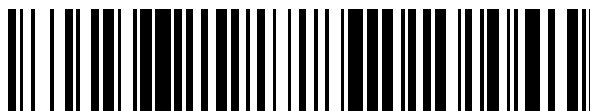


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 099**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2005 E 10075534 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2348105**

54 Título: **Progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) y sus usos**

30 Prioridad:

24.09.2004 AU 2004905528
24.09.2004 AU 2004905525
24.09.2004 AU 2004905526
24.09.2004 AU 2004905527
24.09.2004 US 613021 P
19.10.2004 AU 2004906063
19.10.2004 AU 2004906062
19.10.2004 AU 2004906061
19.10.2004 AU 2004906060

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GRONTHOS, STAN y
ZANNETTINO, ANDREW CHRISTOPHER WILLIAM

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 710 099 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

Progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) y sus usos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP por sus siglas en inglés). La presente invención también se refiere a procedimientos para producir MEMP y a usos de las MEMP para aplicaciones terapéuticas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células progenitoras no hematopoyéticas que residen en el cuerpo y dan lugar a células multipotenciales cuando se las aísla se denominan células precursoras mesenquimales (MPC por sus siglas en inglés). Más específicamente, las MPC purificadas son capaces de formar una gran cantidad de colonias celulares multipotenciales.

15

Simmons y col. (Advances in Bone Marrow Purging and Processing: Fourth International Symposium, páginas 271-280, 1994) describe el enriquecimiento de las MPC a partir de células de médula ósea recién recolectadas mediante la selección de células que expresan el marcador de superficie celular STRO-1. Tal como lo explican los autores en las páginas 272-273, se sabe que las células de médula ósea contienen una proporción de MPC que son capaces de generar CFU-F. Estas CFU-F a su vez son capaces de generar, en condiciones adecuadas, un amplio espectro de tejido conectivo completamente diferenciado, incluido cartilago, hueso, tejido adiposo, tejido fibroso y estroma mielosoportador.

20

Las MPC y las CFU-F típicamente están presentes con una incidencia muy baja en las células de médula ósea (típicamente entre 0,05 %-0,001 %) y esta rareza ha sido una gran limitación para su estudio en el pasado. Un hallazgo importante planteado en la cita de Simmons y col., 1994 (arriba) fue la identificación de que estas MPC se podrían enriquecer a partir de células de médula ósea recién aisladas en cierta medida mediante la selección de células positivas STRO-1. En particular, la selección de células positivas STRO-1 permitió el aislamiento de las MPC (y las CFU-F resultantes) libre de progenitores hemopoyéticos contaminantes.

25

El documento WO 01/04268 (Simmons y col.) proporcionó otro avance importante en el enriquecimiento de las MPC mediante la identificación de una subpoblación dentro de esta fracción de células positivas STRO-1 que contienen MPC. En particular, el documento WO 01/04268 describe la clasificación de la población de células positivas STRO-1 en tres subconjuntos: STRO-1^{dull}, STRO-1^{intermediate} y STRO-1^{bright}. Los ensayos clonogénicos para CFU-F en las subpoblaciones clasificadas diferentes demostraron que la amplia mayoría de las MPC están presentes dentro de la fracción de STRO-1^{bright}.

30

El documento WO 2004/085630 (Gronthos y col.) describe por primera vez que las MPC están presentes en el tejido perivascular. Uno de los beneficios de este hallazgo es que amplía en gran medida el intervalo de tejidos de origen de los cuales se pueden aislar MPC o enriquecer y ya no existe una restricción eficaz de la fuente de MPC para la médula ósea. Los tejidos de los cuales se pueden aislar MPC de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente en el documento WO 2004/085630 incluyen médula ósea humana, pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado y corazón. Las MPC aisladas de tejido perivascular son positivas para el marcador de superficie celular 3G5. Por lo tanto, se pueden aislar mediante el enriquecimiento de las células que poseen el marcador 3G5 o mediante el enriquecimiento para un marcador de superficie de desarrollo temprano presente en las células perivasculares como CD146 (MUC18), VCAM-1 o mediante enriquecimiento para la expresión de nivel alto del marcador de superficie celular STRO-1.

35

Se han descrito procedimientos para propagar las MPC aisladas *in vitro* (Gronthos y col. Journal of Cell Science 116: 1827-1835, 2003). La visión generalmente aceptada, sin embargo, es que la expansión de MPC *in vitro* produce la pérdida de su naturaleza progenitora a través de la diferenciación.

40

Gronthos y col. (Blood, American Society of Hematology, EE.UU., tomo 85, n.º 4, 929-940, febrero de 1995) describen una población de células madre estromales de médula ósea adulta (BMSSC por sus siglas en inglés) o células madre mesenquimales. Las células expresan el marcador Stro-1. Las células son estimuladas por el agregado de una combinación de EGF y PDGF-BB.

45

RESUMEN DE LA INVENCION

50

55

Los presentes inventores han realizado ahora el sorprendente hallazgo de que las MPC expandidas *ex vivo* generan una subpoblación de progenie que conserva la multipotencialidad. Esta subpoblación de progenie de MPC son células Stro-1^{bri} y se denominan en la presente progenie de MPC expandidas multipotenciales (MEMP).

- 5 Los presentes inventores también han realizado el sorprendente hallazgo de que las MEMP son capaces de estimular la proliferación de células comprometidas específicas del tejido (TSCC por sus siglas en inglés) *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, las MEMP tienen un uso potencial en una amplia gama de aplicaciones terapéuticas en las que se requiere la generación o la reparación de tejidos.
- 10 En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para aumentar la generación de progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) que tienen el fenotipo Stro-1^{bri}, ALP⁻, comprendiendo el procedimiento el cultivo de células progenitoras mesenquimales STRO-1^{bright}ALP⁺ (MPC) en presencia de uno o más factores estimulantes seleccionados de entre el grupo que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D₃(1,25D), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β).

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Perfil de expresión génica de células que expresan STRO-1^{bri} o STRO-1^{dim} derivadas de MPC cultivadas. Se prepararon suspensiones de células únicas de MPC de médula ósea expandidas *ex vivo* mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Se tiñeron las células con el anticuerpo STRO-1 que después se reveló mediante incubación con IgM antimurina de cabra-isotiocianato de fluoresceína. Se preparó ARN celular total a partir de poblaciones purificadas de células que expresan STRO-1^{dim} o STRO-1^{bri}, después de la clasificación celular activada por fluorescencia (A). Utilizando el procedimiento de extracción RNAzolB y procedimientos estándar, se aisló ARN total de cada subpoblación y se utilizó como una plantilla para la síntesis de ADNc. Se evaluó la expresión de diversas transcripciones mediante amplificación por PCR utilizando un protocolo estándar tal como se describió anteriormente (Gronthos y col. Journal of Cell Science 116: 1827-1835, 2003). Los conjuntos de cebadores utilizados en el presente estudio se muestran en la tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio (B). Se evaluó la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, utilizando el software ImageQant (C).

Figura 2. Patrón de expresión inmunofenotípica de células expandidas *ex vivo* derivadas de MPC de médula ósea. Se prepararon suspensiones de células únicas de células expandidas *ex vivo* derivadas de MPC de médula ósea mediante desprendimiento de tripsina/EDTA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo STRO-1 junto con anticuerpos que identifican una amplia gama de marcadores asociados con el linaje celular. Se identificó STRO-1 utilizando IgM antimurina de cabra-isotiocianato de fluoresceína, mientras que se identificaron todos los otros marcadores utilizando IgG antirratón o anticonejo de cabra-ficoeritrina. Para los anticuerpos que identifican antígenos intracelulares, las preparaciones de células primero se marcaron con el anticuerpo STRO-1, se fijaron con etanol al 70 % frío para permeabilizar la membrana celular y después se incubaron con anticuerpos específicos del antígeno intracelulares. Se utilizaron anticuerpos de control de isotipo coincidente en condiciones idénticas. Se realizó análisis de citometría de flujo de color doble utilizando un citómetro de flujo COULTER EPICS y se recogieron los datos de modo de lista. Las gráficas de puntos representan 5.000 eventos de modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador de células de linaje (eje y) y STRO-1 (eje x). Los cuadrantes vertical y horizontal se establecieron con referencia a los anticuerpos de control negativo de isotipo coincidente.

Figura 3. Desarrollo adipogénico *in vitro*. Se generaron suspensiones de células únicas mediante digestión de tripsina/EDTA a partir de cultivos secundarios de células expandidas *ex vivo* derivadas de células de médula ósea clasificadas por STRO-1^{bri}/VCAM-1⁺. Después, se aislaron las células expandidas de acuerdo con su expresión de STRO-1 utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia de color único como se muestra en la figura 1A. Las células derivadas de MPC clasificadas por STRO-1^{bri} y STRO-1^{dim} después se colocaron en placas durante la noche, en placas de 6 pocillos, a una densidad de 1 x 10⁵ células por pocillo en un medio de cultivo regular. Al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo con medio inductivo adipogénico tal como se describe en los procedimientos. Los cultivos se alimentaron dos veces por semana a partir de entonces durante un período total de tres semanas, momento en el que se fijaron las células y se tiñeron con aceite rojo O. Se muestran ampliificaciones de potencia baja (4x) y alta (20x) que ilustran tinción de aceite rojo O de adipocitos que contienen lípidos dispersos a través de las capas estromales adheridas. Se identificaron, en promedio, 22 \pm 5 adipocitos positivos de aceite rojo O en los cultivos de STRO-1^{bri} (por área de unidad a 20x, n = 9 campos) en comparación con 7 \pm 2 adipocitos (por área de unidad a 20x, n = 9 campos) en los cultivos de STRO-1^{dim}.

55

Figura 4. Desarrollo osteogénico *in vitro*. Se generaron suspensiones de células únicas mediante digestión de tripsina/EDTA a partir de cultivos secundarios de células expandidas *ex vivo* derivadas de células de médula ósea clasificadas por STRO-1^{bri}/VCAM-1⁺. Después, se aislaron las células expandidas de acuerdo con su expresión de STRO-1 utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de color único como se muestra en la figura 1A. Las células aisladas por FACS de STRO-1^{bri} y STRO-1^{dim} después se colocaron en placas durante la noche, en placas de 48 pocillos, a una densidad de $0,3 \times 10^5$ células por pocillo en un medio de cultivo regular (cuatro réplicas por condición). Al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo con medio inductivo osteogénico tal como se describe en los procedimientos. Los cultivos se alimentaron dos veces por semana a partir de entonces durante un período total de tres semanas, momento en el que se lavaron las células y después se trataron con HCl 0,6 N para extraer el calcio dentro de los depósitos mineralizados. Se hicieron reaccionar las muestras con o-cresol-ftaleína-complexona y se leyó la reacción colorimétrica a 570 nm. La concentración de calcio absoluta se determinó de acuerdo con una curva estándar para el calcio. (A) Las mediciones de calcio mostraron que los cultivos de STRO-1^{bri} sintetizaron significativamente (*; $p < 0,05$; prueba t) más mineral en comparación con los cultivos de STRO-1^{dim}. Se fijaron los cultivos replicados y se tiñeron para tinción de rojo Alizarina y presentaron niveles típicos de depósitos mineralizados en las capas adheridas de los cultivos de STRO-1^{bri}(B) y STRO-1^{dim}(C).

Figura 5. Desarrollo condrogénico *in vitro*. Se generaron suspensiones de células únicas mediante digestión de tripsina/EDTA a partir de cultivos secundarios de células expandidas *ex vivo* derivadas de células de médula ósea clasificadas por STRO-1^{bri}/NCAM-1⁺. Después, se aislaron las células expandidas de acuerdo con su expresión de STRO-1 utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de color único como se muestra en la figura 1A. Las células aisladas por FACS de STRO-1^{bri} y STRO-1^{dim} después se sedimentaron en tubos de polipropileno a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por tubo y se cultivaron en medios inductivos condrogénicos. Los cultivos se alimentaron dos veces por semana a partir de entonces durante un período total de tres semanas. Se recuperaron los sedimentos celulares y se utilizaron para examen histológico o preparación de ARN total tal como se describe en los procedimientos. Las poblaciones celulares de STRO-1^{bri}(A) y STRO-1^{dim}(B) fueron capaces de formar sedimentos celulares que contenían células tipo condrocitos. Los análisis de RT-PCR indicaron que la población de STRO-1^{bri}(SB) demostró niveles más altos de los genes asociados con el cartílago, colágeno tipo X y agrecano en comparación con la población de células (C) STRO-1^{dim}(SD).

Figura 6. Las células STRO-1^{bri} inducen la proliferación de células STRO-1^{dim}. Se prepararon suspensiones de célula única de MPC de médula ósea expandidas *ex vivo* mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Se tiñeron las células con el anticuerpo STRO-1 y se clasificaron en poblaciones de STRO-1^{dim} o STRO-1^{bri} con expresión de poblaciones celulares cultivadas tal como se describe en la figura 1. Se marcaron las células con CFSE tal como se describe en los procedimientos. Las células no marcadas se utilizaron para establecer un control negativo (autofluorescencia). Se utilizó Colcemid® (100 ng/ml) para inhibir la división celular y proporcionó un índice de marcado de entrada (generación 0). Posteriormente, se agregaron STRO-1^{bri} no marcadas nuevamente a las células STRO-1^{dim} marcadas con CFSE en una proporción de (A) 0 células STRO-1^{bri} : 1×10^5 células STRO-1^{dim} (0 %); (B) $0,05 \times 10^5$ células STRO-1^{bri} : $0,95 \times 10^5$ células STRO-1^{dim} (5 %); (C) $0,1 \times 10^5$ células STRO-1^{bri} : $0,9 \times 10^5$ células STRO-1^{dim} (10 %); (D) $0,2 \times 10^5$ células STRO-1^{bri} : $0,8 \times 10^5$ células STRO-1^{dim} (20 %); (E) $0,5 \times 10^5$ células STRO-1^{bri} : $0,5 \times 10^5$ células STRO-1^{dim} (50 %). Las mezclas de adición se cultivaron durante un período de 7 días, se cosecharon y se analizaron mediante citometría de flujo, tal como se describe en los procedimientos. Se analizó la proliferación celular utilizando el ModFit LT para win 32 (Versión 2.0). Se descubrió que las células STRO-1^{bri} (R1) estimulaban la proliferación de las células STRO-1^{dim} de forma dependiente de la dosis.

Figura 7. Las citocinas y los agentes osteotrópicos aumentan la cantidad de células STRO-1^{bri} en cultivo. Se cultivaron los cultivos establecidos de MPC en medio basal complementado con FCS al 10 % (A), o una gama de factores, incluidos 1×10^{-8} M $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 (1,25D) (B), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) 10 ng/ml (C), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) 10 ng/ml (D); interleucina-1 β 10 ng/ml (IL-1 β) (E) y factor derivado de estroma 1-alfa (SDF-1 α) 30 ng/ml (F) durante 5 días, teñido con mAb STRO-1 y analizado tal como se describió arriba. Se descubrió que estos factores aumentan la cantidad de MPC STRO-1^{bri}. Los resultados que se muestran son un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes.

Figura 8. Ratas lampiñas atímicas se sometieron a ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) y se inyectaron 48 horas más tarde con solución salina, 1×10^6 células Stro-1^{dim} humanas, 1×10^6 células Stro-1^{bri} humanas o 1×10^6 células mononucleares de médula ósea con agotamiento de Stro-1 humano. Dos semanas después, se sacrificó a los animales y se fijaron los tejidos cardíacos y se tiñeron de forma concomitante con dos anticuerpos monoclonales: el primero fue reactivo selectivamente con antígeno Ki67 de rata, pero no de humano, y el segundo fue reactivo con el marcador de cardiomiocitos troponina I. Las células doblemente teñidas, que indican la proliferación de cardiomiocitos de rata, se detectaron mediante técnica de inmunoperoxidasa. Los animales que recibieron 1×10^6 células humanas Stro-1^{bri} presentaron

cantidades 2,5-5 veces mayores de cardiomiocitos de rata proliferantes en comparación con los animales de control que recibieron solución salina o 1×10^6 células humanas Stro-1^{dim} ($p < 0,05$).

Figura 9. Se inyectaron por vía subcutánea ratas lampiñas atímicas con células tumorales de glioblastoma de rata, que secretan VEGF de forma constitutiva. Dos semanas después, las ratas recibieron inyecciones intratumorales con solución salina, $0,5 \times 10^6$ células Stro-1^{dim} humanas o $0,5 \times 10^6$ células Stro-1^{bri} humanas. Una semana después, se sacrificaron los animales y se fijaron los tejidos tumorales y se tiñeron concomitantemente con dos anticuerpos monoclonales: el primero es reactivo con el antígeno de actina de músculo liso alfa expresado por células de músculo liso y el segundo es reactivo con el antígeno vWF expresado por células endoteliales vasculares. Las estructuras doblemente teñidas, que indican arteriolas y arterias que contienen endotelio y músculo liso, fueron detectadas mediante la técnica de inmunoperoxidasa. Los animales que recibieron $0,5 \times 10^6$ células humanas Stro-1^{bri} demostraron cantidades 3,5-8 veces mayores de arteriolas y arterias en el sitio de inyección celular en los tumores en comparación con los animales de control que recibieron solución salina o 1×10^6 células humanas Stro-1^{dim} ($p < 0,05$). No se observaron diferencias en los sitios distales del lugar donde se inyectaron las células humanas.

Figura 10. IL-1 β aumenta el potencial proliferativo de las células expandidas a partir de MPC. Se marcaron las células con CFSE tal como se describe en los procedimientos. Posteriormente, se cultivaron las células en presencia de IL-1 β 10 ng/ml durante 5 días, se tiñeron con mAb STRO-1 y ALK PHOS y se analizaron tal como se describe arriba. (A) Los cultivos no tratados (NT) y (B) tratados con IL-1 β presentan un aumento de la cantidad de células positivas STRO-1^{bri}/ALP. Este aumento en la expresión de STRO-1 está acompañado por un aumento en la proliferación celular tal como se muestra en (C) donde los cultivos no tratados se han sometido a cuatro divisiones celulares, mientras que (D) los cultivos tratados con IL-1 β presentan un aumento de la cantidad de divisiones celulares mediante el aumento de la cantidad de células osteoprogenitoras STRO-1^{bri}. Los resultados que se muestran son un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes. También se obtuvieron resultados similares 1,25D, PDGF-BB, TNF- α , IL-1 β y SDF-1 α se utilizaron para estimular las MPC.

Figura 11. IL-1 β estimula la proliferación de MPC y mejora su potencial de formación de hueso en presencia del agente osteoinductivo, dexametasona. Se sembró la progenie expandida *ex vivo* humana (A) de MPC en placas de 96 pocillos con una densidad celular de 2.000 células/pocillo y se cultivó en α -MEM-10. Se suplementaron los cultivos con IL-1 β a las concentraciones indicadas y la cantidad y la viabilidad de las células se cuantificó en d7 utilizando WST-1, tal como se describe en los procedimientos. IL-1 β a una concentración de 0,01 ng/ml aumentó significativamente la cantidad de células a $136,6 \pm 1,2$ % de cultivos de control no tratados (D, $P = 0,000003$, prueba t de Student). Se logró un efecto de meseta a concentraciones mayores que 0,1 ng/ml. Los valores representan medios \pm SEM de cultivos triplicados de cada concentración. Se sembró la progenie expandida *ex vivo* (B y C) de MPC en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 5×10^4 /pocillo por triplicado, y se cultivó en condiciones osteoinductivas, tal como se describe en los procedimientos. Se trataron las células con IL-1 β a una concentración de 10 ng/ml y los cultivos se "alimentaron" semanalmente con medio nuevo que contenía IL-1 β . Se logró la liberación de calcio libre de la matriz mediante tratamiento de las capas de células adheridas en condición ácida tal como se describe en los procedimientos. Se hicieron reaccionar las muestras con o-cresol-ftaleína-complexona y se leyó la reacción colorimétrica a 570 nm. La concentración de calcio absoluta se determinó de acuerdo con una curva estándar para el calcio. Los resultados mostraron que el depósito mineral aumentó en las células tratadas con IL-1 β (C) en comparación con las células no tratadas (B). El nivel de calcio en las células tratadas con IL-1 β fue significativamente mayor que en las células no tratadas en la semana 4 (** $P = 0,00009$, prueba t de Student) y la semana 6 (** $P = 0,00004$, prueba t de Student) (D). Los resultados que se muestran son un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes, utilizando células de estroma derivadas de tres donantes diferentes.

