se prepararon por separación de gradiente de densidad esencialmente como se ha descrito previamente (Gronthos S y col., 2003). Las preparaciones de CMN de MO fueron usadas para clasificación celular activada por fluorescencia o inmunomagnética tal como se describe a continuación.

25 Cultivo celular de CPM

Los ensayos de eficiencia de colonia se realizaron con densidades de placa que oscilaron entre 0,1 a 1×10^4 de CMN de MO inmunoseleccionadas o no fraccionadas por cm^2 en placas de 6 pocillos triplicados durante un período de 12 días en pocillos triplicados como se ha descrito antes. Las células crecieron en un medio α -MEM suplementado con un 20 % de suero fetal de ternero, 2 mM de L-glutamina y 100 µM de L-ascorbato-2-fosfato, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin al 5% de CO_2 con una temperatura de atmósfera humidificada de 37 °C, tal como se ha descrito antes (Gronthos S y col., 2003). Se realizó un recuento de colonias (clústeres de células de más de 50 células) después de la fijación con paraformaldehído al 4 % para después teñirse con 0,1 % de azul de toluidina. Los cultivos de BMMNC primarias se establecieron en placas de 1 a 5×10^4 de CMN de MO no fraccionadas o inmunoseleccionadas de STRO-4⁺ por cm^2 para después dejarse crecer en un medio α -MEM tal como se describió antes.

Ensayos de diferenciación

Para inducir la osteogénesis, las CPM se cultivaron en un medio α -MEM suplementado con un 10 % de FCS, 100 µM de L-ascorbato-2-fosfato, 10^{-7} M de dexametasona y 3 mM fosfato inorgánico, donde los depósitos mineralizados fueron identificados mediante tinción de rojo de alizarina (Gronthos S y col., 2003). La adipogénesis se indujo en presencia de 0,5 mM de isometilbutilmetilxantina (IBMX), 0,5 µM de hidrocortisona, y 60 µM indometacina, donde se usó la tinción con aceite rojo O para identificar las células de grasas cargadas con lípidos tal como se describió anteriormente (Gronthos S y col., 2003). La diferenciación condrogénica se valoró en cultivos agregados tratados con 10 ng/ml TGF- β 3 y se valoró mediante tinción al 0,1 % de azul de toluidina durante una noche y para detectar la síntesis de proteoglicano (Gronthos S y col., 2003).

Clasificación celular activada por magnetismo (MACS)

50

Esta se llevó a cabo como se describió antes (Gronthos S y col., 2003). En resumen, aproximadamente $1-3 \times 10^8$ de CMN de MO humana y ovina normales se incubaron con anti-VCAM-1/CD106 o sobrenadante puro de STRO-4, durante una hora en hielo. Las preparaciones celulares se incubaron con microperlas de estreptavidina de IgG de cabra anti-ratón y finalmente estreptavidina-FITC (1/50; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 minutos en hielo antes de ser separadas en una columna magnética Mini MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis citométrico de flujo e inmunofluorescencia indirecta