Figura 12. IL-1 β estimula la proliferación y MPC STRO-1^{bri}, mientras que la dexametasona induce la expresión de fosfatasa alcalina (ALP). Se sembraron cultivos establecidos de MPC humanas en una placa de 24 pocillos a una densidad celular de 3×10^4 /pocillo en medio completo suplementado con (A) nada (NT), (B) IL-1 β 10 ng/ml o (C) dexametasona 1×10^{-8} M y (D) IL-1 β 10 ng/ml y dexametasona 1×10^{-8} M. Se cultivaron las células durante 21 días tal como se describe en los procedimientos. Los resultados sugieren que la acción mitogénica de IL-1 β sirve para aumentar la cantidad de MPC STRO-1^{bri} (B), que a su vez estimula la proliferación de las células STRO-1^{dim} (véase la figura 6). Además, MPC adquiere la expresión de ALP en respuesta a FCS y el ascorbato-2-fosfato presente en el medio de cultivo que aumenta en respuesta al glucocorticosteroide, dexametasona (dex) (D). La acción combinada de IL-1 β y dex sirve para mejorar la formación ósea tal como se observa en la figura 11. Los experimentos se realizaron tres veces y se observó una tendencia similar en las MPC derivadas de tres donantes diferentes.

Figura 13. Efecto de PDGF sobre la formación ósea *in vivo*. Se cultivaron cultivos secundarios semiconfluentes de células expandidas *ex vivo*, derivadas de células de médula ósea clasificadas por STRO-1^{bri}/VCAM-1⁺ en presencia o ausencia de PDGF-BB (10 ng/ml) durante cinco días. Se generaron

suspensiones de células únicas mediante digestión de tripsina/EDTA, después se incubaron con 40 mg de partículas de hidroxipatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) para implante en ratones inmunodeprimidos tal como se describe en los procedimientos. Después de ocho semanas, se fijaron los trasplantes recolectados y se procesaron para análisis histológico. Se determinó el análisis de la nueva formación ósea utilizando el software de imagenología Scion por área superficial (20x) de tres trasplantes replicados (A). Los cultivos pretratados con PDGF-BB demostraron una formación ósea significativamente (*; $p < 0,05$; prueba t) más ectópica en comparación con los cultivos no tratados de control. Se muestran imágenes típicas que ilustran hueso ectópico teñido con hematoxilina/eosina en secciones transversales que representan trasplantes no tratados (B) y tratados con PDGF (C).

Figura 14: la progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) o STRO-1^{bri}/ ALP- MPC persiste en cultivos ex vivo de BM MPC seleccionadas por STRO-1. Se realizó inmunofluorescencia de dos colores y citometría de flujo que analizaron la expresión de STRO-1 y ALP en BM MPC seleccionadas por STRO-1 después de 4 pasajes de cultivo *ex vivo*. El histograma de gráfico de puntos representa 5×10^4 eventos recogidos como datos en modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de $< 1,0$ % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS DE LA INVENCION

20 Los presentes inventores han realizado ahora el sorprendente hallazgo de que las MPC expandidas *ex vivo* contienen una subpoblación de células que conserva la multipotencialidad. Más específicamente, los inventores han descubierto que las poblaciones expandidas derivadas de células MPC recolectadas se pueden separar en al menos dos poblaciones basándose en el nivel de expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo STRO-1 en STRO-1^{bri} y STRO-1^{dim}. Los datos funcionales presentados en la presente muestran que las células STRO-1^{bri} expandidas están

25 menos comprometidas y son más capaces de responder a factores inductivos que apoyan el desarrollo de grasa, el desarrollo de cartilago y el desarrollo de hueso. En cambio, las células STRO-1^{dim} representan una población más diferenciada e incluyen tipos de células comprometidas específicas de tejido (TSCC). Las células Stro-1^{bri} dentro de la progenie expandida se denominan en la presente progenie de MPC expandida multipotencial (MEMP).

30 Los presentes inventores también han realizado el sorprendente hallazgo de que las MEMP son capaces de estimular la proliferación de células comprometidas específicas del tejido (TSCC) *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, las MEMP tienen un uso potencial en una amplia gama de aplicaciones terapéuticas en las que se requiere la generación o la reparación de tejidos.

35 Tal como se usa en la presente, "MPC" son células progenitoras no hematopoyéticas que son capaces de formar un gran número de colonias de células multipotenciales.

"Progenie de MPC" significa células derivadas de MPC. Preferentemente, la progenie de MPC es la progenie de unidades formadoras de colonias-fibroblastos (CFU-F), que a su vez se deriva de MPC. Más preferentemente, las

40 células que se derivan de MPC o CFU-F mediante expansión o cultivo *ex vivo*. Preferentemente, el cultivo comprende más de dos, preferentemente más de tres y, más preferentemente, más de cuatro pasajes. Después del cultivo o la expansión, se prefiere que la población enriquecida comprenda al menos 5×10^6 células, más preferentemente al menos 10^7 células y, más preferentemente, al menos 10^9 células.

45 Los procedimientos para preparar poblaciones enriquecidas de MPC de los cuales se puede derivar la progenie se describen en el documento WO01/04268 y WO2004/085630. En un contexto *in vitro*, las MPC raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y, en general, estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas del tejido (TSCC). El documento WO01/04268 se refiere a recolectar dichas células de la médula ósea en niveles de pureza de entre aproximadamente el 0,1 % y el 90 %.

50 La población que comprende MPC de las cuales se deriva la progenie se puede recolectar directamente de una fuente de tejido o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido *ex vivo*.

Por ejemplo, la progenie se puede obtener de una población de MPC sustancialmente purificada recolectada, no

55 expandida, que comprende al menos aproximadamente 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95 % de células totales de la población en la cual están presentes. Este nivel se puede lograr, por ejemplo, seleccionando células que son positivas para al menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en STRO-1^{bri}, VCAM-1^{bri}, THY-1^{bri}, CD146^{bri} y STRO-2^{bri}.

La población que inicia las MPC se puede derivar de uno o más tipos de tejidos presentados en el documento WO01/04268 o WO2004/085630, a saber, médula ósea, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel, o tal vez más ampliamente de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

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

Se entenderá que, al realizar la presente invención, la separación de las células que llevan cualquier marcador superficial de célula se puede efectuar a través de una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, los procedimientos preferidos se basan en la unión de un agente de unión al marcador en cuestión seguido de una separación de los que presentan unión, ya sea unión de alto nivel o unión de bajo nivel o ausencia de unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpo, siendo preferiblemente anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales debido a la especificidad de estos últimos agentes. Se pueden utilizar anticuerpos para ambas etapas, sin embargo, también se podrían utilizar otros agentes, por lo tanto, también se pueden emplear ligandos para estos marcadores para enriquecer las células que los poseen o que carecen de estos.

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

Se prefiere que el procedimiento para aislar MPC, por ejemplo, comprenda una primera etapa que es una etapa de clasificación de fase sólida que utiliza, por ejemplo, MACS que reconoce expresión de alto nivel de STRO-1. Después, se puede continuar con una segunda etapa de clasificación, si se desea, para producir un mayor nivel de expresión de células precursoras tal como se describe en la memoria descriptiva de la patente WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría comprender el uso de dos o más marcadores.

El procedimiento para obtener MPC también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento utilizando técnicas conocidas. Por ende, el tejido se retirará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido de fuente después se separarán en una denominada suspensión de células únicas. Esta separación puede conseguirse por medios físicos y/o enzimáticos.

Una vez obtenida una población de MPC adecuada, se puede cultivar o expandir a través de cualquier medio adecuado para obtener MEMP.

Las MEMP se pueden distinguir de MPC recién recolectadas y son positivas para el marcador STRO-1^{bri} y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). En cambio, las MPC recién aisladas son positivas para STRO-1^{bri} y ALP.

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

El término "bright", cuando se usa en la presente invención, hace referencia a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca detectablemente. Aunque no se desea limitarse a una teoría, se propone que las células "bright" expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una mayor

- señal de fluorescencia cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC, como se determina por análisis de FACS, que las células no "bright" (STRO-1^{dull/dim}). Preferiblemente, las células "bright" constituyen al menos aproximadamente un 0,1 % de las células mononucleares de médula ósea más fuertemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En otras realizaciones, las células "bright" constituyen al menos aproximadamente un 0,1 %, al menos aproximadamente un 0,5 %, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 1,5 % o al menos aproximadamente un 2 % de las células mononucleares de médula ósea marcadas fuertemente contenidas en la muestra de partida.
- 5
- En consecuencia, la presente invención puede proporcionar una población de células enriquecidas en donde al menos el 10 % de la población de células total es la progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) que tiene el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP⁻.
- 10
- En una realización preferida, al menos 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la población celular enriquecida total son MEMP que tienen el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP⁻.
- 15
- En otra realización preferida, la población de células enriquecida es homogénea para MEMP que tienen el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP⁻.
- En aún otra realización preferida, las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, $\alpha 3\beta 1$.
- 20
- En aún otra realización preferida más, las MEMP no presentan actividad TERT y/o son negativas para el marcador CD18.
- 25
- En aún otra realización preferida, la población enriquecida de la presente invención además comprende células comprometidas específicas del tejido (TSCC).
- Las TSCC se consideran comprometidas con un linaje de células o tejidos particular y se caracterizan como células Stro-1^{dim}. "Comprometido" significa que las células están comprometidas con un tipo de célula o tejido particular, pero no necesariamente están diferenciadas de forma terminal. Una población de células derivadas de MPC expandidas en presencia, por ejemplo, de FCS incluirá TSCC comprometidas con diversos linajes. Por ende, una proporción de TSCC se comprometerá, por ejemplo, con hueso, una segunda proporción de TSCC se comprometerá con diferenciación de adipocitos y también habrá TSCC representativas de múltiples linajes de células o tejidos diferentes. Las TSCC tienden a comprometerse con un tipo de linaje de célula o tejido, sin embargo, pueden ser bipotenciales, es decir capaces de diferenciación adicional en uno de dos tipos de células o tejidos diferentes.
- 30
- 35
- Los ejemplos no limitantes de linajes con los que pueden estar comprometidas las TSCC 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. Otras TSCC incluyen, pero sin limitación, condrocitos, odontoblasto, productores de dentina y condrocitos y células precursoras de las siguientes: células epiteliales de pigmento retinal, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocíticas y oligodendrocíticas. Las TSCC también incluyen células precursoras que se dirigen específicamente al tejido conectivo, incluidos tejidos conectivos adiposos, areolares, óseos, cartilaginosos, elásticos y fibrosos.
- 40
- 45
- 50
- En una realización de la presente invención, la población de células enriquecida comprende TSCC que son mayoritariamente de un tipo de tejido.
- "Mayoritariamente de un tipo de tejido" significa que al menos el 20 %, más preferentemente, al menos el 30 %, más preferentemente, al menos el 40 %, más preferentemente, al menos el 50 %, más preferentemente, al menos el 60 %, más preferentemente, al menos el 70 %, más preferentemente, al menos el 80 % y más preferentemente, al menos el 90 % de todos los TSCC dentro de la población son del mismo tipo de tejido.
- 55
- Las MEMP y las TSCC dentro de la población enriquecida se pueden derivar del mismo individuo. Alternativamente, la progenie de MPC y TSCC se puede derivar de individuos diferentes (en otras palabras, la progenie de MPC y TSCC son alogénicas).
- 60

Otro hallazgo de los presentes inventores es que la presencia de la progenie de MPC tiene un efecto estimulador sobre la proliferación y la formación de tejido a través de TSCC. Esto se descubrió *in vitro* e *in vivo*. Por ende, la invención considera un procedimiento para estimular la proliferación de las TSCC o la formación de tejido o ambos mediante el cultivo conjunto con la progenie de MPC o mediante contacto con el sobrenadante de cultivo, lisados celulares o fracciones de cultivos de progenie de MPC.

Los inventores han demostrado *in vitro*, que la proliferación de las células STRO-1^{dim} aumenta cuando la proporción de MPC medidas como células STRO-1^{bri} se mantiene en un nivel del 5 % o mayor. El grado de estimulación aumenta progresivamente hasta un nivel en el cual las células Stro-1^{bri} están presentes hasta aproximadamente el 20 %. Se prevé que los estudios realizados durante períodos más largos en condiciones de cultivo diferentes de las utilizadas hasta ahora puedan mostrar que las concentraciones más altas tienen efectos beneficiosos aún mayores o que los niveles más bajos también pueden ser beneficiosos. Por lo tanto, se propone que la presencia de MPC en un 1, 2, 3 o 4 % también pueda proporcionar un beneficio.

La presente invención también puede proporcionar un procedimiento para estimular la proliferación de las TSCC mediante el cultivo conjunto de TSCC con MEMP que tienen el fenotipo Stro-1^{bri}, ALP⁻, o mediante el contacto de las TSCC con sobrenadante de cultivo, lisados celulares o fracciones derivadas de MEMP que tienen el fenotipo Stro-1^{bri}, ALP⁻.

En una realización preferida de este procedimiento, la progenie de MPC está presente en las condiciones de cultivo conjunto con TSCC en un nivel mayor que el 1 %, más preferentemente mayor que el 5 %, más preferentemente mayor que el 10 %, más preferentemente mayor que el 20 %, más preferentemente mayor que el 30 %, más preferentemente mayor que el 40 %, más preferentemente mayor que el 50 %, más preferentemente mayor que el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %.

Este procedimiento se puede aplicar igualmente a aquellas poblaciones de TSCC que normalmente no tienen progenie de MPC presente. Por ende, la progenie de MPC se puede agregar a las poblaciones de TSCC y mantener en condiciones de cultivo adecuadas durante un tiempo predeterminado. Se prevé que las cantidades de células se pueden mantener en un nivel efectivo mediante el agregado de más progenie de MPC una vez cada tanto, tal vez con el cambio de medio de cultivo en el cultivo en lote, o alternativamente todos los días, o algunos días en sistemas de cultivo continuos o en lote o puede ser autosuficiente en uno, dos, tres o más pasajes si está presente en cantidades suficientes inicialmente.

En una realización, las TSCC son células STRO-1^{dim} derivadas de una población purificada de MPC tal vez utilizando clasificación basándose en la selección de STRO-1^{bri} u otra selección mencionada anteriormente.

Se propone que la estimulación de las TSCC por la progenie de MPC se puede aplicar no solo a tipos de células mesenquimales, sino también a otros. Los datos proporcionados a la fecha sobre ARN y la expresión de marcadores de superficie celular sugieren que las TSCC representadas en la población de STRO-1^{dim} incluyen células o tejidos ectodérmicos, endodérmicos y mesodérmicos. Los tipos de células que son estimulados por la progenie de MPC no necesariamente se derivan de MPC, sino que se pueden derivar de otras fuentes.

La progenie de MPC también se puede utilizar para estimular la proliferación y/o la diferenciación de determinadas células hemopoyéticas. En una realización, dichas células hemopoyéticas son células CD34+.

Se considera, en general, que la invención tiene aplicabilidad para cultivo de células *in vitro*, es decir, con relación a cultivos expandidos *ex vivo*, sin embargo, la invención también puede tener aplicabilidad cuando las TSCC están *in situ* en un sitio de tejido corporal y una población que contiene progenie de MPC se administra al sitio.

En consecuencia, en una realización de este procedimiento, las TSCC se cultivan *in vitro*.

En otra realización de este procedimiento, las TSCC se ubican en un sitio de tejido de un sujeto *in vivo*, y la progenie de MPC, el sobrenadante de cultivo, los lisados celulares o las fracciones de la progenie de MPC se administran al sitio de tejido.

En otra realización de este procedimiento, las TSCC y la progenie de MPC son exógenas y se administran al sitio de tejido.

Alguna de estas formas de administración puede ser adecuada, sin embargo, una administración espaciada en el tiempo puede proporcionar un beneficio acelerado o mayor.

En otra realización, el procedimiento comprende someter dicha población cultivada a condiciones que sesgan la diferenciación de MPC o TSCC a un tipo de tejido específico.

En otra realización de este procedimiento, las TSCC están comprometidas con un tipo de tejido seleccionado de entre el grupo que consiste en hueso, tejido neural, grasa, cartílago, músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido epitelial, osteoblastos, tendón, ligamento odontoblasto, pericito, músculo liso, tejido glial, tejido vascular, tejido endotelial, tejido hematopoyético, tejido hepático y tejido renal.

En otra realización de este procedimiento, las TSCC son células hemopoyéticas.

En otra realización, el procedimiento además comprende someter la población de TSCC estimulada a condiciones que sesgan la diferenciación de TSCC a un tipo de tejido específico.

Se prevé que en condiciones de cultivo adecuadas, la gama de tipos de células que se pueden generar de acuerdo con este procedimiento incluyen, entre otros, los siguientes, una célula de tejido de cartílago, un condrocito, un condrocito de cartílago hialino, un condrocito de fibrocartílago, un condrocito de cartílago elástico, una célula de tejido ligamentoso, un fibroblasto, un progenitor de condrocito, un progenitor de condrocito de cartílago hialino, un progenitor de condrocito de fibrocartílago, un progenitor de condrocito de cartílago elástico, un progenitor de fibroblastos, una célula de tejido neural, una neurona, una célula glial, un progenitor de una neurona, un progenitor de una célula glial, una célula grasa, una célula de tejido adiposo, un adipocito, un adipocito marrón, un adipocito blanco, un progenitor de un adipocito blanco, un progenitor de un adipocito marrón, osteoblasto, un progenitor de un osteoblasto, un odontoblasto, un productor de dentina, condrocito, un osteocito, un progenitor de un osteocito, una célula de revestimiento óseo, un progenitor de una célula de revestimiento óseo, una célula vascular, un progenitor de una célula vascular, una célula de tendón, una célula de estroma de médula, células de estroma de apoyo osteoclástico y hemopoyético, una célula de músculo cardíaco, un progenitor de una célula de músculo cardíaco, una célula de músculo liso, una célula de músculo esquelético, un pericito, una célula endotelial, un progenitor de una célula endotelial, una célula epitelial, un progenitor de una célula epitelial, un astrocito o una célula oligodendrocítica.

Los presentes inventores también han diseñado condiciones de cultivo para aumentar la generación de MEMP. Las condiciones de cultivo anteriores no permitían la expansión preferencial de MEMP. De hecho, en las condiciones de cultivo anteriores, la proporción de MEMP disminuyó típicamente con el tiempo debido a su diferenciación en TSCC Stro-1^{dim}.

En consecuencia, la presente invención también proporciona un procedimiento para enriquecer las MEMP que tienen el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP⁻, comprendiendo el procedimiento el cultivo de células progenitoras mesenquimales STRO-1^{bright}ALP⁺ (MPC) en presencia de uno o más factores estimulantes seleccionados de entre el grupo que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D₃(1,25D), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) y factor derivado del estroma 1 α (SDF-1 α).

El o los factores estimulantes pueden incluir PDGF y/o IL-1 β .

En otra realización de este procedimiento de la invención, las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ del mismo se cultivan en presencia de dos o más factores estimulantes.

La estimulación de la proliferación se puede aplicar a una población de MPC sustancialmente purificada recolectada, no expandida, que comprende al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95 % de células totales de la población en la cual están presentes. El efecto de la estimulación de la proliferación puede ser limitar el grado en el cual las MPC se diferencian en el cultivo *ex vivo*.

En otra realización de este procedimiento de la invención, las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ del mismo se han expandido *ex vivo*.

En otra realización de este procedimiento de la invención, las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ son una población no expandida de MPC aisladas.

La estimulación puede dar lugar a un aumento de la progenie de MPC que tiene el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP de más del 10 %, preferentemente más del 20 %, preferentemente más del 40 %, preferentemente más del 50 % con respecto a los controles no estimulados.

5 En otra realización de este procedimiento de la invención, las MPC utilizadas para cultivo o expansión se derivan de uno o más tejidos que consisten en el grupo que comprende médula ósea, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel, o tal vez más ampliamente de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

10

En otra realización de este procedimiento de la invención, las MPC o la progenie de las mismas se cultivan o se expanden en presencia de uno o más factores estimulantes *in vivo*.

Se entenderá a partir de lo anterior que la invención tiene aplicabilidad a la proliferación *in vitro* de MPC, sin embargo, se puede aplicar igualmente a la proliferación *in situ in vivo*. Por ende, el factor estimulante de MPC se puede administrar directamente a una lesión donde, por ejemplo, sea deseable estimular la proliferación de las MPC residentes, por lo tanto, el factor estimulante de MPC se puede administrar solo o alternativamente combinado con una población que comprende MPC. Esto último se puede considerar preferible porque la cantidad de MPC en los tejidos generalmente es muy baja y, además, se considera que es probable que el efecto beneficioso de la generación de tejido mesenquimal adecuado aumente a causa de la presencia de una mayor cantidad de MPC.

20

En otra realización, el procedimiento comprende además administrar TSCC exógenas.

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

25

el cultivo de una población de células que comprenden MPC o progenie de las mismas y TSCC en presencia de uno o más factores estimulantes seleccionados de entre el grupo que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D₃(1,25D), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) y factor derivado del estroma 1 α (SDF-1 α); y

30

someter dicha población cultivada a condiciones que sesgan la diferenciación de MPC o TSCC a un tipo de tejido específico.

En una realización de este procedimiento, se selecciona el tipo de tejido de entre el grupo consistente en músculo cardíaco, tejido vascular, tejido óseo, tejido neural, músculo liso y tejido endotelial.

35

También se entenderá que la invención abarca una composición que comprende progenie de MPC y un factor estimulante. Tal composición es probable que sea terapéuticamente beneficiosa y por tanto se preparará en una forma farmacéuticamente aceptable. La composición podría comprender una población enriquecida o purificada de progenie de MPC y uno o más factores estimulantes.

40

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

En el contexto de la administración *in vivo*, también puede resultar deseable administrar al mismo tiempo en la composición TSCC. Por ejemplo, en el caso de una lesión en un hueso o una región del mismo, un músculo cardíaco o una región del mismo, un tejido vascular o una región del mismo o una región que comprende una o más células endoteliales, la TSCC que se administra, preferentemente, está al menos parcialmente comprometida con un tipo de célula pertinente (p. ej., un osteoblasto, un cardiomiocito o una célula endotelial). Estas se pueden proporcionar como parte de un cultivo de TSCC mezclado o de forma más purificada, por ejemplo, clasificadas para marcadores que se sabe que están presentes en el tipo de célula comprometida específica de tejido. Además, o alternativamente, la composición que se administra puede incluir uno o más factores estimulantes de diferenciación para diferenciar las MPC que están presentes en la composición o presentes en el sitio diana a uno o más tipos de tejido de interés.

50

Los factores que sesgan la diferenciación de TSCC o MPC a tipos de tejido específicos se describen en los ejemplos que se proporcionan en la presente invención. Las condiciones que sesgan la diferenciación de las MPC o las 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 BM humana a desarrollar una matriz ósea mineralizada *in vitro* (Gronthos y col., Blood. 84:4164-73, 1994).

60

Las condiciones adecuadas para diferenciar las TSCC en osteoblastos pueden implicar cultivar las TSCC en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, osteocalcina u osteonectina. En un ejemplo particular, se cultivan las TSCC en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno y fibrina. En un ejemplo alternativo, se cultivan las TSCC en presencia de colágeno de tipo I, fibrinógeno, fibrina, osteocalcina y osteonectina.

5 En el contexto de este procedimiento, pueden usarse colágeno de 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 invención cualquier combinación de los compuestos enumerados anteriormente en este párrafo.

10 A lo largo de esta invención, la palabra "comprender", o variaciones de la misma tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implicará la inclusión de un elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

Como será evidente, las funciones y características preferidas de un aspecto de la invención se aplican a muchos otros aspectos de la invención.

Producción de células modificadas genéticamente

En una realización, la presente invención puede proporcionar una progenie de células precursoras mesenquimales (MPC) modificadas genéticamente aisladas que tienen el fenotipo STRO-1^{br/>bri}, ALP⁺: Preferiblemente, las MEMP 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.

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 técnica, p.ej. congeladas en nitrógeno líquido.

30 Modificación genética como se usa en la presente invención abarca cualquier procedimiento de modificación genética que implique la introducción de un polinucleótido exógeno o extraño en una MEMP o un precursor de MEMP (p. ej., una MPC) o la modificación de un gen endógeno dentro de una MEMP o un precursor de MEMP. La modificación genética incluye, pero sin limitación, transducción (transferencia mediada por virus de ADN hospedador desde un hospedador o donante a un receptor, *in vitro* o *in vivo*), transfección (transformación de células con genomas de ADN vírico aislados), transferencia mediada por liposoma, electroporación, transfección con fosfato de calcio o coprecipitación y otras. Los procedimientos de transducción incluyen el cocultivo directo de células con células productoras (Bregni y col., Blood 80:1418-1422, 1992) o el cultivo con sobrenadante vírico solo con o sin factores de crecimiento y policaciones apropiados (Xu y col., Exp. Hemat. 22:223-230, 1994).

40 Un polinucleótido codificante de un polipéptido heterólogo se induce preferentemente a una célula hospedadora en un vector. El vector incluye preferiblemente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Los procedimientos usados para construir tales vectores son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen con detalle las técnicas para construir vectores de expresión adecuados en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (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 recombinantes usados típicamente 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 técnica. 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.

55 Los vectores preferidos incluyen vectores retrovíricos (véase Coffin y col., "Retroviruses", capítulo 9, pág. 437-473, Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1997). Los vectores útiles en la invención pueden producirse recombinantemente mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los documentos WO94/29438, WO97/21824 y WO97/21825 describen la construcción de plásmidos de empaquetamiento retrovírico y líneas celulares de empaquetamiento. Los vectores ejemplares incluyen los vectores de expresión de mamífero pCMV, tales como pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp.), pSFFV-Neo y pBluescript-Sk+. Son ejemplos no limitantes de vectores

retrovíricos útiles aquellos derivados de retrovirus de murino, ave o primate. Los vectores retrovíricos comunes incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (vector MoMLV). Otros vectores derivados de MoMLV incluyen, Lmily, LINGFER, MINGFR y MINT (Chang y col., Blood 92:1-11, 1998). Los vectores adicionales incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia de gibón (GALV por sus siglas en inglés) y virus de sarcoma murino de Moloney (MOMSV por sus siglas en inglés) y el virus formador de focos en bazo (SFFV por sus siglas en inglés). Los vectores derivados del virus de célula madre murina (MESV) incluyen MESV-MiLy (Agarwal y col., J. of Virology, 72:3720-3728, 1998). Los vectores retrovíricos incluyen también vectores basados en lentivirus, y los ejemplos no limitantes incluyen vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).

- 5
- 10 En la producción de constructos de vector retrovílico, pueden retirarse las secuencias gag, pol y env víricas del virus, creando espacio para la inserción de secuencias de ADN extraño. Los genes codificados por ADN extraño se expresan habitualmente bajo el control de un promotor vírico fuerte en la repetición terminal larga (LTR). La selección de las secuencias reguladoras de control apropiadas depende de la célula hospedadora usada y la selección está dentro de las habilidades del especialista en la técnica. Son conocidos numerosos promotores además del promotor de la LTR.
- 15 Los ejemplos no limitantes incluyen el promotor del fago lambda PL, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV por sus siglas en inglés), el promotor de la región U3 del virus de sarcoma murino de Moloney (MMSV por sus siglas en inglés), virus de sarcoma de Rous (RSV por sus siglas en inglés) 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
- 20 especialistas en la técnica.

- 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 constructor de vector en la célula de empaquetamiento, las proteínas gag-pol y env producidas por la célula se ensamblan con el ARN de vector
- 25 produciendo viriones infecciosos que se secretan al medio de cultivo. El virus así producido puede infectar e integrarse en el ADN de la célula diana, pero no produce partículas víricas infecciosas puesto que carece de secuencias de empaquetamiento esenciales. La mayoría de las líneas celulares de empaquetamiento actualmente en uso se han transfectado con plásmidos separados, conteniendo cada uno una de las secuencias de codificación necesarias, de modo que son necesarios múltiples eventos de recombinación antes de poder producir un virus competente de
- 30 replicación. Como alternativa, la línea celular de empaquetamiento alberga un provirus. El provirus se ha incapacitado de modo que, aunque puede producir todas las proteínas requeridas para ensamblar virus infecciosos, su propio ARN no puede empaquetarse en virus. En cambio, se empaqueta el ARN producido a partir del virus recombinante. Por lo tanto, la solución madre de virus liberada de las células de empaquetamiento contiene solo virus recombinantes. Los ejemplos no limitantes de líneas de empaquetamiento retrovíricas incluyen PA12, PA317, PE501, PG13, PSI.CRIP,
- 35 RDI 14, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6) y PT67. Se hace referencia a Miller y col., Mol. Cell Biol. 6:2895, 1986; Miller y col., Biotechniques 7:980, 1989; Danos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460, 1988; Pear y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8392-8396, 1993; y Finer y col., Blood 83:43-50, 1994.

- Otros vectores adecuados incluyen vectores adenovíricos (véase, Frey y col., Blood 91:2781, 1998; y WO 95/27071)
- 40 y vectores víricos adenoasociados. Estos vectores son conocidos en la técnica, p. ej., tal como se describe en Chatterjee y col., Current Topics in Microbiol. And Immunol., 218:61-73, 1996; Stem cell Biology and Gene Therapy, eds. Quesenberry y col., John Wiley & Sons, 1998; y las patentes estadounidenses n. ° 5.693.531 y 5.691.176. El uso de vectores derivados de adenovirus puede ser ventajoso en ciertas situaciones, porque no son capaces de infectar células no en división. Al contrario que el ADN retrovílico, el ADN adenovílico no se integra en el genoma de la célula
- 45 diana. Además, la capacidad de portar ADN extraño es mucho mayor en vectores adenovíricos que vectores retrovíricos. Los vectores víricos adenoasociados son otro sistema de suministro útil. El ADN de este virus puede integrarse en células no en división y se han introducido exitosamente una serie de polinucleótidos en diferentes tipos celulares usando vectores víricos adenoasociados.

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

- Puede incluirse un marcador selectivo en el constructo o vector con fines de monitorizar la modificación genética
- 55 exitosa y para la selección de células en que se ha integrado el ADN. Los ejemplos no limitantes incluyen marcadores de resistencia a fármacos, tales como G148 o higromicina. Puede usarse selección negativa adicionalmente, por ejemplo, donde el marcador es el gen HSV-tk. Este gen hará a las células sensibles a agentes tales como aciclovir y ganciclovir. El gen NeoR (resistencia a neomicina/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
- 60 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(lyt) de murino, genes bacterianos que confieren resistencia a puromicina o fleomicina y β -galactosidasa.

5 Las secuencias de polinucleótidos adicionales pueden introducirse en la célula hospedadora en el mismo vector que la secuencia de polinucleótidos codificante de la proteína heteróloga o la secuencia de polinucleótidos adicional puede introducirse en las células hospedadoras en un segundo vector. En una realización preferida, se incluirá un marcador selectivo en el mismo vector que el polinucleótido codificante de la proteína heteróloga.

10 La presente invención 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 MEMP de tipo silvestre.

Administración de factores estimulantes

15 Los procedimientos de la presente invención pueden comprender la administración de uno o más factores estimulantes a un sujeto para enriquecer las MEMP *in situ*.

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

25 En una realización particular, la invención proporciona un procedimiento para enriquecer las MEMP en un sujeto que lo necesita mediante la administración de un factor estimulante de forma sistémica al sujeto. Por ejemplo, el factor estimulante se puede administrar mediante inyección subcutánea o intramuscular.

30 Esta realización de la invención puede ser útil para el tratamiento de enfermedades degenerativas sistémicas en las que se desea el enriquecimiento de las MEMP en tejidos particulares. Algunos ejemplos de enfermedades degenerativas sistémicas que se pueden tratar de este modo incluyen osteoporosis o fracturas, enfermedades degenerativas de cartílago, aterosclerosis, enfermedades de la arteria periférica o enfermedades cardiovasculares y similares.

35 Por ende, de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar factores estimulantes en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva para tratar enfermedades o trastornos seleccionados de entre el grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, inflamación crónica aguda, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas y trastornos inflamatorios como artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, enfermedad pélvica inflamatoria crónica, esclerosis múltiple, asma, osteoartritis, aterosclerosis, psoriasis, rinitis, autoinmunidad y rechazo de trasplante de órganos. En un ejemplo, dichas composiciones incluyen uno o más factores estimulantes en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva suficiente para utilizarse para ayudar a estimular la producción de células específicas de tejido.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el enriquecimiento de las MEMP.

45 Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, tal como prevenir o inhibir la muerte de las MPC o la progenie derivada de estas.

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

55 La cantidad de factor estimulante en la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de

dosificación por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de unidad de dosificación" como se usa en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias a los sujetos para tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

5

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

10 Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye todos y cada uno los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. En una realización, el portador es adecuado para administración parenteral. Como alternativa, el portador puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o 15 dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que un medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

20 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral pueden incluir liposomas. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro o portadores que son especialmente útiles para fármacos hidrófobos. Dependiendo de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales de estabilización de proteína. Además, puede administrarse el fármaco en un sistema de suministro de fármaco orientado, por ejemplo, en un liposoma recubierto con anticuerpo específico de diana. Los liposomas se unirán 25 a la proteína diana y se captarán selectivamente por la célula que exprese la proteína diana.

Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de 30 dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción 35 prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, el factor estimulante puede administrarse en una formulación de liberación con el tiempo, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro 40 microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico-poliglicólico (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los especialistas en la técnica.

45 Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de factores estimulantes en forma de suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácido graso sintético tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se usan para inyección pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también 50 estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante incorporación del compuesto activo, en la cantidad requerida, al disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente enumerados, según 55 sea necesario, seguida de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que procuran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución previamente esterilizada por

filtración del mismo. De acuerdo con un aspecto alternativo de la invención, el factor estimulante puede formularse con uno o más compuestos adicionales que potencien su solubilidad.

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

Administración de composiciones celulares de la presente invención

Las composiciones celulares de la presente invención que comprenden MEMP y/o TSCC pueden ser 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.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para soportar las MEMP 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 la proteína expresada y células diferenciadas 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 MEMP. Este fenómeno acelera la regeneración de tejido al potenciar la deposición de matriz. Las proteínas de matriz pueden expresarse también en células genomanipuladas y potenciar el injerto y adhesión de las células trasplantadas en el área de trasplante.

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

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

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

- Las composiciones celulares de la invención pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas (factores de crecimiento, factores tróficos) beneficiosos. Cuando se administran las MEMP 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).
- 5 Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (p.ej., EPO, mimeticuerpos de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (p.ej., inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMÚS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; p.ej., TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (p.ej., inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina, tacrolimús;
- 10 inhibidores de mTOR (p.ej., SIROLIMÚS, EVEROLIMÚS); antiproliferativos (p.ej., azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (p.ej., prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (p.ej., basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (p.ej., anti-globulina de timocito (ATG); anti-globulina de linfocito (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (p.ej., heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPACK (dextrofenilalanina, prolina, arginina,
- 15 clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptor de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (p.ej., probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutation, 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 EE. UU. n. ° 5.827.735.
- 20 En una realización, se administran las composiciones celulares de la invención en forma de células indiferenciadas, es decir, como se cultivan en medio de crecimiento. Como alternativa, las composiciones celulares pueden administrarse después de exposición en cultivo a condiciones que estimulen la diferenciación hacia un fenotipo deseado, por ejemplo, un fenotipo osteogénico.
- 25 Las composiciones celulares de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, suministrarse (p. ej., mediante un catéter o jeringa) o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio que necesita reparación o acrecentamiento. Las células pueden administrarse mediante una matriz (p.ej., un andamiaje tridimensional). Las células pueden administrarse con portadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Las vías de
- 30 administración de las células de la invención o composiciones o componentes (p.ej., MEC, lisado celular, medio acondicionado) de las mismas incluyen administración intramuscular, oftálmica, parenteral (incluyendo intravenosa), intraarterial, subcutánea, oral y nasal. Las vías particulares de administración parenteral incluyen, pero sin limitación, las vías de administración intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o periespinal.
- 35 Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una localización precisa del cuerpo es típicamente un medio adecuado de administración. Las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, sin embargo, pueden administrarse en una localización más general (p.ej., a lo largo de un área afectada difusamente, por ejemplo) de la cual migran a una localización particular, p.ej. respondiendo a señales químicas.
- 40 Otras realizaciones abarcan procedimientos de tratamiento mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares (p.ej., lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (p.ej., matriz extracelular, factores tróficos y otros biológicos producidos mediante modificación genética).
- 45 Las formas y regímenes de dosificación para administrar las composiciones celulares descritas en la presente memoria se desarrollan de acuerdo con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la afección del paciente individual, p.ej. la naturaleza y extensión de la afección que se esté tratando, la edad, sexo, peso corporal y estado médico general, y otros factores conocidos por los facultativos médicos. Por tanto, se determina la cantidad efectiva de una composición farmacéutica para administrar a un paciente mediante estas consideraciones como es conocido en la técnica.
- 50 En algunas realizaciones de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir un paciente previamente al inicio de la terapia con composiciones celulares de la presente invención. Por consiguiente, el trasplante con MEMP alogénicas, o incluso xenogénicas, puede tolerarse en algunos aspectos.
- 55 Sin embargo, en otros aspectos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente un paciente previamente al inicio de la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse suministrando las células en un dispositivo encapsulado. Las MEMP pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y a factores terapéuticos, pero la célula es impermeable a factores humorales inmunitarios y células. Preferiblemente, el
- 60 encapsulante es hipoalergénico, se sitúa fácil y establemente en un tejido diana y proporciona una protección añadida

a la estructura implantada. Son conocidos en la materia estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria ante las células trasplantadas. Como alternativa, las MEMP pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

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

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

Las composiciones celulares de la invención pueden incluir uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero sin limitación, un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia celular tal como un inhibidor de caspasa, un agente antiinflamatorio tal como inhibidor de cinasa p38 o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Algunos ejemplos de factores bioactivos incluyen PDGF-bb, EGF, bFGF, IGF-1 y LIF.

Como alternativa, las MEMP para trasplantar pueden genomanipularse para expresar tales factores de crecimiento, antioxidantes, agentes antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios o factores angiogénicos.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de MEMP, matriz extracelular o lisado celular de las mismas, o medio acondicionado de las mismas en un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables para las células de la invención incluyen sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas adecuadas que no reaccionan nocivamente con las células de la

30 invención o composiciones o componentes de las mismas. En la medida en que sean biocompatibles, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (tal como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácido graso, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión

35 osmótica, tampones y colorantes. Los portadores farmacéuticos adecuados para uso en la presente invención son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17^a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa.) y el documento WO 96/05309.

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

45 En una realización no limitante, se prepara una formulación que comprende las células de la invención para administración directamente al sitio donde se desea la producción de nuevo tejido, tal como tejido óseo. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las MEMP pueden suspenderse en una solución de hidrogel para inyección. Los ejemplos de hidrogeles adecuados para uso en la invención incluyen péptidos autoensamblantes tales como RAD16. Como alternativa, la solución de hidrogel que contiene las células puede dejarse endurecer, por ejemplo, en un molde,

50 formando una matriz que tiene células dispersadas en la misma previamente a la implantación. O, una vez se endurece la matriz, pueden cultivarse las formaciones celulares de modo que las células se expandan mitóticamente previamente a la implantación. El hidrogel es un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno creando una estructura de rejilla abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua formando un gel. Los ejemplos de materiales que pueden usarse para formar un hidrogel incluyen

55 polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazina y poliácridatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el soporte para la MPC o la progenie derivada de las mismas es biodegradable.

En algunas realizaciones de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ* tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2002/0022676; Anseth y col., J. Control Release, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang y col., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003).

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

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

- El alginato puede reticularse iónicamente con cationes divalentes en agua, a temperatura ambiente, formando una
- 20 matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones suaves, el alginato ha sido el polímero más comúnmente usado para encapsulación de células de hibridoma, como se describe por ejemplo en la patente de EE.UU. n. ° 4.352.883 de Lim. En el proceso de Lim, se suspende una solución acuosa que contiene los materiales biológicos para encapsular en una solución de un polímero hidrosoluble, se conforma la suspensión en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes y se reticula entonces la superficie de las microcápsulas con
- 25 poliaminoácidos, formando una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

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

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

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

- La hidrólisis de la cadena lateral da como resultado la erosión del polímero. Son ejemplos de cadenas laterales hidrolizantes imidazoles no sustituidos y sustituidos y ésteres de aminoácido en que el grupo está unido al átomo de
- 45 fósforo a través de una ligadura amino (los polímeros de polifosfazeno en que ambos grupos R están enlazados de esta manera son conocidos como poliaminofosfazenos). Para los poliimidazolfosfazenos, algunos de los grupos "R" en el esqueleto de polifosfazeno son anillos de imidazol, enlazados con el fósforo en el esqueleto a través de un átomo de nitrógeno de anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no participan en la hidrólisis, tales como grupos metilfenoxi u otros grupos mostrados en el artículo científico de Allcock y col., Macromolecule 10:824 (1977).
- 50 Son conocidos en la materia procedimientos de síntesis de los materiales de hidrogel, así como procedimientos para preparar tales hidrogeles.