60 Antes del inmunomarcado, las células cultivadas (CPM ovinas, CPM humanas MG63, HOS, SAOS) se incubaron en

- un tampón de bloqueo (HBSS + 20 mM Hepes, 1 % de suero de AC humano normal, 1 % de albúmina de suero bovina) (BSA: Cohn fraction V, Sigma Aldrich Pty Ltd, NSW, Australia), y 5 % de FCS durante 20 minutos en hielo. Las alícuotas de 1×10^5 células se resuspendieron en 100 μ l de sobrenadante STRO-4 durante 45 minutos en hielo. Los anticuerpos de control no de unión de isotipo coincidente, los anticuerpos, IgG₁(1B5) (aportados adecuadamente por el Profesor L.K. Ashman, University of Newcastle, Australia) se usaron como sobrenadante de cultivo bajo condiciones idénticas. Las células se lavaron entonces en HBSS con 5 % de FCS y se incubaron con ficoeritrina (PE) (cadena-y específica) de IgG de cabra anti-ratón (1/50; Southern Biotechnology Associates, Birmingham AL) durante 45 minutos en hielo. Antes del análisis, las células se lavaron dos veces en HBSS con 5 % de FCS y se resuspendieron en PBS/1 % de paraformaldehído. El análisis de citometría de flujo se realizó usando un citómetro de flujo Coulter Excel (Coulter Corp., Hialeah, FL). La positividad para cada anticuerpo se definió como el nivel de fluorescencia mayor al 99 % de lo observado cuando se usaron los anticuerpos de control no unión de isotipo coincidente. Se recogieron 20.000 eventos por muestra como datos en modo lista y se analizaron usando el software Coulter ELITE.

Imunoprecipitación y Western Blotting

- 15 Los lisados de célula se prepararon como se describieron antes. Las Dynabeads de Ig-acoplado de cabra anti-ratón (Dyna, Oslo, Suecia), se lavaron dos veces en 1 % (v/v) de NP40-50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA [TSE] antes del sobrenadante de STRO-4 puro y el control no unión de isotipo coincidente (1B5). La mezcla se incubó entonces a 4° C durante un mínimo de 6 horas, con rotación. Las Dynabeads prearmadas resultantes fueron lavadas dos veces en 1 % NP40 TSE, y las perlas se recogieron usando un colector de partículas magnético (MPC-1, Dynal). Para estos, se añadió 1,0 ml de alícuotas del lisado celular NP40 apropiado. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4° C con rotación. Los inmunoprecipitados se lavaron entonces dos veces en 1 % (v/v) NP40-TSE, una vez en 0,1 % (v/v) NP40-TSE, y una vez en TSE, pH de 8,0. El sobrenadante se eliminó después y las muestras se almacenaron a -20° C o bien se usaron inmediatamente para electroforesis. Cada inmunoprecipitado representó el material de 5×10^6 equivalentes celulares. Las muestras se hirieron durante 3 minutos en 25 μ l de tampón de muestra reducido (62,5 mM de Tris, 3 % (p/v) de SDS, 10 % (v/v) de glicerol y 5 % (v/v) de 2-mercaptoetanol) y se analizaron mediante electroforesis con un gel de poliacrilamida SDS al 10 % (p/v) utilizando azul de Coomassie como se describió previamente (Zannettino AC y col., 1996).
- 30 Para la espectrometría de masas y la secuenciación de proteínas, las bandas escindidas se sometieron a 16 horas de digestión triptica a 37° C. Las muestras fueron después desaladas y concentradas usando un Millipore C18 ZipTip y se aplicó 1 μ l de alícuota en la placa de muestra con 1 μ l de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 8 mg/ml en 70 % v/v AcN, 1% v/v TFA) y se dejó secar. La espectrometría de masas de la ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI) se realizó con un 4700 Proteomics Analyser de Applied Biosystems con óptica TOF/TOF en modo MS.
- 35 Se usó un láser Nd:YAG (355 nm) para irradiar la muestra. Los espectros se recogieron en el modo reflectron en el intervalo de masas de 750 a 3500 Th. Los datos se exportaron en un formato adecuado para presentación en el programa Mascot de búsqueda en base de datos (Matrix Science Ltd, Londres, RU).

- Para los inmunoblots, las proteínas en geles puros se transfirieron a polivinil-difluoroacetato (PVDF; MSI Membranes, Geneworks, Adelaide, Australia) a 30 mA durante una noche en un aparato de blotting húmedo (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, EE.UU.). Después de bloquearlo durante 2 horas con un 5 % de leche desnatada en polvo (0,05 % de Tween 20) en PBS, los filtros se incubaron con anticuerpo policlonal en HSP-90 (Santa Cruz Biotechnologies) durante una hora y a temperatura ambiente. El anticuerpo fue subsiguientemente detectado con conjugado de fosfatasa alcalina de cabra anti-ratón (Amersham Biosciences, Poole, RU) y las proteínas inmunorreactivas se visualizaron en un FluorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) usando el software ImageQuant (Molecular Dynamics) tal como recomienda el fabricante (Zannettino AC y col., 1996 y Shi S y col., 2001).

Ejemplo 2. Generación del anticuerpo monoclonal STRO-4 que define las CPM humanas y ovinas

- 50 Se generó un panel de anticuerpos monoclonales de ratón (AcM) reactivos con CPM ovinas después de la fusión de esplenocitos derivados de ratones inmunizados con VCAM-1/CD106 positivos cultivados y derivados de CPM ovinas con la línea celular de mieloma, NS1-Ag4-1, tal como se describe en los procedimientos. Las selecciones preliminares se diseñaron para identificar los AcM que reaccionaron con tanto las CPM clonogénicas ovinas como humanas (UFC-F). Tal hibridoma único, STRO-4, fue seleccionado para mayor análisis ya que identificó un subgrupo menor de células mononucleares de médula ósea humana y ovina (Figura 1A y B) y eficientemente aisló la UFC-F humana y ovina (Figura 1C y D). Las CPM humanas y ovinas expandidas *ex vivo* mantuvieron una alta expresión de superficie celular del antígeno identificado por STRO-4 (Figura 2A y B) y exhibieron la capacidad para diferenciación multilineaje en osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Figura 3). Se determinó que el isotipo de inmunoglobulina de STRO-4 de sobrenadantes de hibridoma terciario era IgG₁ usando un kit de detección de isotipo tal como se describió en los procedimientos.

Ejemplo 3. Caracterización del antígeno reconocido por STRO-4

La inmunoprecipitación fue usada para purificar el antígeno STRO-4 a partir de la línea celular de osteosarcoma humano, MG63, que expresó altos niveles de superficie celular del antígeno STRO-4 (Figura 2C). Las proteínas de membrana de plasma MG63 humana se extrajeron con un 1 % de NP40 como se describió en los procedimientos, y se incubaron con el anticuerpo STRO-4. La proteína inmunoprecipitada de STRO-4 fue recuperada usando anticuerpos de IgG de oveja anti-ratón conjugados con Dynalbeads magnéticas y resuelto mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) como se describió en los procedimientos. La tinción con azul de Coomassie de los inmunoprecipitados resueltos reveló una banda de péptidos específica con una masa molecular aparente de 90 kDa (Figura 4). El fragmento de proteína de 90 kDa se escindió partir del gel y se preparó para espectrometría de masas y análisis de secuencia de aminoácidos. Las secuencias peptídicas de STRO-4 resultantes se usaron para muestrear con la base de datos de proteínas del Centro Nacional para Información Biotecnológica y se halló que exhiben homología con la proteína beta de shock térmico humana de 90 kDa (número de acceso, P08238) (Figura 5).

Para confirmar que el péptido de 90 kDa del reactivo de STRO-4 era HSP-90beta, los lisados de célula completa y los extractos de inmunoprecipitado de STRO-4 se resolvieron mediante SDS-PAGE. El análisis de Western blot se realizó usando un anticuerpo policlonal de conejo disponible comercialmente reactivo con HSP-90beta tal como se describe en los procedimientos. Los inmunoprecipitados de STRO-4 exhibieron reactividad específica con el anticuerpo específico de HSP-90 en el peso molecular apropiado de 90 kDa (Figura 6).

En el presente estudio, las poblaciones de CPM humanas y ovinas seleccionadas en base la expresión de superficie celular de STRO-4 demostraron una proliferación extensiva *in vitro*, mientras que retuvieron su capacidad de diferenciación en hueso, cartílago y tejidos adiposos. Hasta el momento, han existido pocos reactivos de anticuerpo que exhiban reactividad cruzada entre las diferentes especies.