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

Formulación de un parche de tejido óseo

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

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

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

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

30 Las células pueden formar un tapón cohesivo de células. El tapón cohesivo de células puede retirarse del pocillo e implantarse quirúrgicamente en el defecto de tejido. Se prevé que MPC no diferenciadas o la progenie derivada de estas se puede diferenciar *in situ* de este modo para formar tejido *in vivo*.

35 Los defectos óseos pueden identificarse por inferencia usando tomografía informatizada (exploración por TAC); examen de rayos X, imagenología de resonancia magnética (IRM), análisis de fluido sinovial o marcadores séricos o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la materia. Los defectos en mamíferos son también fácilmente identificables visualmente durante el examen artroscópico o durante la cirugía abierta de la articulación. El tratamiento de los defectos puede efectuarse durante un procedimiento artroscópico o quirúrgico abierto usando los
40 procedimientos y composiciones divulgados en la presente memoria.

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

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

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

Trasplante de MEMP usando andamiajes

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

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el andamiaje puede diseñarse de tal modo que la estructura de andamiaje: (1) soporte las células sembradas sin degradación posterior; (2) soporte las células desde el momento de la siembra hasta que se remodela el trasplante de tejido por el tejido hospedador; (2) permita adherirse a las células sembradas, proliferar y desarrollarse hasta una estructura de tejido que tenga suficiente integridad mecánica para soportarse a sí misma *in vitro*, en cuyo punto se degrada el andamiaje. Se proporciona una revisión del diseño de andamiaje por Hutmacher, J. *Biomat. Sci. Polymer Edn.*, 12(1):107-124 (2001).

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

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

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

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

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

El armazón tridimensional puede estar compuesto por materiales cerámicos incluyendo, pero sin limitación, fosfato de mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri y tetra-calcio, hidroxapatito, fluoroapatitos, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de magnesio y calcio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS (Universidad de Florida, Gainesville, Fla.) y mezclas de los mismos. Existe una serie de materiales cerámicos biocompatibles porosos adecuados actualmente disponibles en el mercado comercial tales como SURGIBON (Unilab Surgibone, Inc., Canadá), ENDOBON (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS (Mathys, A. G., Bettlach, Suiza) e INTERPORE (Interpore, Irvine, Calif., Estados Unidos), y productos de injerto óseo de colágeno mineralizado tales como HEALOS (Orquest, Inc., Mountain View, Calif.) y VITOSS, RHAKOSS, y CORTOSS (Orthovita, Malvern, Pa.). El armazón puede ser una mezcla, combinación o material compuesto de materiales naturales y/o sintéticos. En algunas realizaciones, el andamiaje está en forma de una jaula. En una realización preferida, el andamiaje está recubierto con colágeno.

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

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

En otra realización preferida, se siembran las células sobre un armazón que comprende un dispositivo protésico para implantación en un paciente, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.200.606. Como se describe en la misma, se han desarrollado una variedad de dispositivos protésicos clínicamente útiles para uso en procedimientos de injerto de hueso y cartílago (véase, p.ej. Bone Grafts and Bone Substitutions. Ed. M. B. Habal & A. H. Reddi, W. B. Saunders Co., 1992). Por ejemplo, se han usado y continúan usándose ampliamente en el entorno clínico dispositivos de reemplazo de rodilla y cadera efectivos. Muchos de estos dispositivos se fabrican usando una variedad de materiales inorgánicos que tienen baja actividad inmunogénica, que funcionan con seguridad en el cuerpo. Los ejemplos de materiales sintéticos que se han intentado y probado incluyen aleaciones de titanio, fosfato de calcio, hidroxiapatito cerámico y una variedad de aleaciones de acero inoxidable y cobalto-cromo. Estos materiales proporcionan soporte estructural y pueden formar un andamiaje en que pueden ocurrir vascularización del hospedador y migración celular.

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

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

En algunas realizaciones, el andamiaje comprende o se trata con materiales que lo vuelven no trombogénico. Estos tratamientos y materiales pueden promover y mantener también el crecimiento endotelial, migración y deposición en matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitación, materiales naturales tales como proteínas de membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). Estos materiales pueden tratarse además para volver el andamiaje no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes antitrombóticos tales como heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material tales como recubrimiento plasmático.

En algunas realizaciones, la superficie del andamiaje está texturada. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, el andamiaje se proporciona con un patrón de surcos y rebordes. Los surcos son preferiblemente menores de aproximadamente 500 micrómetros, más preferiblemente menores de aproximadamente 100 micrómetros y lo más preferiblemente entre aproximadamente 10 nanómetros y 10 micrómetros. Tales "microsurcos" permiten a las células alinearse y/o migrar guiadas por los surcos de superficie.

En algunas realizaciones, es importante recrear en cultivo el microentorno celular encontrado *in vivo*, de tal modo que puede variar la medida en que las células de la invención crecen antes de la implantación *in vivo* o el uso *in vitro*. Además, pueden añadirse al medio de cultivo factores de crecimiento, agentes inductores de la diferenciación condrogénica, agentes inductores osteogénicos y factores angiogénicos previamente, durante o después de la inoculación de las células para desencadenar la diferenciación y formación de tejido por las MPC o la progenie derivada de estas o los cocultivos de las mismas.

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

Usos terapéuticos para la matriz extracelular o los lisados celulares

Como alternativa para implantar las células de la invención, o el tejido vivo producido a partir de estas, un sujeto que necesita reparación, reemplazo o acrecentamiento de tejidos se puede beneficiar de la administración de un componente o producto de MEMP (en particular cuando se han modificado genéticamente), tal como la matriz extracelular (ECM) o el lisado celular producido por estas células.

En algunas realizaciones, después de que las MEMP se han cultivado *in vitro*, tal como, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de andamiaje tridimensional descrito en la presente, de modo que una cantidad deseada de ECM se

secrete en el almacén. Una vez que ECM se secreta en el almacén, las células se pueden eliminar. La ECM se puede procesar para su uso posterior, por ejemplo, como una preparación inyectable.

5 En algunas realizaciones, las células se destruyen y los residuos celulares (p. ej., las membranas celulares) se eliminan del almacén. Este proceso se puede realizar de diferentes formas. Por ejemplo, el tejido vivo puede congelarse rápidamente en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril para que las células estallen en respuesta a la presión osmótica. Una vez que las células han sido destruidas, se pueden alterar las membranas celulares y se pueden eliminar los residuos celulares mediante el tratamiento con un enjuague con detergente suave, como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Una ventaja de usar un enjuague de
10 detergente suave es que solubiliza las proteínas ligadas a la membrana, que suelen ser altamente antigénicas.

Alternativamente, el tejido se puede digerir enzimáticamente y/o extraer con reactivos que descomponen las membranas celulares. Algunos ejemplos de dichas enzimas incluyen, entre otros, la hialuronidasa, la dispasa, las proteasas y las nucleasas (por ejemplo, la desoxirribonucleasa y la ribonucleasa). Algunos ejemplos de detergentes
15 incluyen detergentes no iónicos como, por ejemplo, alcohol de poliéter alquilarílico (TRITON™ X-100), octilfenoxi polietoxietanol (Rohm and Haas Philadelphia, Pa.), BRIJ-35, un polietoxietanol lauril éter (Atlas Chemical Co., San Diego, Calif.), polisorbato 20 (TWEEN 20™), un monolaureato de sorbitán polietoxietanol (Rohm and Haas), polietileno lauril éter (Rohm and Haas); y detergentes iónicos como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen 7 a 22 átomos de carbono en una
20 cadena ramificada o no ramificada.

Los andamiajes que comprenden la ECM se pueden utilizar terapéuticamente tal como se describe arriba. Alternativamente, ECM se puede recolectar del andamiaje. La recolección de la ECM se puede lograr de diversas maneras, dependiendo, por ejemplo, de si el andamiaje es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si el
25 almacén es no biodegradable, la ECM se puede retirar sometiendo el almacén a sonicación, chorros de agua a presión alta, raspado mecánico o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de los anteriores.

Si el almacén es biodegradable, la ECM se puede recolectar, por ejemplo, dejando que el almacén se degrade o se disuelva en solución. Alternativamente, si el almacén biodegradable está compuesto por un material que se puede
30 inyectar junto con la ECM, el almacén y la ECM se pueden procesar en su totalidad para la inyección posterior. Alternativamente, la ECM se puede retirar del almacén biodegradable a través de cualquiera de los procedimientos descritos arriba para la recolección de ECM a partir de un almacén no biodegradable. Todos los procesos de recolección se diseñan preferentemente para no desnaturalizar el ECM o el lisado celular producido por las células de la invención.
35

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

40 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Sujetos, cultivo celular y anticuerpos.

Se obtuvieron aspirados de BM de la cresta ilíaca posterior de voluntarios adultos normales (20-35 años) según el consentimiento informado, de acuerdo con los procedimientos aprobados por el comité de ética del Royal Adelaide
45 Hospital, Australia Meridional. Se obtuvieron células mononucleares de médula ósea (BMMNC) mediante centrifugado en Ficoll 1,077 g/ml (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Noruega) a 400 g durante 30 minutos (min) y después se lavaron y se resuspendieron con solución salina amortiguada de Hank que contenía albúmina de suero bovino al 1 % y HEPES 10 mM, pH 7,35 (HBSS). Se establecieron cultivos de BMSSC primarios en α -MEM suplementado con suero fetal de ternero al 20 % y 100 μ ML-ascorbato-2-fosfato como se describió anteriormente (Gronthos and Simmons, Blood
50 85(4):929-940, 1995) para los ensayos de eficiencia de colonia, RT-PCR, inmunohistoquímica y estudios de desarrollo. Se generaron líneas celulares clonales de BMSSC mediante limitación de la dilución a partir de colonias de día 14 derivadas de células clasificadas STRO-1^{br/>/}VCAM-1⁺ como se describe abajo, después del subcultivo en medio repleto de suero para la proliferación, RT-PCR, inmunohistoquímica y estudios de desarrollo.

55 El anticuerpo STRO-1 está disponible a nivel comercial de R&D Systems (Minneapolis, EUA). Otros anticuerpos útiles en la presente invención se presentan en la tabla 1.

Clasificación celular activada por magnetismo (MACS).

Esto se realizó como se describió anteriormente (Gronthos y col., Isolation, Purification and In Vitro Manipulation of Human Bone Marrow Stromal Precursor Cells. En Marrow Stromal Cell Culture. Owen M. y Beresford J.N. (eds). Cambridge University Press UK, capítulo 3, págs. 26-42, 1998; Gronthos and Simmons, Blood 85(4): 929-940, 1995). Se incubaron aproximadamente 1×10^8 BMMNC con sobrenadante de STRO-1 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 60 min sobre hielo. Las células marcadas con STRO-1 se lavaron con HBSS y se resuspendieron en 1 ml de HBSS que contenía una dilución 1/50 de IgM antirratón de cabra biotinilada (específico de cadena μ ; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) o IgG antirratón de cabra biotinilada (específico de cadena γ ; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) durante 45 min en hielo, respectivamente. Después de esto, se lavaron las células dos veces en amortiguador MACS (Ca^{2+} de fuerza única y PBS libre de Mn^{2+} suplementado con BSA al 1 %, EDTA 5 mM y azida de sodio al 0,01 %) y se resuspendieron en 900 μl de amortiguador MACS al cual se le agregaron 100 μl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, F.R.G.). Se incubaron adicionalmente las células durante 15 min sobre hielo y después de esto se agregó directamente conjugado de estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1/50; Caltag Laboratories, San Francisco, CA) a la suspensión durante otros 5 min. Se separaron las células en una columna magnética Mini MACS (capacidad de la columna 10^7 células, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

Clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Se marcaron las células aisladas por MACS STRO-1⁺ con FITC conjugado con estreptavidina y se incubaron entonces con anticuerpo 6G10 anti-CD106 (VCAM-1) purificado o anticuerpo anti-CD146 (MUC-18) o control de isotipo 1B5 (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos en hielo, se lavaron y se incubaron con anticuerpo de IgG de cabra antirratón conjugado con ficoeritrina (PE) (1/50; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) durante 20 minutos adicionales en hielo. Se clasificaron las células usando un citómetro de flujo FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Se cultivaron las células STRO-1^{bri}/CD106⁺ o STRO-1^{bri}/CD146⁺ en modificación alfa de medio de Eagle suplementado con 20 % de suero fetal de ternero, L-glutamina 2 mM, ascorbato-2-fosfato (100 μM), iniciando el cultivo primario en 5 % de CO_2 a 37 °C de atmósfera humidificada.

Análisis de citometría de flujo de uno y dos colores mediante inmunofluorescencia indirecta.

Este procedimiento se ha informado anteriormente (Gronthos y col., Isolation, Purification and In Vitro Manipulation of Human Bone Marrow Stromal Precursor Cells. In Marrow Stromal Cell Culture. Owen M. y Beresford J.N. (eds). Cambridge University Press UK, capítulo 3, págs. 26-42, 1998). En resumen, cultivos primarios de células derivadas de MPC o MPC se liberaron mediante digestión de tripsina/EDTA y después se incubaron durante 30 min sobre hielo. Se lavaron aproximadamente 2×10^5 células y después se resuspendieron en 200 μl de cóctel de anticuerpo primario durante 1 h en hielo. El cóctel de anticuerpo primario consistía en concentraciones saturantes del anticuerpo monoclonal de IgM de ratón STRO-1 y/o un anticuerpo monoclonal de IgG de ratón para fosfatasa alcalina humana (ALP, B4-78). Para la tinción con anticuerpos reactivos con antígenos intracelulares, primero se lavaron las células con PBS y después se permeabilizaron mediante tratamiento con etanol al 70 % en hielo durante diez minutos y después se lavaron antes de la tinción. Se trataron los Mab de control negativo de IgM e IgG isotípicos de ratón en las mismas condiciones. Después de la incubación con anticuerpos primarios, se lavaron las células y se expusieron a niveles saturantes de FITC específico de cadena μ de IgM antirratón de cabra (dilución 1/50) y PE específico de μ y de IgG antirratón de cabra (dilución 1/50) o PE específico de Ig anticonejo (dilución 1/50) (Southern Biotechnology Associates) en un volumen final de 100 μl . Se incubaron las células durante 45 min en hielo, se lavaron dos veces y después se fijaron con FAX FIX (PBS suplementado con 1 % (v/v), 2 % (p/v) de D-glucosa y 0,01 % de azida de sodio). Se analizaron entonces las células en un citómetro de flujo Epics^{XL}-MCL (Beckman Coulter, Hialeah, FL).

Marcado con éster de succinimidil-diacetato de carboxifluoresceína (CFSE).

Se utilizó la tinta a base de fluoresceína permeable a las células CFSE para estudiar los cambios fenotípicos y funcionales relacionados con la división durante el desarrollo de células derivadas de MPC. La CFSE se une covalentemente a los componentes citoplasmáticos de las células, lo que da como resultado una fluorescencia brillante y uniforme, que tras la división celular se distribuye equitativamente entre las células hijas. Esta técnica permite la resolución de hasta ocho ciclos de división celular por citometría de flujo. Las suspensiones de células únicas de células derivadas de MPC expandidas *ex vivo* se lavaron una vez, se resuspendieron en 1 ml de PBS/BSA al 0,1 % y 2 μl de CFSE 5 mM (10 μM final) se agregó antes de la incubación a 37 °C durante 10 min. Se inactivó la tinción mediante el agregado de 5 volúmenes de medio de cultivo helado α -MEM-10 y se incubó en hielo durante 5 min. Se lavaron las células tres veces en el medio de cultivo y después se colocaron en placas a densidad baja 1×10^5 en matraces de cultivo (T-25). En diferentes momentos, se separaron las células mediante tripsina-EDTA y se analizaron mediante análisis de citometría de flujo.

60

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

Los cultivos derivados de MPC primarias se liberaron mediante tratamiento con tripsina/EDTA y después se tiñeron con sobrenadante de STRO-1 como se describe arriba. Después del lavado, se incubaron las células con anticuerpo de IgM antiratón de cabra conjugado con ficoeritrina (PE) (1/50; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) durante otros 20 minutos en hielo. Se clasificaron las células usando un citómetro de flujo FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Se preparó ARN celular total a partir de 2×10^6 células primarias clasificadas STRO-1^{bri} o STRO-1^{dim}, sedimentos de condrocitos y otros cultivos inducidos y se lisaron utilizando el procedimiento de extracción RNazolB (Biotecx Lab. Inc., Houston, TX), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó entonces ARN aislado de cada subpoblación como molde para la síntesis de ADNc, preparado usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se evaluó la expresión de diversas transcripciones mediante amplificación por PCR utilizando un protocolo estándar tal como se describió anteriormente (Gronthos y col., J. Bone and Min. Res. 14:48-57, 1999). Los conjuntos de cebadores utilizados en el presente estudio se muestran en la tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se valoró la integridad del ARN mediante la expresión de GAPDH.

Diferenciación de CFU-F in vitro.

Se han informado anteriormente las condiciones para la inducción de células estromales de BM humana para desarrollar una matriz ósea mineralizada *in vitro* cultivada en α MEM suplementado con FCS al 10 %, L-ascorbato-2-fosfato 100 μ M, dexametasona 10^{-7} M y fosfato inorgánico 3 mM (Gronthos y col., Blood. 84: 4164-4173, 1994). Se identificaron depósitos minerales mediante tinción positiva de von Kossa. Se indujo la adipogénesis en presencia de metilisobutilmetilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 0,5 μ M e indometacina 60 μ M como se describió anteriormente (Gimble, J. M. Marrow stromal adipocytes. In Marrow stromal cell culture. Owen M. y Beresford J.N. (eds). Cambridge: Cambridge University Press UK. capítulo 5, págs. 67-87, 1998). La tinción con aceite rojo O se utilizó para identificar células grasas cargadas con lípido. Se evaluó la diferenciación condrogénica en cultivos agregados tratados con 10 ng/ml de TGF- β 3 como se describe (Pittenger y col., Science, 284:143-147, 1999).

Ensayo in vivo de formación ósea.

Se tripsinaron las células adheridas derivadas de células STRO-1^{bri}/VCAM-1⁺ en el pasaje 2-3, se mezclaron con 40 mg de partículas de cerámica de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (Zimmer Corporation, Varsovia, IN) y después se implantaron en bolsas subcutáneas en la superficie dorsal de ratones SCID de dos meses de edad como se describió anteriormente (Gronthos y col., Proceedings of the National Academy of Sciences (EUA), 97 (25): 13625-13630, 2000). Se practicaron estos procedimientos de acuerdo con las especificaciones de un protocolo animal aprobado (Adelaide University AEC n. ° M/079/94). Se recuperaron los implantes después de 6-8 semanas, se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 2 días, después se decalcificaron durante otros diez días en EDTA al 10 % antes de incrustarse en parafina. Para el análisis histológico, se prepararon secciones de 5 μ m de los implantes y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Gronthos y col., Proceedings of the National Academy of Sciences (EUA), 97 (25): 13625-13630, 2000).

Desarrollo de tejido neural. Se cultivan cultivos de monocapa en medio de neuroblastos A (Invitrogen/GIBCO) + suero de caballo al 5 %, suero fetal de ternero al 1 %, L-glutamina (2 mM), transferrina (100 μ g/ml), insulina (2 μ g/ml), ácido retinoico 0,5 mM, factor neurotrófico derivado de cerebro (10 ng/ml).

Desarrollo de grasa. Se cultivan cultivos de monocapa en modificación alfa de medio de Eagle (JRH) suplementado con suero fetal de ternero al 10 %, L-glutamina 2 mM, ascorbato-2-fosfato (100 μ M), metilisobutilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 0,5 mM, indometicina 60 mM.

Desarrollo de cartilago: Se cultivan cultivos de sedimento en tubos de polipropileno en modificación alfa de medio de Eagle suplementado con albúmina de suero bovino al 1 %, transferrina (100 μ g/ml), insulina (2 μ g/ml), L-glutamina (2 mM), ascorbato-2-fosfato (100 μ M/ml), dexametasona (10^{-8} M) con BMP-7(50ng/ml), TGF β ₃(10ng/ml).