Así, los anticuerpos con STRO-4 pueden usarse como un medio efectivo para aislar y enriquecer las CPM.

Bibliografía

- 30 Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, Sutko JL, Zanjani ED (2004) Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 109(11):1401-7.
- Anseth KS y col. (2002) In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery 78(103):199-209.
- 35 Bregni y col. (1992). Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 80, 1418-22.
- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86(6):627-37.
- Cole y col. (1984) Human monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biochem.* 62, 109-20.
- 40 Cote y col. (1983) Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026-30.
- Danos y col. (1988) Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6460-4
- Filshie RJ, Zannettino AC, Makrynika V, Gronthos S, Henniker AJ, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Simmons PJ, Bradstock KF (1998) MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia* 12(3):414-21.
- 45 Finer y col. (1994) kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood.* 83, 43-50.
- Frey y col. (1998) High-efficiency gene transfer into ex vivo expanded human hematopoietic progenitors and precursor cells by adenovirus vectors. *Blood* 91, 2781-92.
- 50 Gronthos y col. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84, 4164-73.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116(Pt 9):1827-35.
- 55 Kohler y col. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.
- Kozbor y col. (1985). Specific immunoglobulin production and enhanced tumorigenicity following ascites growth of human hybridomas. *J. Immunol. Methods* 81, 31-42.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW (2000) Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6(11):1282-6.
- 60

- Mackenzie TC, Flake AW (2001) Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol Dis* 27(3):601-4.
- Miller y col. (1986) Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol.* 6, 2895-902.
- 5 Miller y col. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques.* 7, 980-82, 984-86, 989-990.
- Pear y col. (1993) Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 8392-8396.
- 10 Pearson WR and Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. 85(8):2444-8.
- Rucker y col. (1996) Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 87, 437-46.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29(6):532-9.
- 15 Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18(4):696-704.
- Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78(1):55-62.
- Voss AK, Thomas T, Gruss P (2000) Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*
- 20 127(1):1-11.
- Yamada T, Hashiguchi A, Fukushima S, Kakita Y, Umezawa A, Maruyama T, Hata J (2000) Function of 90-kDa heat shock protein in cellular differentiation of human embryonal carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36(2):139-46.
- Zannettino AC, Rayner JR, Ashman LK, Gonda TJ, Simmons PJ (1996) A powerful new technique for isolating genes encoding cell surface antigens using retroviral expression cloning. *J Immunol* 156(2):611-20.
- 25 Xu y col. (1994). Correction of the enzyme deficiency in hematopoietic cells of Gaucher patients using a clinically acceptable retroviral supernatant transduction protocol. *Exp. Hemat.* 22, 223-30.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas, el procedimiento comprendiendo enriquecer una muestra celular tomada de una fuente de tejido que contiene células precursoras mesenquimales multipotenciales que expresan el marcador HSP-90beta, donde enriquecer las células que expresan el marcador HSP-90beta comprende:
- 5 poner en contacto la muestra celular con un agente de unión a HSP-90beta; y
- 10 separar las células unidas al agente de unión a HSP-90beta a partir de células que no se unen al agente de unión a HSP-90beta; y
- donde el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HSP-90beta.
- 15 2. Un procedimiento para identificar la presencia de células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas en una muestra celular tomada de una fuente de tejido que contiene células precursoras mesenquimales multipotenciales, el procedimiento comprendiendo la identificación de células en la muestra celular que expresa el marcador HSP-90beta, donde la identificación de células en una muestra celular que expresa el marcador HSP-90beta comprende:
- 20 poner en contacto una muestra celular obtenida de una fuente de una fuente de tejido con un agente de unión a HSP-90beta bajo condiciones adecuadas para la unión de HSP-90beta al agente de unión a HSP-90beta; y
- 25 detectar la presencia del agente de unión a HSP-90beta unido a células en la muestra, donde la presencia de células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas se indica por células que se unen al agente de unión a HSP-90beta.
- donde el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HSP-90beta.
- 30 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo en las células madre mesenquimales como el anticuerpo STRO-4 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.
- 35 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el agente de unión a HSP-90beta es un anticuerpo STRO-4 o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo STRO-4 y donde el anticuerpo STRO-4 es producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 10 de julio de 2008 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso al depósito PTA-9362.
- 40 5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el procedimiento también enriquece células que son positivas para uno o más de los marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en: STRO-1, STRO-3, CD146, LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, NGF-R, FGF-R, Leptina-R, RANKL o cualquier combinación de estos marcadores.
- 45 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la fuente de tejido es placenta, tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, nódulo linfático, timo, ovario, páncreas, hueso, ligamiento, médula ósea, tendón o músculo esquelético.
- 50 7. Uso de la HSP-90beta como un marcador para la identificación *in vitro* y/o enriquecimiento de células precursoras mesenquimales multipotenciales adultas.