Desarrollo de músculo esquelético/cardíaco. Se cultivan cultivos de monocapa en modificación alfa de medio de Eagle suplementado con suero fetal de ternero al 10 %, L-glutamina (2 mM), ascorbato-2-fosfato (100 μ M/ml) y 5-azacitodina (5 μ M/ml).

Desarrollo epitelial. Se cultivan cultivos de monocapa en medio basal de queratinocitos (Clontenics) suplementado con extracto pituitario bovino (50 μ g/ml), factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml), hidrocortisona (0,5 μ g/ml), insulina (5 μ g/ml).

Desarrollo de osteoblastos, tendón, ligamento u odontoblastos. Se cultivan cultivos de monocapa en modificación alfa de medio de Eagle suplementado con suero fetal de ternero al 10 %, L-glutamina 2 mM, ascorbato-2-fosfato (100 µM), dexametasona (10^{-7} M) y BMP-2 (50 ng/ml)

5 *Desarrollo de células de músculo liso o pericitos.* Se cultivaron cultivos de 20.000 MPC cultivadas *ex vivo* por pocillo en modificación alfa de medio de Eagle suplementado con suero fetal de ternero al 10 %, L-glutamina 2 mM, ascorbato-2-fosfato (100µM), factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (10 ng/ml) suspendido en 200µl de matrigel en placas de 48 pocillos.

10 **EJEMPLO 1: las células cultivadas Stro-1^{dim} son células precursoras más comprometidas, mientras que las células Stro-1^{bri} son células precursoras menos comprometidas.**

Se informó anteriormente que las células precursoras mesenquimales multipotenciales (MPC) se pueden purificar a partir de células mononucleares de médula ósea humana de adulto basándose en el fenotipo STRO-1^{bri}/VCAM-1 (CD106)⁺ o STRO-1^{bri}/MUC-18 (CD146)⁺ (Gronthos y col. J. Cell Sci 116:1827-1835, 2003; Shi y Gronthos JBMR 18(4): 696-704, 2003; PCTAU2004/000416). La población de MPC se puede expandir fácilmente *in vitro* en condiciones de cultivo definidas (Gronthos y col. J. Cell Sci 116:1827-1835, 2003). Ahora presentamos datos que caracterizan la progenie de MPC expandida *ex vivo* basándose en marcadores asociados con diferentes linajes celulares, a nivel de ARNm y de proteína, utilizando reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y análisis de citometría de flujo, respectivamente. Mientras que todas las MPC de médula ósea recién aisladas expresan STRO-1 en niveles altos (Stro-1^{bri}), la mayoría de las células regulan por disminución la expresión de STRO-1 (Stro-1^{dim}) después de la expansión *ex vivo* (Gronthos y col. J. Cell Sci 116:1827-1835, 2003). En la primera serie de experimentos, se empleó análisis RT-PCR semicuantitativo para analizar el perfil de expresión génica de diversos genes asociados con el linaje expresados por poblaciones de STRO-1^{dim} o STRO-1^{bri}, aisladas por clasificación celular 15 activada por fluorescencia (figura 1A). Se evaluó la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, utilizando el software ImageQuant (figura 1B, C). Además, se utilizó análisis de citometría de flujo de color doble para analizar el perfil de expresión de proteínas de MPC expandidas *ex vivo* basándose en su expresión de una gama más amplia de marcadores asociados con el linaje celular en combinación con el anticuerpo STRO-1 (figura 2). Se presenta un resumen del fenotipo general basado en la expresión génica y de proteínas de células cultivadas STRO-1^{dim} y STRO-1^{bri} en la tabla 3. Los datos indican que las MPC STRO-1^{bri} 20 expandidas *ex vivo* presentan una expresión diferencialmente mayor de marcadores asociados con células perivasculares, incluida angiopoyetina-1, VCAM-1, SDF-1, IL-1β, TNFα y RANKL. Por el contrario, las células STRO-1^{dim} expandidas *ex vivo* expresaron niveles más altos de nestina, GFAP, osterix, osteocalcina, SOX9, GATA-4, leptina y cadena pesada de miosina de músculo liso. Por lo tanto, parece que las MPC STRO-1^{bri} expandidas *ex vivo* 25 presentan un fenotipo más inmaduro y tipo perivascular en comparación con las células STRO-1^{dim} que presentan una característica de fenotipo de tipos de células precursoras más comprometidas que incluyen condroblastos, osteoblastos, adipoblastos, células epiteliales, progenitores neurales y cardiomioblastos. Las comparaciones entre los perfiles de expresión génica y de proteínas de las células cultivadas STRO-1^{dim} y STRO-1^{bri} se resumen en las tablas 3, 4 y 5. Se muestra una comparación de la expresión de marcadores entre MPC recién aisladas y progenie de MPC 30 cultivada STRO-1^{bri} (MEMP) en la tabla 6.

EJEMPLO 2: capacidad diferencial de células cultivadas STRO-1^{dim} y STRO-1^{bri} (MEMP) de diferenciarse *in vitro*.

45 Después se analizó si las diferencias observadas en los perfiles de expresión génica y de proteínas de las células cultivadas STRO-1^{dim} y STRO-1^{bri} reflejaba diferencias funcionales en su capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares. Se aislaron cultivos de células derivadas de STRO-1^{bri}/CD146⁺ expandidas *ex vivo* por FACS basándose en su expresión de antígeno de STRO-1 tal como se describe arriba. Las células cultivadas STRO-1^{dim} y STRO-1^{bri} aisladas por FACS se colocaron en placas posteriormente en condiciones inductivas para la formación de 50 grasa (figura 3), hueso (figura 4) y cartílago (figura 5). En todos los casos, las células cultivadas STRO-1^{bri} mostraron mayor capacidad de formar grasa, hueso y cartílago en las condiciones especificadas en comparación con las células cultivadas STRO-1^{dim}. Los datos de estos experimentos corroboran los resultados de la expresión génica y de proteínas obtenidos anteriormente, lo que demuestra que las células cultivadas STRO-1^{bri} son una población primitiva que contiene una proporción alta de células precursoras menos comprometidas que se pueden influenciar para 55 diferenciarse hacia cualquier linaje celular especificado en las condiciones de cultivo adecuadas (figuras 3, 4, 5) y se pueden denominar MPC. Por el contrario, las células cultivadas STRO-1^{dim} contienen una proporción alta de células comprometidas que representan diversos linajes y se pueden denominar TSCC. Se propone que la población Stro-1^{dim} es heterogénea y comprende células comprometidas por separado con una gama de tipos de tejidos diferentes.

EJEMPLO 3: las células STRO-1^{bri} (MEMP) pueden modificar el potencial de crecimiento de las células comprometidas específicas del tejido (TSCC) *in vitro* e *in vivo*.

La identificación de las dos poblaciones de células derivadas de MPC expandidas *ex vivo* que representa diferentes etapas de desarrollo tiene implicaciones significativas en el uso de preparaciones cultivadas completas derivadas de células Stro-1^{bri} para terapias clínicas. Se diseñaron estudios iniciales para analizar la influencia de MPC cultivadas STRO-1^{bri} primitivas, menos comprometidas sobre el crecimiento de TSCC cultivadas STRO-1^{dim} más maduras y comprometidas. Los experimentos se diseñaron para agregar porcentajes crecientes de MPC cultivadas STRO-1^{bri} aisladas por FACS con TSCC cultivadas STRO-1^{dim} aisladas por FACS, marcadas anteriormente con una etiqueta fluorescente, CFSE. La figura 6 muestra que la proliferación de células STRO-1^{dim} marcadas es efectuada por la presencia de células STRO-1^{bri} no marcadas. Cuando una célula marcada con CFSE se divide, las dos células hijas contienen la mitad de fluorescencia que la célula original. Por lo tanto, las diferentes generaciones de células hijas se representan como distribuciones fluorescentes con intensidad de fluorescencia cada vez menor y proporcional, donde la curva en el extremo derecho del histograma (intersectada por una línea vertical) representa el punto de la población de STRO-1^{dim} inicial (figura 6). Los datos demostraron que una mayor proporción de células STRO-1^{dim} se estimuló para aumentar los índices de proliferación, donde se muestra que más células sufren al menos 3 a 4 divisiones, después del agregado de más del 5 % de células STRO-1^{bri}. Por lo tanto, se deduce que para conseguir una expansión *ex vivo* sostenible y eficiente de células derivadas de MPC no fraccionadas, los cultivos requieren la presencia de más del 5 % de células STRO-1^{bri} dentro de la población.

Se realizaron otras investigaciones para determinar si MPC cultivadas STRO-1^{bri} más primitivas, menos comprometidas también podían afectar la capacidad de proliferación de TSCC *in vivo*. Se utilizaron dos modelos *in vivo* para abordar esta pregunta. El primer modelo empleó ratas lampiñas atómicas que se habían sometido a ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) y se inyectaron 48 horas más tarde con solución salina, células STRO-1^{dim} y STRO-1^{bri} humanas cultivadas aisladas por FACS y aspirados nuevos de células mononucleares de médula ósea con agotamiento de STRO-1 (figura 7). Después de dos semanas, se sacrificó a los animales y se fijaron los tejidos cardíacos y se tiñeron de forma concomitante con dos anticuerpos monoclonales: el primero fue reactivo selectivamente con antígeno Ki67 de rata, pero no de humano, y el segundo fue reactivo con el marcador de cardiomiocitos troponina I. Las células doblemente teñidas, que indican la proliferación de cardiomiocitos de rata, se detectaron mediante técnica de inmunoperoxidasa. Los animales que recibieron células humanas STRO-1^{bri} presentaron cantidades 2,5-5 veces mayores de cardiomiocitos de rata proliferantes en comparación con los animales de control que recibieron solución salina o células humanas STRO-1^{dim} (figura 7).

El segundo modelo utilizó ratas lampiñas atómicas inyectadas por vía subcutánea con células tumorales de glioblastoma de rata, que secretan VEGF de forma constitutiva. Dos semanas después, las ratas recibieron inyecciones intratumorales con solución salina, células humanas STRO-1^{dim} o STRO-1^{bri} aisladas por FACS (figura 8). Una semana después, se sacrificaron los animales y se fijaron los tejidos tumorales y se tiñeron concomitantemente con dos anticuerpos monoclonales: el primero es reactivo con el antígeno de actina de músculo liso alfa expresado por células de músculo liso y el segundo es reactivo con el antígeno vWF expresado por células endoteliales vasculares. Las estructuras doblemente teñidas, que indican arteriolas y arterias que contienen endotelio y músculo liso, fueron detectadas mediante la técnica de inmunoperoxidasa. Los animales que recibieron células humanas STRO-1^{bri} demostraron cantidades 3,5-8 veces mayores de arteriolas y arterias en el sitio de inyección celular en los tumores en comparación con los animales de control que recibieron solución salina o células humanas STRO-1^{dim} (figura 8). No se observaron diferencias en los sitios distales del lugar donde se inyectaron las células humanas.

EJEMPLO 4: aumento en la cantidad de MEMP STRO-1^{bri} en cultivos celulares derivados de células positivas STRO-1.

Después de demostrar la capacidad de las MEMP cultivadas STRO-1^{bri} de aumentar la proliferación de más TSCC, se analizó el efecto de una gama de factores de crecimiento de aumentar la proporción de MPC STRO-1^{bri} expandidas *ex vivo* (figura 9). Se cultivaron los cultivos establecidos derivados de células de médula ósea aisladas STRO-1^{bri}/CD146⁺ en medio basal complementado con FCS al 10 % (A), o una gama de factores, incluidos 1x10⁻⁸ M 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25D) (B), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) 10 ng/ml (C), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) 10 ng/ml (D); interleucina-1 β 10 ng/ml (IL-1 β) (E) y factor derivado de estroma 1-alfa (SDF-1 α) 30 ng/ml (F) durante 5 días, teñido con mAb STRO-1. (Figura 9). Se descubrió que estos factores aumentaban en gran medida la cantidad de MPC STRO-1^{bri} *in vitro*.

Para investigar los mecanismos de cómo estos factores mejoraron el porcentaje de células con expresión de STRO-1^{bri} después de la expansión *ex vivo*, se marcaron Stro-1^{bri} cultivadas con CFSE como se describe en el procedimiento y después se expusieron a diversos factores. La figura 10 muestra un experimento representativo, donde IL-1 β

aumentó el potencial proliferativo de MPC marcadas con CFSE como se describe en los procedimientos. Se cultivaron las células en presencia de IL-1 β 10 ng/ml durante 5 días, se tiñeron con mAb STRO-1 y se analizaron tal como se describe arriba. Se descubrió que IL-1 β aumentó la cantidad de divisiones de MPC mediante el aumento de la cantidad de células osteoprogenitoras STRO-1⁺ brillantes. También se obtuvieron resultados similares 1,25D, PDGF-BB, TNF- α , IL-1 β y SDF-1 α se utilizaron para estimular las MPC.

EJEMPLO 5: el aumento de la proliferación de las células Stro-1^{bri} también aumenta la cantidad de células Stro-1^{dim}.

10 La capacidad de mejorar la proporción de MEMP cultivadas STRO-1^{bri} en presencia de diversos factores también se correlaciona con un aumento en la cantidad de células Stro-1^{dim}. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri}/fos. alq.⁺ (figura 10B) un fenotipo que coincide con las células pre-osteoblásticas (Gronthos y col., J Bone Miner Res. 14: 47-56, 1999; Pan y col., Bone 34(1):112-23, 2004). Por lo tanto, analizamos si este cambio en el fenotipo también se correlaciona con una mayor capacidad de las MPC STRO-1^{bri} inducidas de diferenciarse en células formadoras de huesos, 15 osteoblastos. La figura 11 muestra que IL-1 β no solo estimuló la proliferación de MPC STRO-1 positivas estimuladas, sino que también aumentó su potencial de formación de hueso en presencia del agente osteoinductivo, dexametasona. IL-1 β a una concentración de 0,01 ng/ml aumentó significativamente la cantidad de MPC a 136,6 \pm 1,2 % de cultivos de control no tratados (figura 11A). Se logró un efecto de meseta a concentraciones mayores que 0,1 ng/ml. Se sembró la progenie de MPC expandida *ex vivo* en placas de 24 pocillos en presencia de condiciones osteoinductivas, tal como se describe en los procedimientos. También se trataron las células con IL-1 β a una concentración de 10 ng/ml y los 20 cultivos se "alimentaron" semanalmente con medio nuevo que contenía IL-1 β . Se determinó la concentración de calcio de matriz extracelular absoluta de acuerdo con los procedimientos. Los resultados mostraron que el depósito mineral aumentó en las células tratadas con IL-1 β (figura 11C) en comparación con las células no tratadas (figura 11B). El nivel de calcio en las células tratadas con IL-1 β fue significativamente mayor que en las células no tratadas en la 25 semana 4 y la semana 6.

Los datos presentados en la figura 12 sugieren que IL-1 β estimuló la proliferación y MPC STRO-1^{Bri}, lo que provocó una expansión de los oetoprogenitores, mientras que el agregado posterior de un agente de diferenciación secundario, dexametasona, indujo la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y la pérdida de expresión de STRO-1, lo que aumentó 30 de forma efectiva la cantidad de osteoblastos funcionales *in vitro*. El concepto de que diferentes factores pueden expandir y regular la población de MPC STRO-1^{Bri} se evaluó adicionalmente *in vivo*. Se cultivaron cultivos secundarios semiconfluentes de *ex vivo* expandidas a partir de MPC Stro-1^{bri} en presencia o ausencia de PDGF-BB (10 ng/ml) un factor adicional que se sabe que aumenta la cantidad de MPC STRO-1^{bri} expandidas *ex vivo* (consulte la figura 9C). Posteriormente, se cotrasplantaron preparaciones de células inducidas por PDGF y no inducidas con partículas de 35 hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP) en ratones inmunodeprimidos tal como se describe en los procedimientos. Después de ocho semanas, el análisis de los trasplantes recolectados mostró que los cultivos pretratados con PDGF-BB mostraron formación ósea significativamente más ectópica (figura 13C) en comparación con los cultivos de control no tratados (figura 13B) según lo cuantificado por Scion Imaging (figura 13A).

40 EJEMPLO 6: MPC STRO-1^{bri} no comprometidas que carecen de expresión detectable de ALP persisten en cultivos *ex vivo* de MPC derivados de BM seleccionados por STRO-1.

Se prepararon aspirados de BM humana tal como se describe en los procedimientos y se recuperaron las MPC por selección MACS utilizando el mAb STRO-1. Utilizando inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo, se evaluó 45 la fracción positiva de MACS (células utilizadas para establecer el cultivo de inicio o P0) para detectar la proporción de células que expresaban el antígeno STRO-1 en niveles altos (STRO-1^{bright}) y resultó ser 22,4 % de la población total (no se muestran los datos). Estas células después se colocaron en placas a 1 x 10⁴ células por cm² y se cultivaron en medio repleto de suero hasta lograr una confluencia del 80-90 %, como se describió anteriormente (Gronthos y col. Journal of Cell Science 116: 1827-1835, 2003). En cada pasaje, se separaron las células como se describe en los 50 procedimientos y se volvieron a sembrar a 1 x 10⁴ células por cm². Se tiñeron muestras de células de cada pasaje para su expresión de STRO-1 y el marcador de TSSC, fosfatasa alcalina (ALP). Como se muestra en la figura 14, después de 4 pasajes, mientras que la proporción de células que expresan STRO-1 en niveles altos (y que carecen de niveles apreciables del marcador de TSSC, ALP) había caído a 12,7 %, estos cultivos todavía contenían cantidades considerables de MEMP STRO-1^{bri}ALP.

55 **Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la presente patente**

TIPO CELULAR	ANTÍGENO	DILUCIÓN DE ISOTIPO DE ORIGEN
Músculo esquelético	Myo D	Ig de conejo Santa Cruz 1/50

ES 2 710 099 T3

TIPO CELULAR	ANTÍGENO	DILUCIÓN DE ISOTIPO DE ORIGEN
	Desmina	IgG1 DAKO 10ug/ml
Músculo liso	SMMHC	Acites de mIgG1 Sigma 1/500
	SMHC -FAST	mIgG1 Sigma 10ug/ml
	alphaSMAC	mIgG2a DAKO 10ug/ml
	PDGF-R	mIgG Pharmigen 10ug/ml
	Vimentina	mIgG1 DAKO 10ug/ml
Condrocitos	Colágeno tipo II	mIgG1 Chemicon 10 ug/ml
	Colágeno IX	mIgG2A Chemicon 10 ug/ml
	Agrecano	mIgG1 Chemicon 10ug/ml
	Proteína de unión	IgG2b de ratón DSHB 10ug/ml
	S-100	Ig de conejo Chemicon 1/100
	Biglicano	Ig de CONEJO Dr. Larry Fisher NIH 1/500
Fibroblastos basales	Laminina	mIgG1 Chemicon 10ug/ml
	Colágeno tipo IV	mIgG1 DAKO 10ug/ml
	Versicano	IgG1 12C5 DSHB 10ug/ml
Células endoteliales	vWF	ratón IgG1 DAKO
	VCAM-1	6G10 IgG1 Chemicon 10ug/ml
	Endoglina	IgG1 BD 10ug/ml
	MUC18	IgG2a CC9 interno 10ug/ml
	CD31	IgG DAKO 10ug/ml
	CD34	mIgG1 DAKO 10ug/ml
	SDF-1	IgG1 R&D 10ug/ml
Cardiomocitos	calponina	IgG1 Chemicon 10ug/ml
	Troponina I	IgG1 Accurate Chem y Sci Corp 10ug/ml
	Troponina C	mIgG2a Chemicon 10ug/ml
Neuronas	NCAM	IgG2a DAKO 10ug/ml
	GFAP	mIgG1 DAKO 10ug/ml
	Neuroanalasa	Ig de CONEJO DAKO 1/200
	Neurofilamento	IgG1 DAKO 10ug/ml
Hueso	AP	mIgG1 DSHB 10ug/ml
	Colágeno tipo I	IgG de ratón CHEMICON 10ug/ml
	CBFA 1	Ig de CONEJO Alpha Diagnostic 1/200
	OCN	Ig de CONEJO Chemicon 1/200
	OPG	IgG2b R&D 10ug/ml
	RANKL	IgG2a R&D 10ug/ml
	Anexina II	Ig de CONEJO Santa Cruz 1/100
Grasa	CEPBalfa	Ig de CONEJO Santa Cruz 1/200
	PPARgamma	Ig de CONEJO Santa Cruz 1/200
	Leptina	IgG Chemicon 10ug/ml

TIPO CELULAR	ANTÍGENO	DILUCIÓN DE ISOTIPO DE ORIGEN
Células epiteliales	Queratina 14	mIgG DAKO 10ug/ml
	Citoqueratina 10+13	mIgG2a DAKO 10ug/ml
	EGFR	mIgG Pharmingen 10ug/ml
Fibroblasto	Colágeno III	mIgG1 Chemicon 10ug/ml
	NGFR	mIgG1 Santa Cruz 10ug/ml
	Marcador de fibroblastos	mIgG SIGMA 10ug/ml
Hematopoyético	CD14	IgG2a DAKO 10ug/ml
	CD45	IgG1 DAKO 10ug/ml
	Glicoforina-A	IgG DAKO 10ug/ml

Tabla 2. Cebadores de RT-PCR y condiciones para la amplificación específica de ARNm humano

Gen diana	Secuencias de cebadores sentido/antisentido (5'-3')	Tamaño del producto
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (SEQ ID NO:1)/ CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (SEQ ID NO:2)	417
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (SEQ ID NO:3)/ GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (SEQ ID NO:4)	364
IL-1β	AGGAAGATGCTGGTTCCCTCTC (SEQ ID NO:5)/ CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (SEQ ID NO:6)	151
FLT-1	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (SEQ ID NO:7)/ GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (SEQ ID NO:8)	380
TNF-α	TCAGATCATCTTCTCGAACC (SEQ ID NO:9)/ CAGATAGATGGGCTCATACC (SEQ ID NO:10)	361
KDR	TATAGATGGTGTAAACCCGGA (SEQ ID NO:11)/ TTTGTCACTGAGACAGCTTGG (SEQ ID NO:12)	450
RANKL	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (SEQ ID NO:13)/ TAAGGAGGGTTGGAGACCTCG (SEQ ID NO:14)	538
Leptina	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (SEQ ID NO:15)/ GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (SEQ ID NO:16)	492
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (SEQ ID NO:17)/ TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (SEQ ID NO:18)	632
PPARγ2	AACTGCGGGGAAACTTGGGAGATTCTCC (SEQ ID NO:19)/ AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (SEQ ID NO:20)	341
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (SEQ ID NO:21)/ CGTAGAAGCGCCGATAGGC (SEQ ID NO:22)	289
MyoD	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (SEQ ID NO:23)/ GCGAGAAACGTGAACCTAGC (SEQ ID NO:24)	270
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAACC (SEQ ID NO:25)/ TATAGCTCATTGCAGCCTCG (SEQ ID NO:26)	150
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGTT (SEQ ID NO:27)/ TCATCGCTCAGGAGGTCTT (SEQ ID NO:28)	370
Nestina	GGCAGCGTTGGAACAGAGTTGGA (SEQ ID NO:29)/ CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (SEQ ID NO:30)	460
SOX9	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (SEQ ID NO:31)/ CCTTTGCTTGCCTTTTACCTC (SEQ ID NO:32)	598

Gen diana	Secuencias de cebadores sentido/antisentido (5'-3')	Tamaño del producto
Colágeno tipo X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (SEQ ID NO:33)/ TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (SEQ ID NO:34)	387
Agrecano	CACTGTTACCGCCACTTCCC (SEQ ID NO:35)/ ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (SEQ ID NO:36)	184

Tabla 3. Resumen de la expresión génica relativa en poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dim}. Se presenta una lista de genes que mostraron expresión medible y diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dim} según lo determinado mediante PCR de transcripción inversa. Los valores representan la expresión génica relativa con referencia al gen constitutivo, GAPDH.

Tejido	Marcador	Expresión génica relativa a GAPDH	
		STRO-1 ^{Bri}	STRO-1 ^{Dim}
Neuronas	<i>GFAP (proteína ácida fibrilar glial)</i>	0,1	0,7
Hueso	<i>OCN (osteocalcina)</i>	1,1	2,5
	<i>OSX (Osterix)</i>	0,4	1,3
	<i>CBFA-1 (proteína de unión al factor central-1)</i>	0,3	0,6
	<i>RANKL (activador del receptor del factor nuclear κ B)</i>	1,6	0,3
Grasa	<i>Leptina</i>	3,1	4,2
Cardiomiocitos	<i>GATA-4</i>	1,1	2,9
Células endoteliales	<i>Ang-1 (angiopoyetina-1)</i>	1,5	0,8
	<i>SDF-1-alfa (factor-1-alfa derivado estromal)</i>	3,2	0,1
Condrocitos	<i>Sox 9</i>	0,3	1,1
	<i>COL X (colágeno X)</i>	3,5	2,8
Citocinas proinflamatorias	<i>TNF-alfa (necrosis tumoral alfa)</i>	1,7	0,9

Tabla 4. Resumen de la expresión de la proteína relativa en poblaciones de STRO-1^{bri} y STRO-1^{dim}. Se presenta una lista de proteínas que mostraron expresión diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{bri} y STRO-1^{dim} según lo determinado mediante citometría de flujo. Los valores representan la intensidad de fluorescencia media relativa de la tinción según lo descrito en la figura 2.

Tejido	Marcador	Intensidad de fluorescencia media	
		STRO-1 ^{bri}	STRO-1 ^{dim}
Neuronas	<i>Neurofilamento</i>	1,7	20,5
Hueso	<i>ALK PHOS (fosfatasa alcalina)</i>	5,7	44,5
	<i>RANKL (activador del receptor del factor nuclear κ B)</i>	658,5	31,0
Células epiteliales	<i>Citoqueratina 10+13</i>	1,2	23,3
	<i>Citoqueratina 14</i>	1,8	8,8
Músculo liso	<i>α-SMA (actina de músculo liso alfa)</i>	318,0	286,0
Condrocitos	<i>Byglycan</i>	84,4	65,9

		Intensidad de fluorescencia media	
Tejido	Marcador	STRO-1 ^{bri}	STRO-1 ^{dim}
Fibroblasto basal	Tenascina C	22,2	6,9
Cardiomiocito	Troponina C	2,5	15,0

Tabla 5: comparación de la expresión del marcador entre MEMP (STRO-1^{bri}) y las células comprometidas específicas del tejido (TSCC) (STRO-1^{dim})

Marcador	TSCC	MEMP
Stro-1	+	+++
Neurofilamento	++	+
OCN	++	+
OCX	++	+
CBFA-1	++	+
RANKL	+	++
Leptina	++	+
GATA-4	++	+
SDF-1	+	++
Tenascina-C	+	++
α -SMA	+	++
Sox9	++	+

5 **Tabla 6:** comparación de la expresión del marcador entre MPC recién aisladas y MEMP

Marcador	MPC recién aisladas	MEMP
Stro-1	+++	+++
Ki67	-	++
Actividad TERT	+++	-
CD49a	-	-
Fos. alq.	+	-
CD44	-	++
CD18	+	-
CD49c/CD29, VLA-3, α 3 β 1	-	+

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Angioblast Systems, Inc.
- 10 <120> Progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) y sus usos
- <130> 503851
- 15 <160> 36
- <170> PatentIn versión 3.3

ES 2 710 099 T3

	<210>	1	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido GAPDH	
	<400>	1	
10	cactgacacg ttggcagtg		20
	<210>	2	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido GAPDH	
20	<400>	2	
	catggagaag gctggggctc		20
	<210>	3	
	<211>	20	
25	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido SDF-1	
30	<400>	3	
	gagaccgcg ctcgtccgc		20
	<210>	4	
35	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	Oligonucleótido antisentido SDF-1	
	<400>	4	
	gctggactcc tactgtaagg g		21
45	<210>	5	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido IL-1beta	
	<400>	5	
55	aggaagatgc tggttccctc tc		22

ES 2 710 099 T3

	<210>	6	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido IL-1beta	
	<400>	6	
10	cagttcagtg atcgtacagg tgc		23
	<210>	7	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido FLT-1	
	<400>	7	
20	tcactatgga agatctgatt tcttacagt		29
	<210>	8	
	<211>	25	
25	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido FLT-1	
30	<400>	8	
	ggtataaata cacatgtgct tctag		25
	<210>	9	
35	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	Oligonucleótido sentido TNF-alfa	
	<400>	9	
	tcagatcatc ttctcgaacc		20
45	<210>	10	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido TNF-alfa	
	<400>	10	
55	cagatagatg ggctcatacc		20

ES 2 710 099 T3

	<210>	11	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido KDR	
	<400>	11	
10	tatagatggt	gtaaccgga	20
	<210>	12	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido KDR	
	<400>	12	
20	tttgtcactg	agacagcttg g	21
	<210>	13	
	<211>	21	
25	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido RANKL	
30	<400>	13	
	aacaggcctt	tcaaggagct g	21
	<210>	14	
35	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	Oligonucleótido antisentido RANKL	
	<400>	14	
	taaggagggg	ttggagacct cg	22
45	<210>	15	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido leptina	
	<400>	15	
55	atgcattggg	aaccctgtgc	20

ES 2 710 099 T3

	<210>	16	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido leptina	
	<400>	16	
10	gcacccaggg	ctgaggcca	20
	<210>	17	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido CBFA-1	
	<400>	17	
20	gtggacgagg	caagagttc a	21
	<210>	18	
	<211>	21	
25	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido CBFA-1	
30	<400>	18	
	tggcaggtag	gtgtgtagt g	21
	<210>	19	
35	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	Oligonucleótido sentido PPARgarnma2	
	<400>	19	
	aactgcgggg	aaactggga gattctcc	28
	<210>	20	
45	<211>	26	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
50	<223>	Oligonucleótido antisentido PPARgarnma2	
	<400>	20	
	aataataagg	tggagatgca ggctcc	26
55			

ES 2 710 099 T3

	<210>	21	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido OCN	
	<400>	21	
10		atgagagccc tcacactcct c	21
	<210>	22	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido OCN	
20	<400>	22	
		cgtagaagcg ccgataggc	19
	<210>	23	
	<211>	20	
25	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido MyoD	
30	<400>	23	
		aagcgccatc tctgaggta	20
	<210>	24	
35	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	Oligonucleótido antisentido MyoD	
	<400>	24	
		gcgagaaacg tgaacctagc	20
45	<210>	25	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido SMMHC	
	<400>	25	
55		ctgggcaacg tagtaaaccc	20

ES 2 710 099 T3

	<210>	26	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido SMMHC	
	<400>	26	
10	tatagctcat	tcgagcctcg	20
	<210>	27	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido GFAP	
20	<400>	27	
	ctgttgccag	agatggaggt t	21
	<210>	28	
	<211>	20	
25	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido GFAP	
30	<400>	28	
	tcatcgctca	ggaggtcctt	20
	<210>	29	
35	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
40	<223>	Oligonucleótido sentido nestina	
	<400>	29	
	ggcagcgttg	gaacagaggt tgga	24
45	<210>	30	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
50	<223>	Oligonucleótido antisentido nestina	
	<400>	30	
	ctctaaactg	gagtggtcag ggct	24
55	<210>	31	

ES 2 710 099 T3

	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido SOX9	
	<400>	31	
		ctctgcctgt ttggacttg t	21
10			
	<210>	32	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
15			
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido SOX9	
	<400>	32	
20		cctttgcttg ccttttacct c	21
	<210>	33	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
25	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sentido colágeno tipo X	
30	<400>	33	
		agccagggtt gccaggacca	20
	<210>	34	
	<211>	20	
35	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido colágeno tipo X	
40	<400>	34	
		tttccact ccaggaggc	20
	<210>	35	
45	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
50	<223>	Oligonucleótido sentido agrecano	
	<400>	35	
		cactgttacc gccactccc	20
55	<210>	36	

ES 2 710 099 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido antisentido agregano

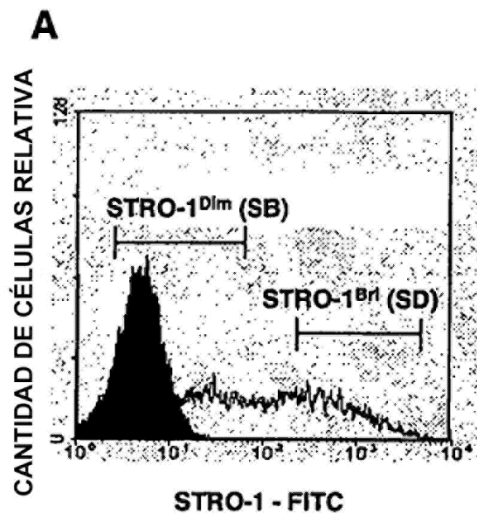
<400> 36
accagcggaa gtcccctcg

10

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la generación de progenie de células precursoras mesenquimales expandidas multipotenciales (MEMP) que tienen el fenotipo Stro-1^{bri}, ALP⁻, comprendiendo el
5 procedimiento el cultivo de células progenitoras mesenquimales STRO-1^{bright}ALP⁺ (MPC) en presencia de uno o más factores estimulantes seleccionados de entre el grupo que consiste en 1 α ,25-dihidroxitamina D₃(1,25D), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 donde las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ del mismo se
10 cultivan en presencia de dos o más factores estimulantes.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ se han expandido *ex vivo*.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ son una población no expandida de MPC aisladas.
- 5.El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la estimulación da lugar a un aumento en la progenie de MPC que tiene el fenotipo Stro-1^{bri}, ALP⁻ de más del 10 % con respecto a los controles no
20 estimulados.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la estimulación da lugar a un aumento en la progenie de MPC que tiene el fenotipo Stro-1^{bri}, ALP⁻ de más del 50 % con respecto a los controles no estimulados.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde las MPC STRO-1^{bright}ALP⁺ se derivan de uno o más tejidos que consisten en el grupo que comprende médula ósea, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel, tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo
30 esquelético.



B

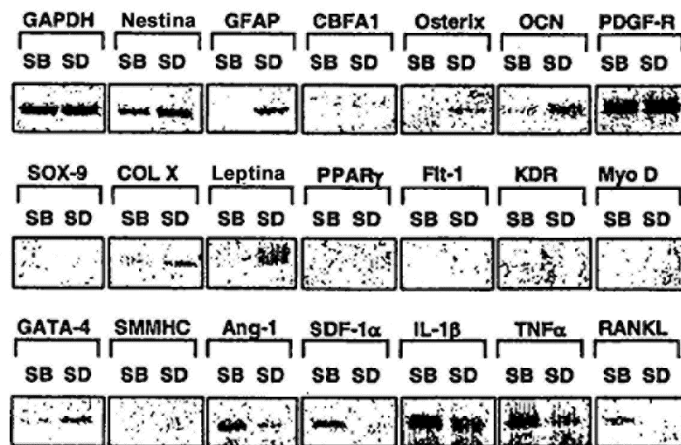


Figura 1

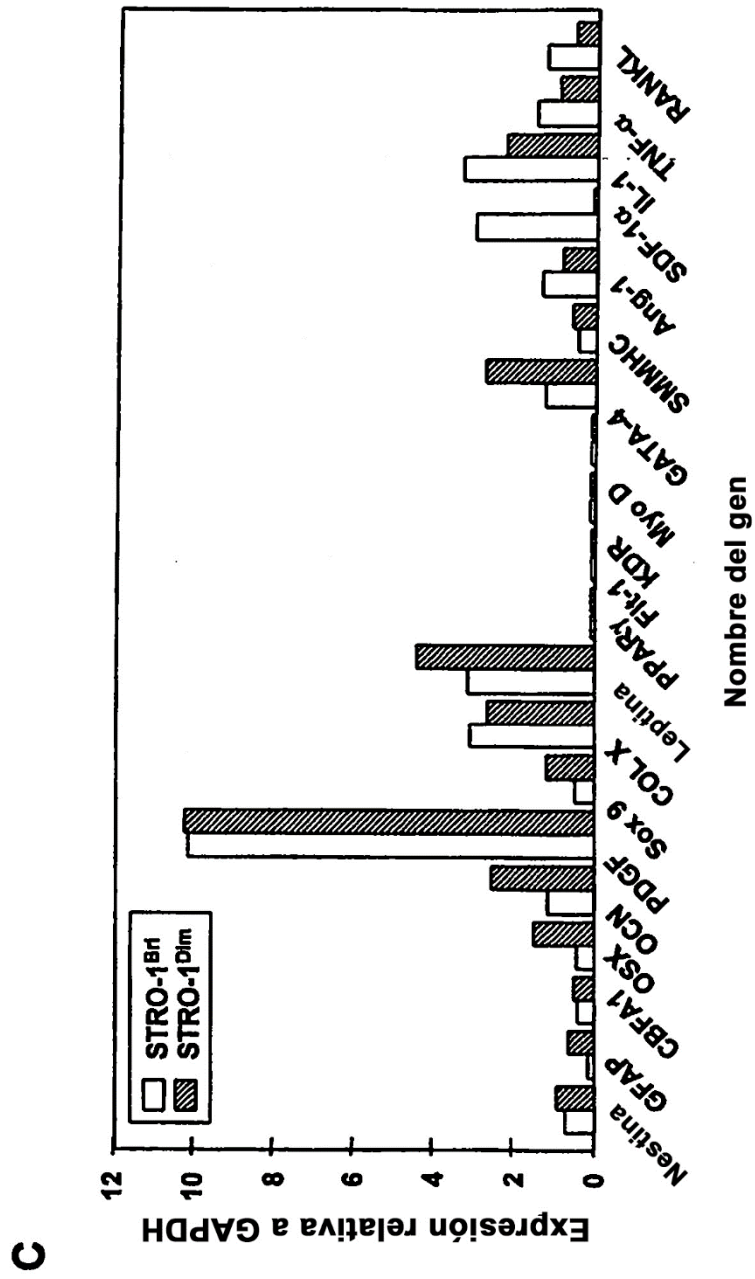
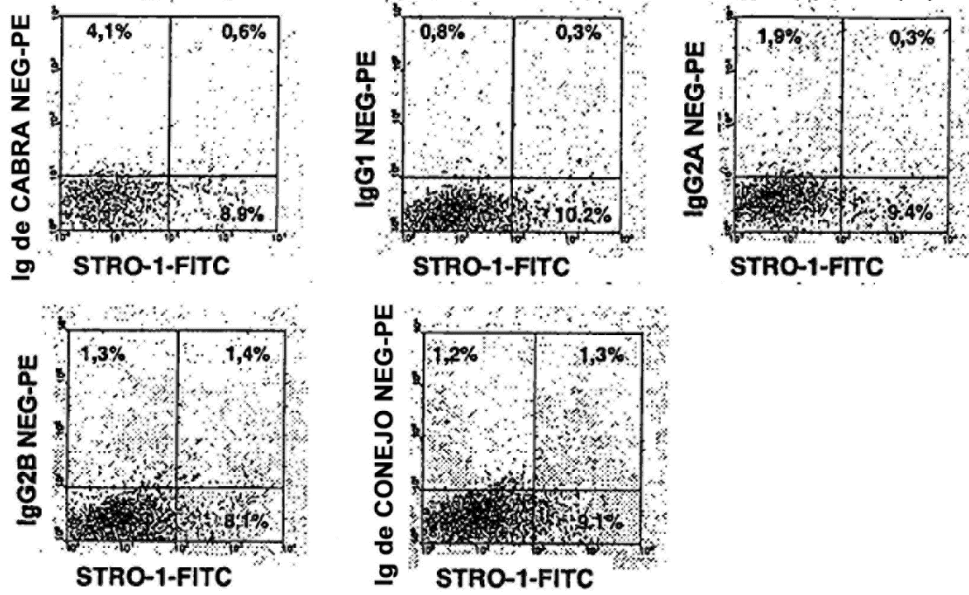


Figura 1 (continuación)