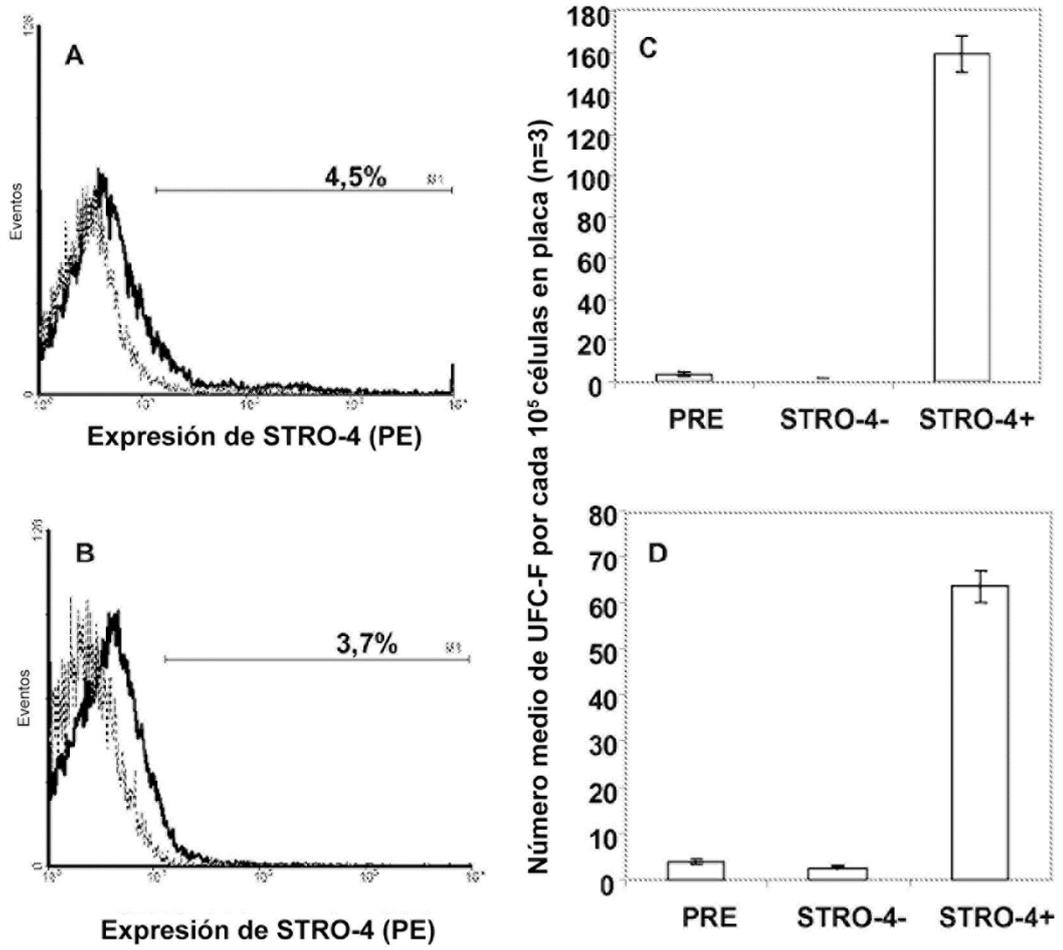


FIGURA 1

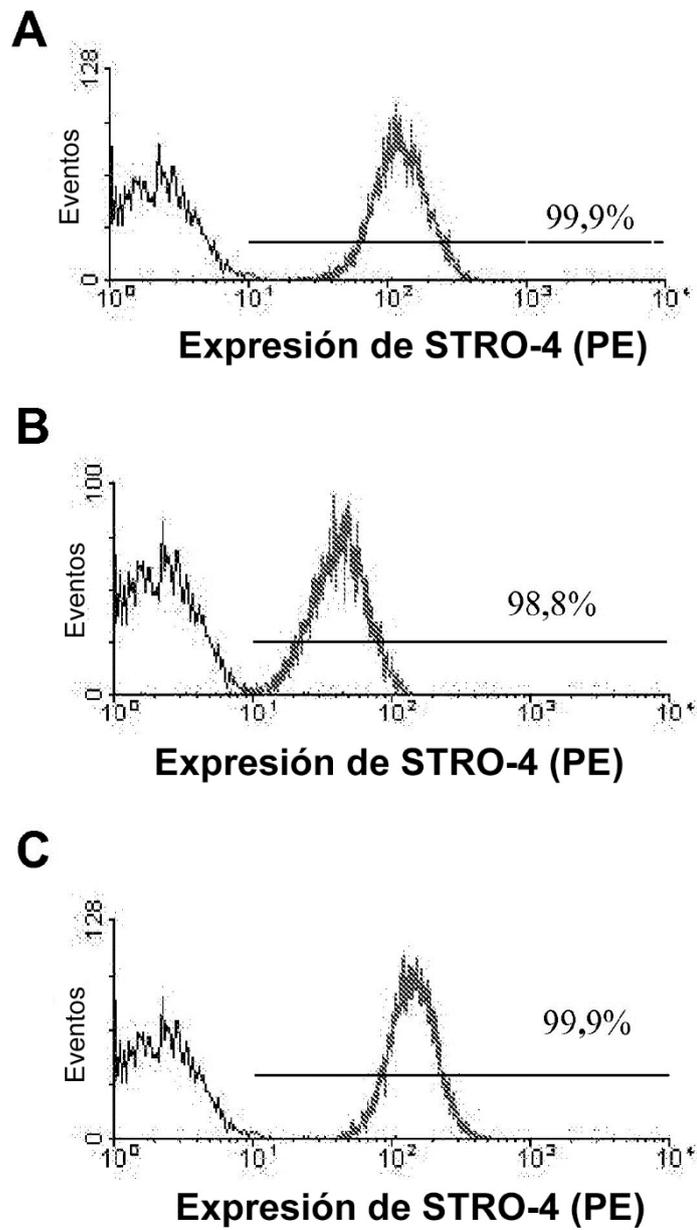


FIGURA 2

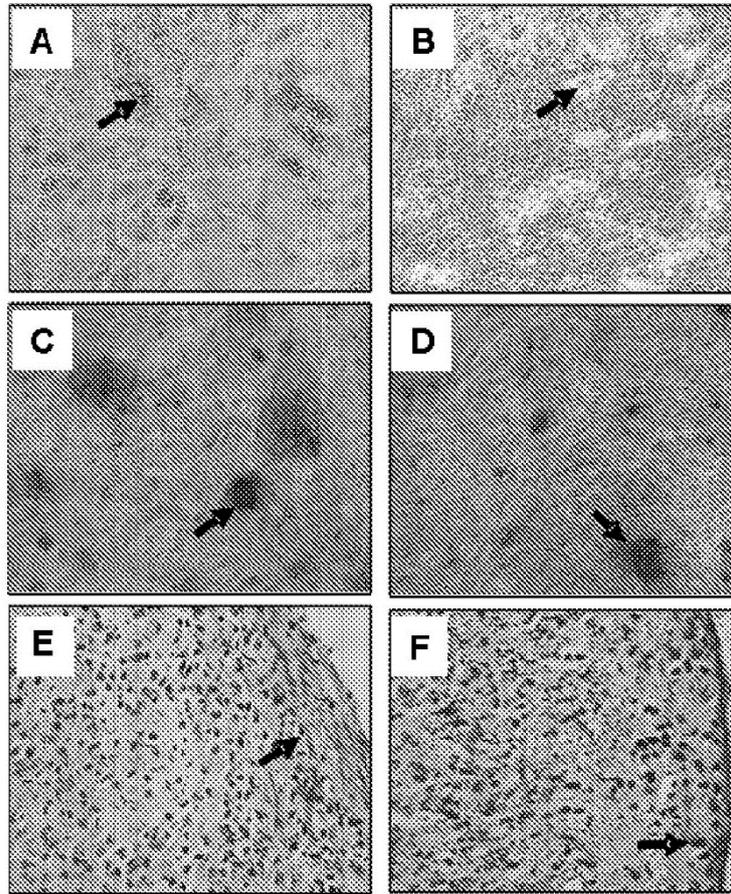


FIGURA 3

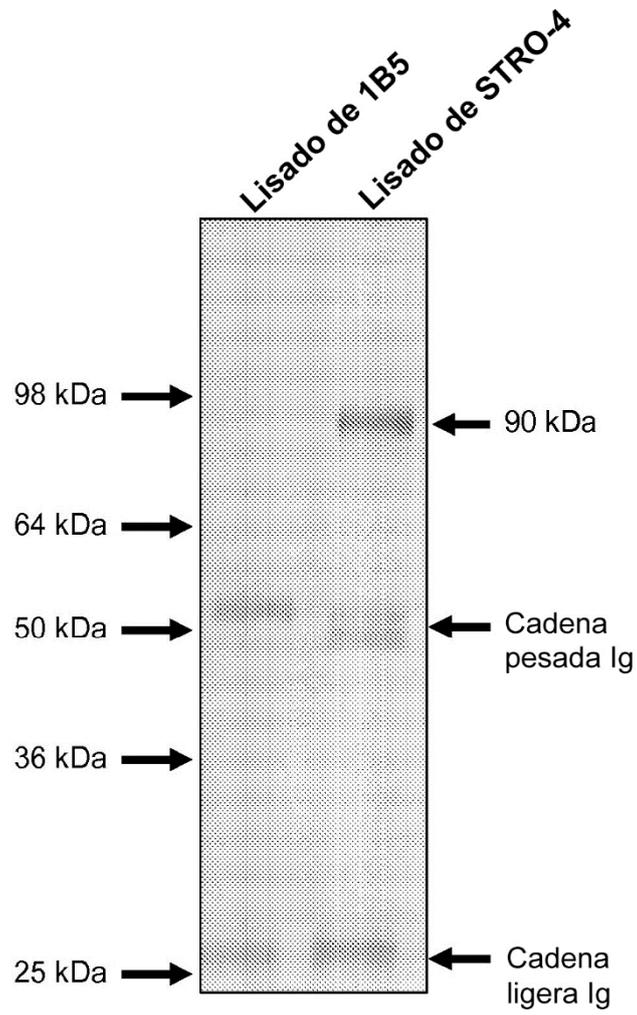


FIGURA 4

Secuencia de péptidos para la proteína beta de shock térmico de 90 kDa (NCBI, número de acceso: P08238)