Controles negativos



Hueso

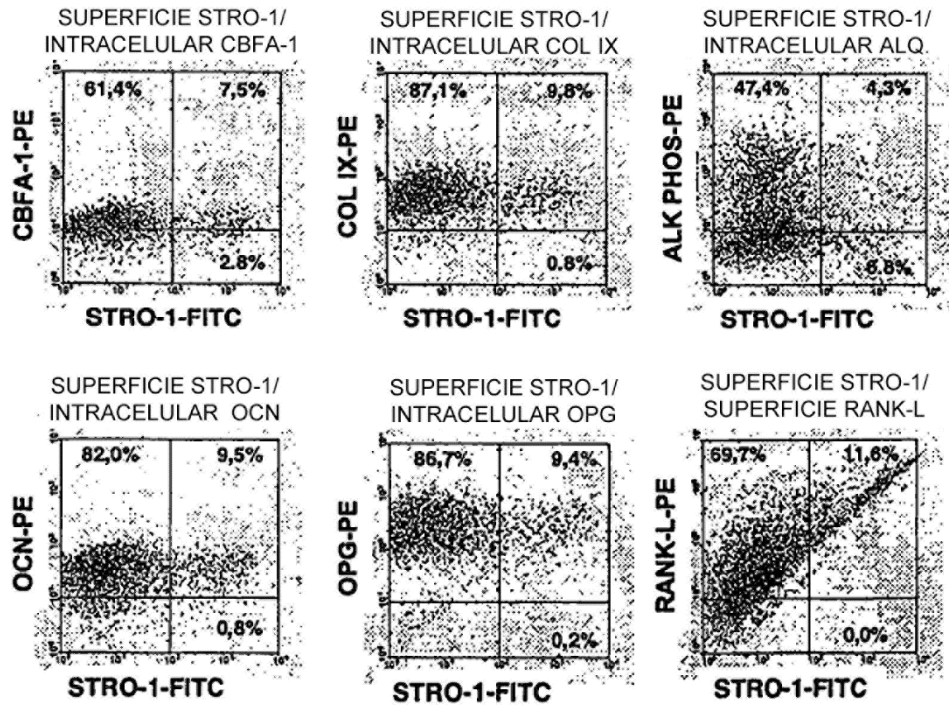
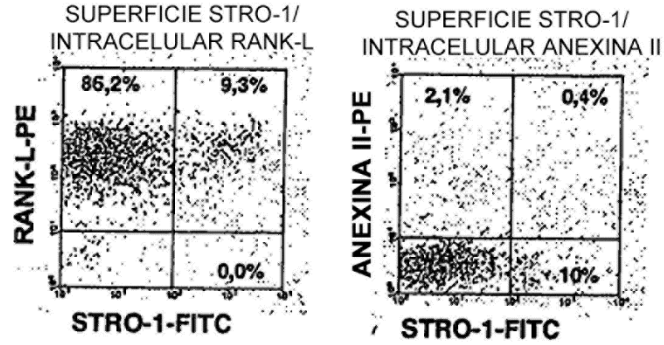
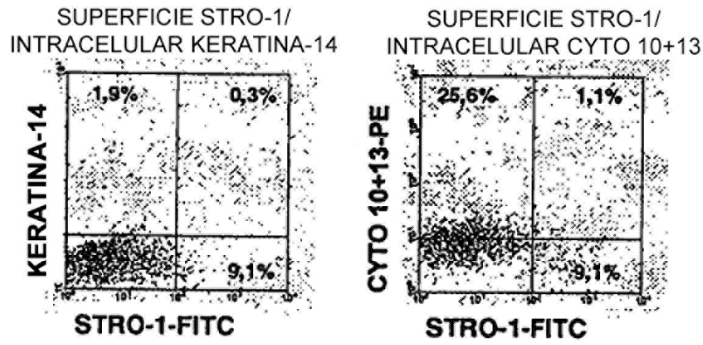


Figura 2

Hueso (cotinuación)



Epitelial



Condrocitos

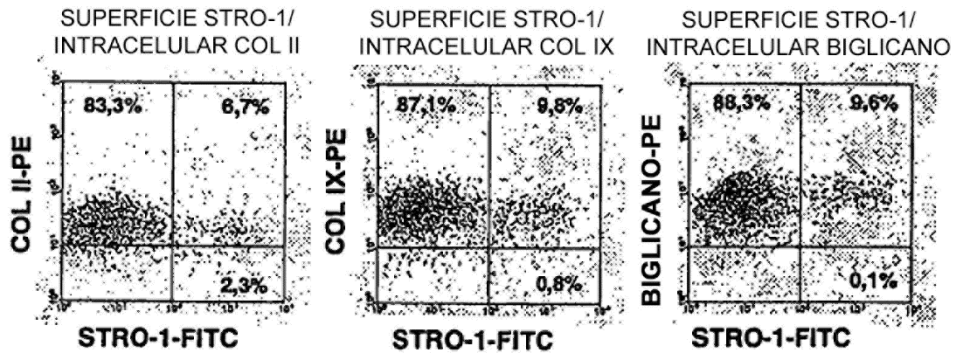
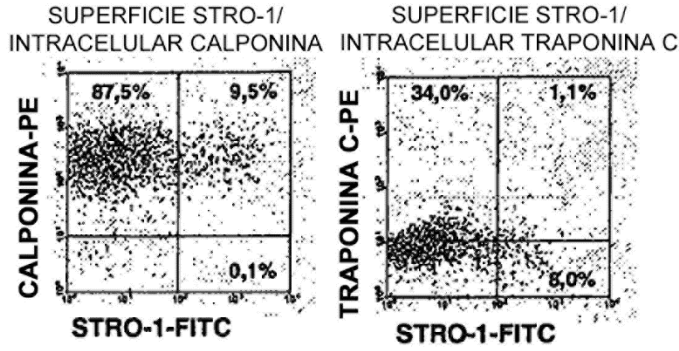
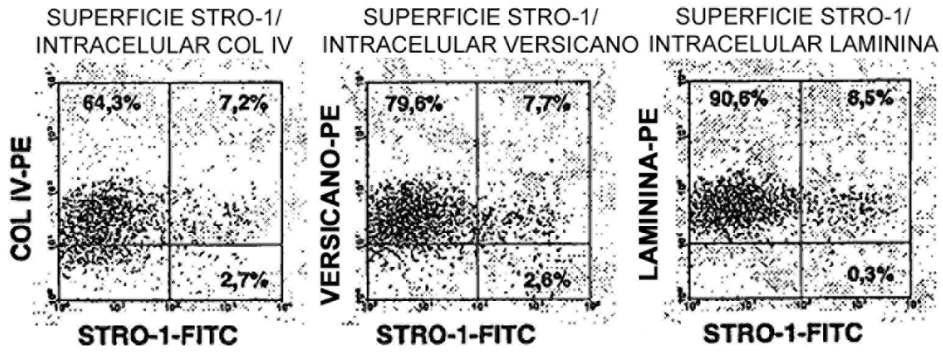


Figura 2 (cotinuación)

Cardiomiocitos



Fibroblastos basales



Músculo liso

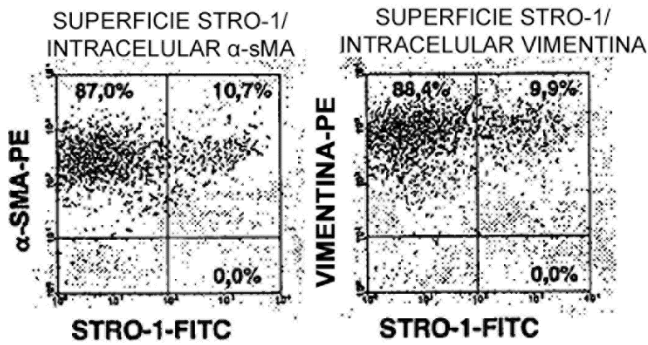
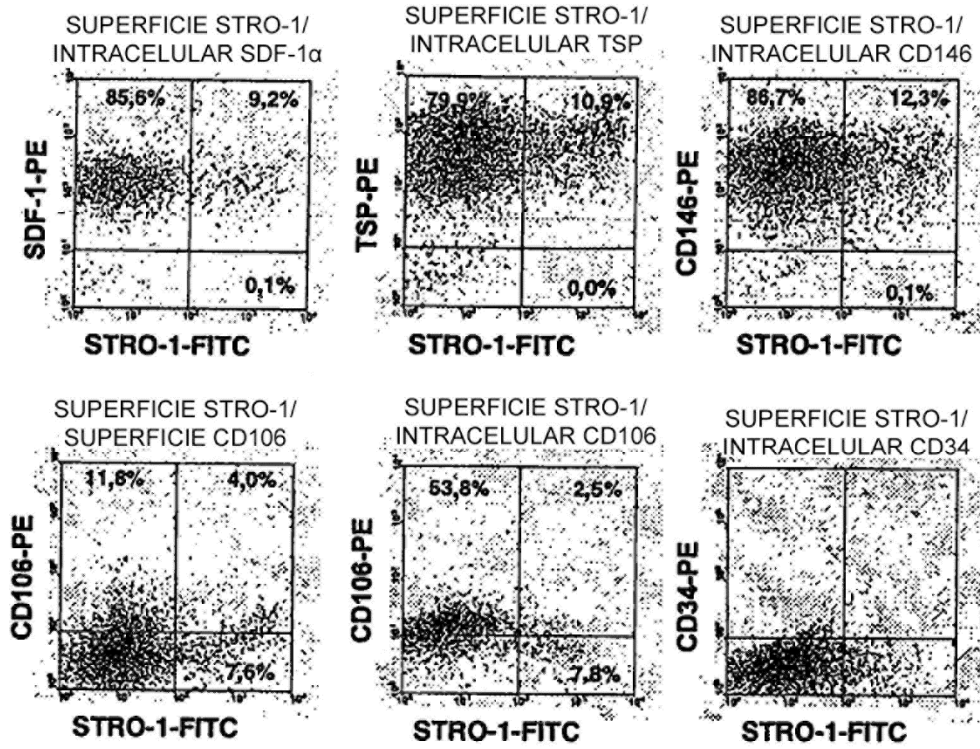


Figura 2 (continuación)

Células endoteliales



Receptores de factores de crecimiento - diversos tipos celulares

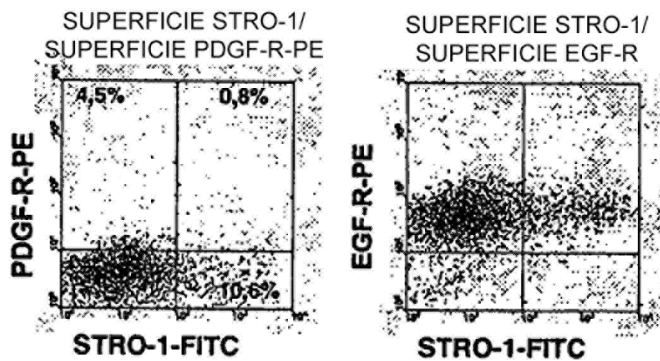


Figura 2 (continuación)

Neural

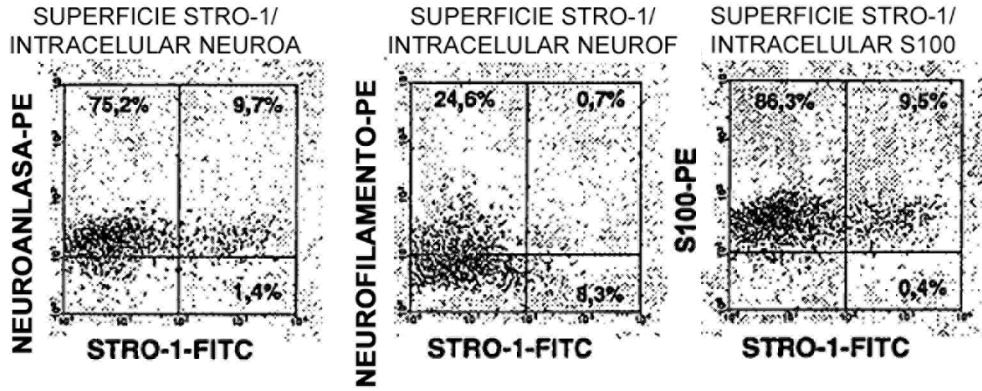


Figura 2 (continuación)