Se muestran en **negrita** los péptidos secuenciados de STRO-4 coincidentes

1 PEEVHHGEEE VETFAFQAEI AQLMSLIINT FYSNKEIFLR ELISNASDAL
51 **DKIRYESLTD PSKLD**SGKEL KIDIIP**NPQE** RTLTLVDTGI **GMTKAD**LINN
101 LGTIAKSGTK AFMEALQAGA DISMIGQFGV GFYSAYLVAE KVVVITKH**ND**
151 **DEQYAWESSA GGSFTVR**ADH GEPIGRGTKV ILHLKEDQTE YLEERRVKEV
201 VKKHSQFIGY PITLYLEKER EKEISDDEAE EEKGEKEEED KDDEEKPKIE
251 DVGSDEEDDS GKDKKKKTKK IKEKYIDQEE LN**KT**KPIWTR **NPDDITQEEY**
301 **GEFYKSLTND** WEDHLAVKHF **SVEGQLEFRA** LLFIPRRAPF **DLFENK**KKKN
351 NIKLYVRRVF IMDSCDELIP EYLN**FIRGVV** **DSEDLPLNIS** REMLQQSKIL
401 KVIRKNIVKK CLELFSELAE DKENYKKFYE AFSKNLKLGI HEDSTNRRRL
451 SELLRYHT**SQ** **SGDEMTSLSE** YVSRMKETQK SIYYITGESK **EQVANS**AFVE
501 RVRKRGFEVV YMTEPIDEYC VQQLKEFDGK SLVSVTKEGL ELPEDEEEKK
551 KMEESKAKFE **NLCKLMKEIL** **DKKVEKVTIS** NRLVSSPCCI VTSTYGWTAN
601 MERIMKAQAL RDNSTMGYMM AKKHLEINPD **HPIVETLRQK** AEADKNDKAV
651 KDLVVLLFET ALLSSGFSLE DPQTHSNRIY RMIKLGLGID EDEVAEEPN
701 AAVPDEIPPL EGDEDASRME EVD

FIGURA 5

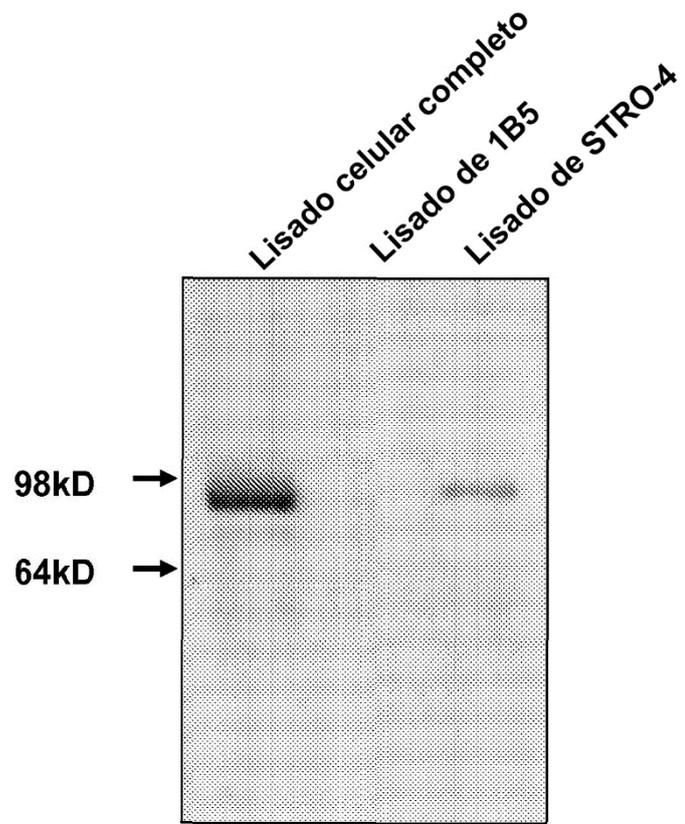


FIGURA 6