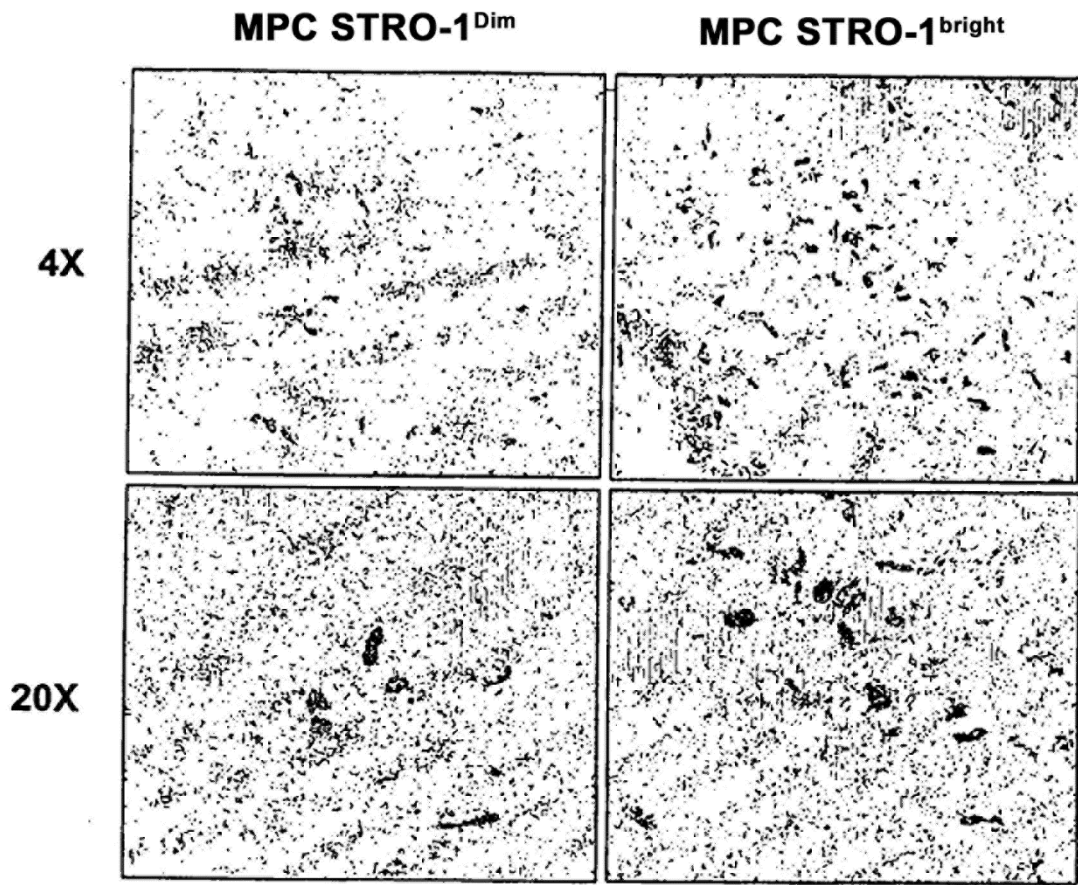


Figura 3

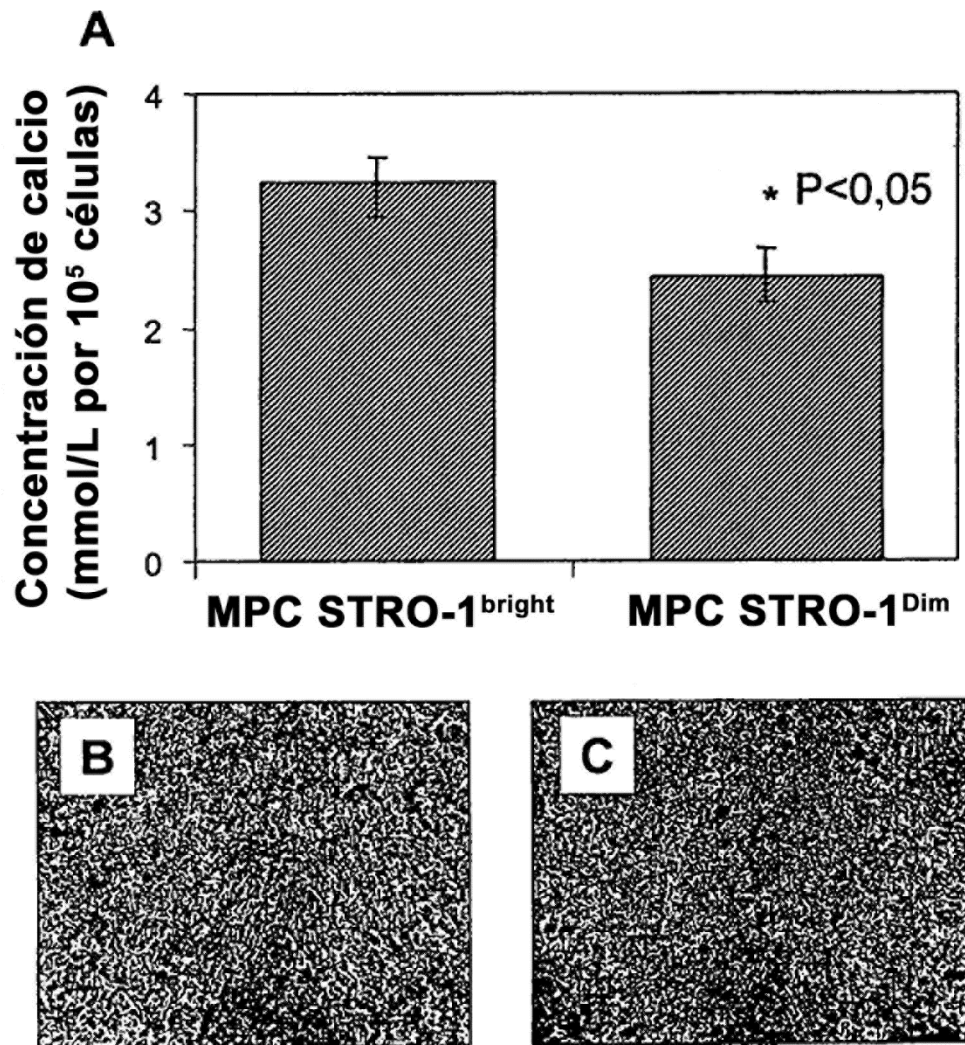


Figura 4

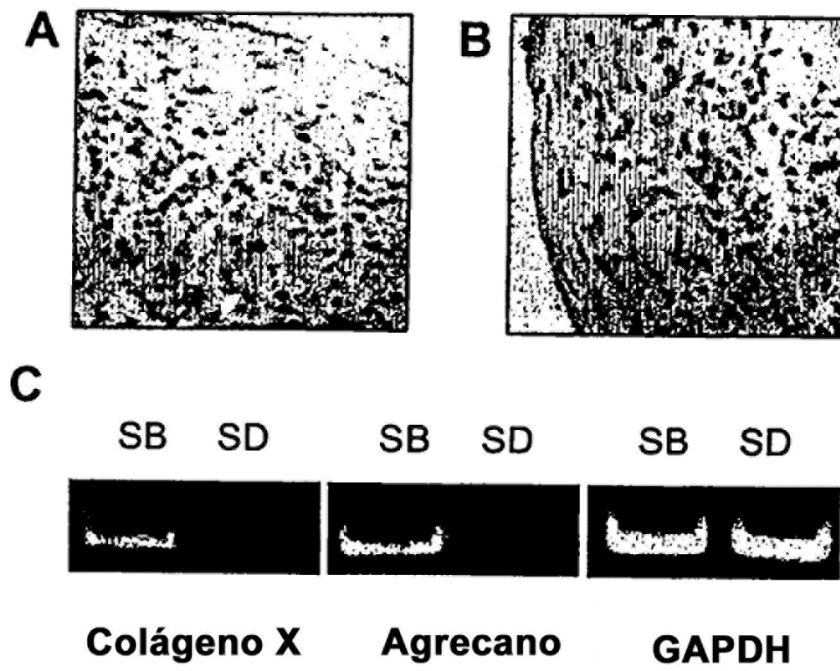


Figura 5

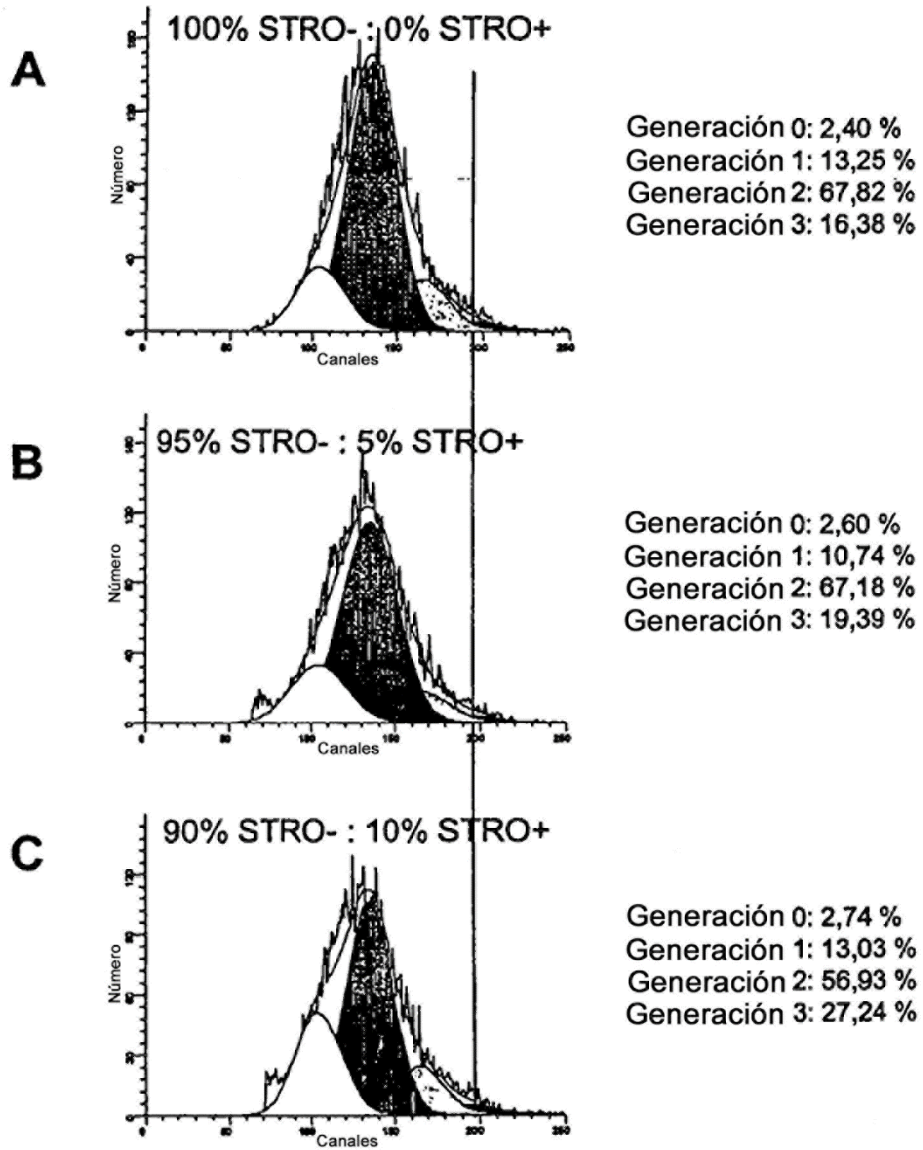


Figura 6

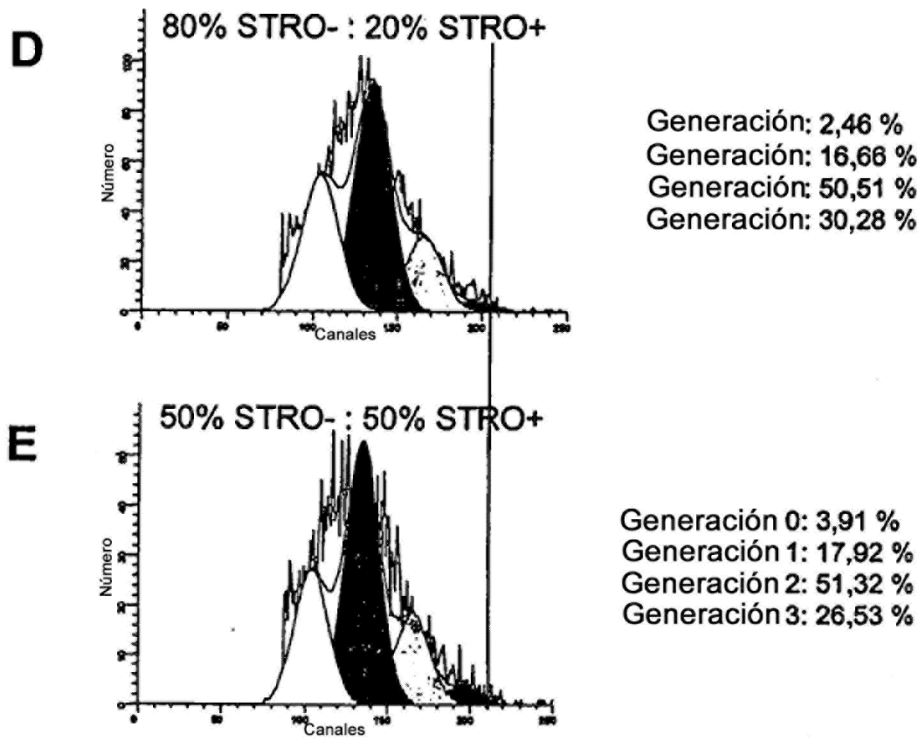


Figura 6 (continuación)

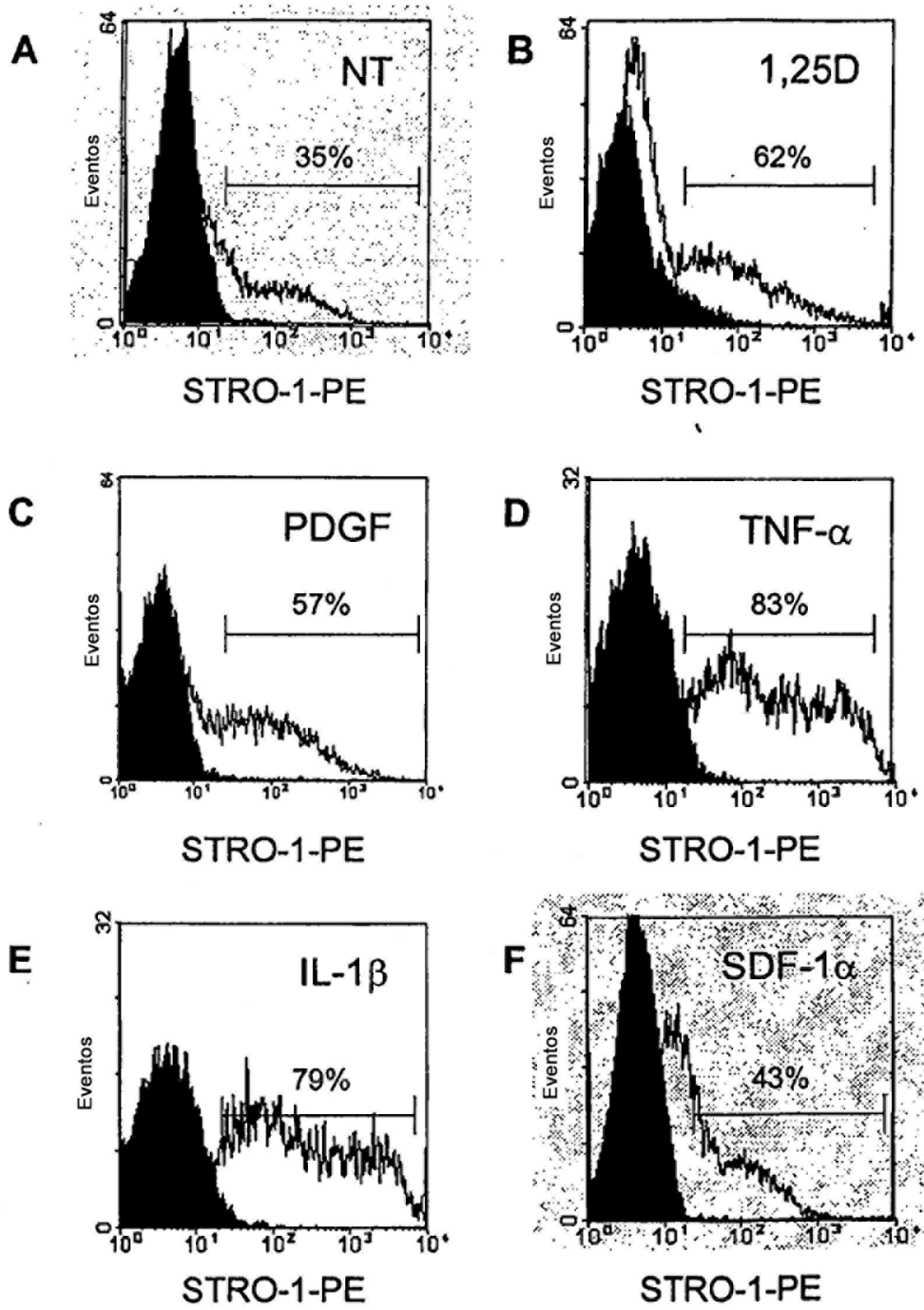


Figura 7

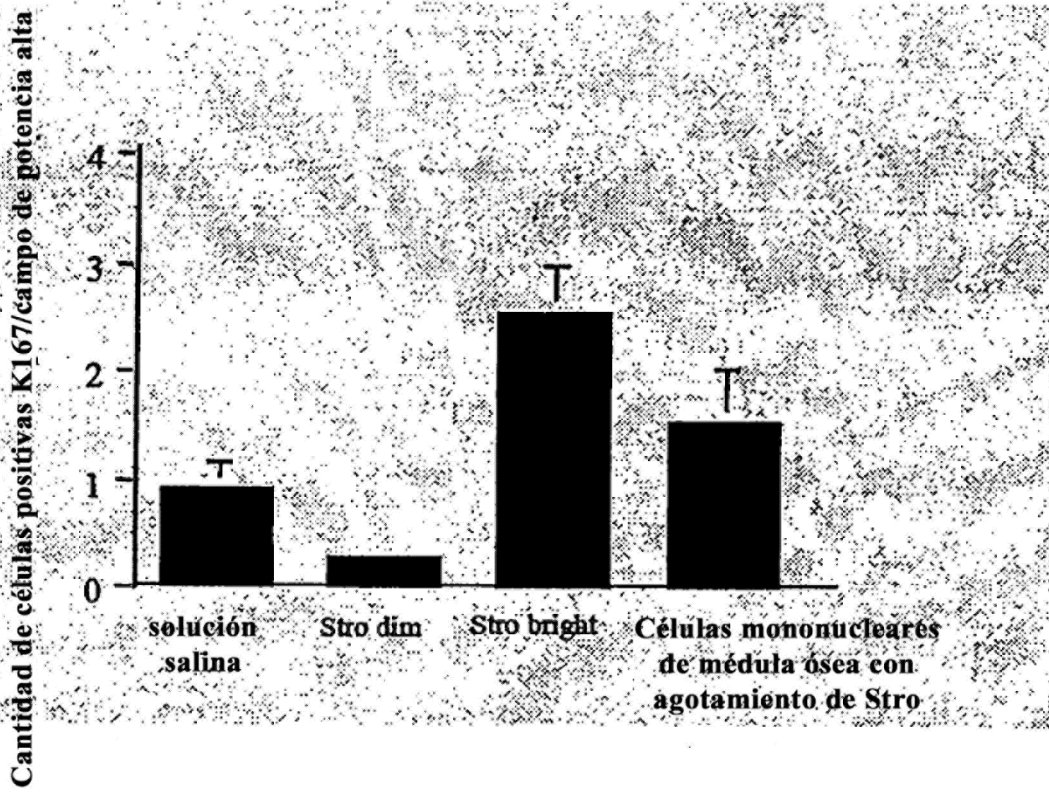


Figura 8

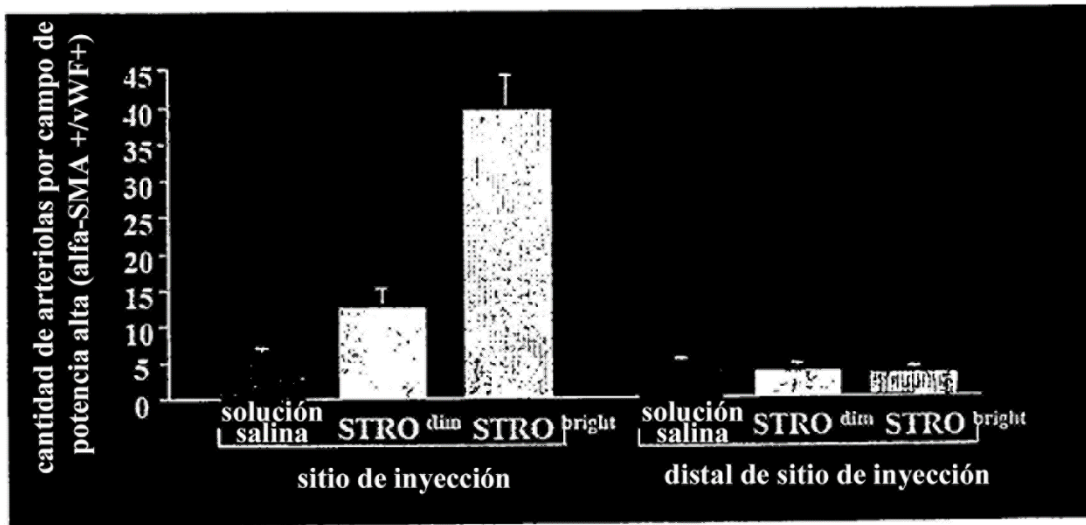


Figura 9

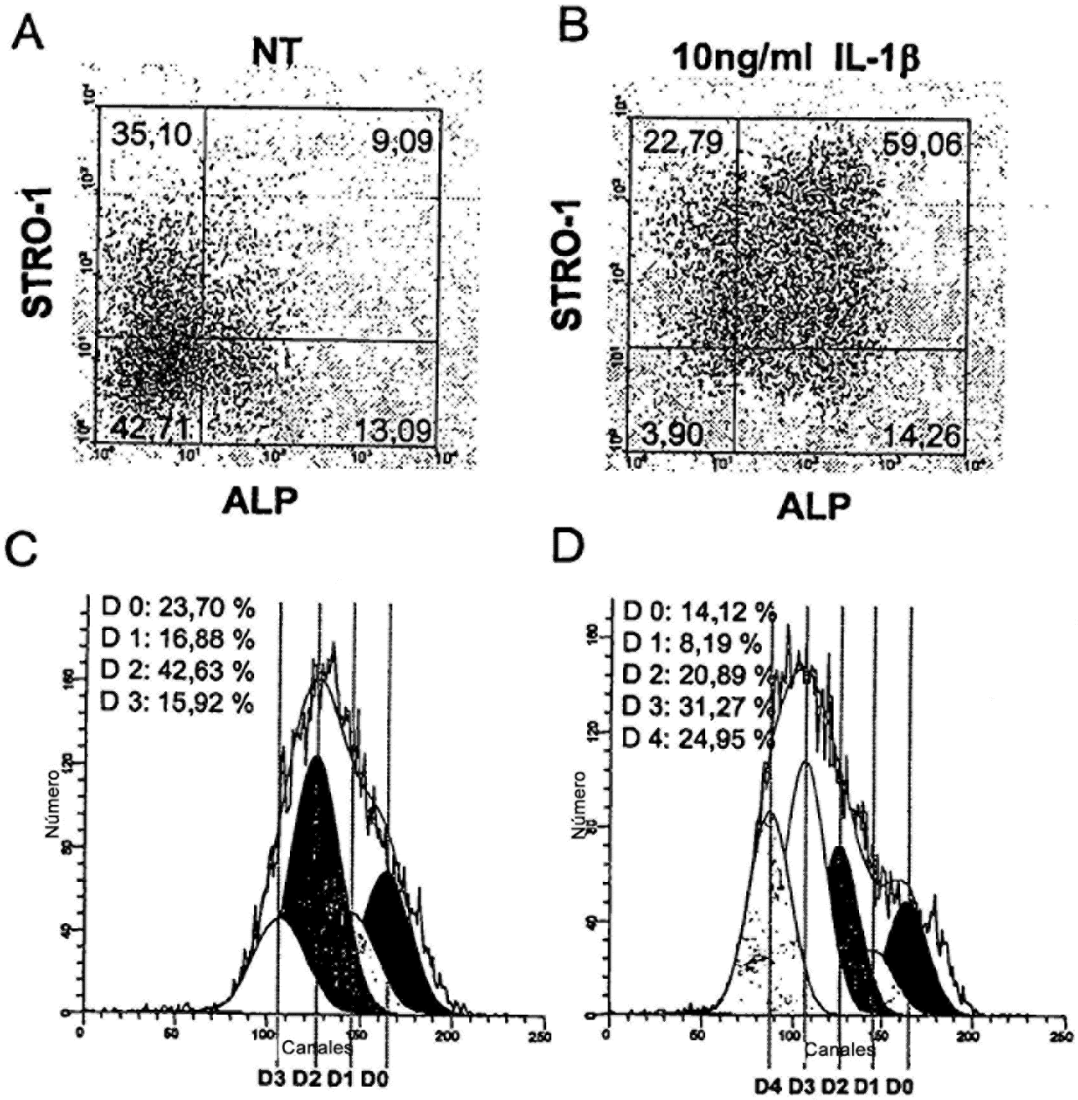


Figura 10

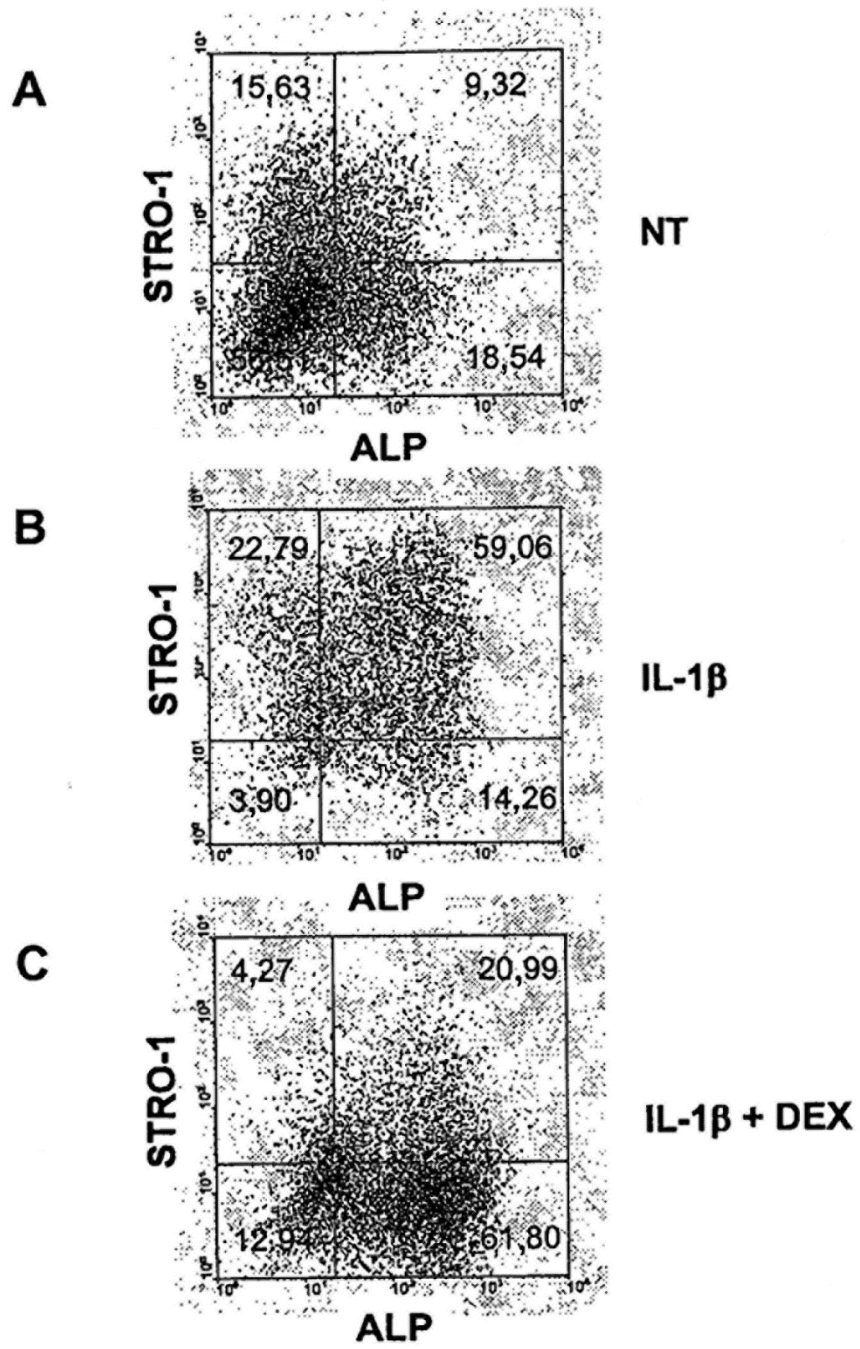


Figura 11

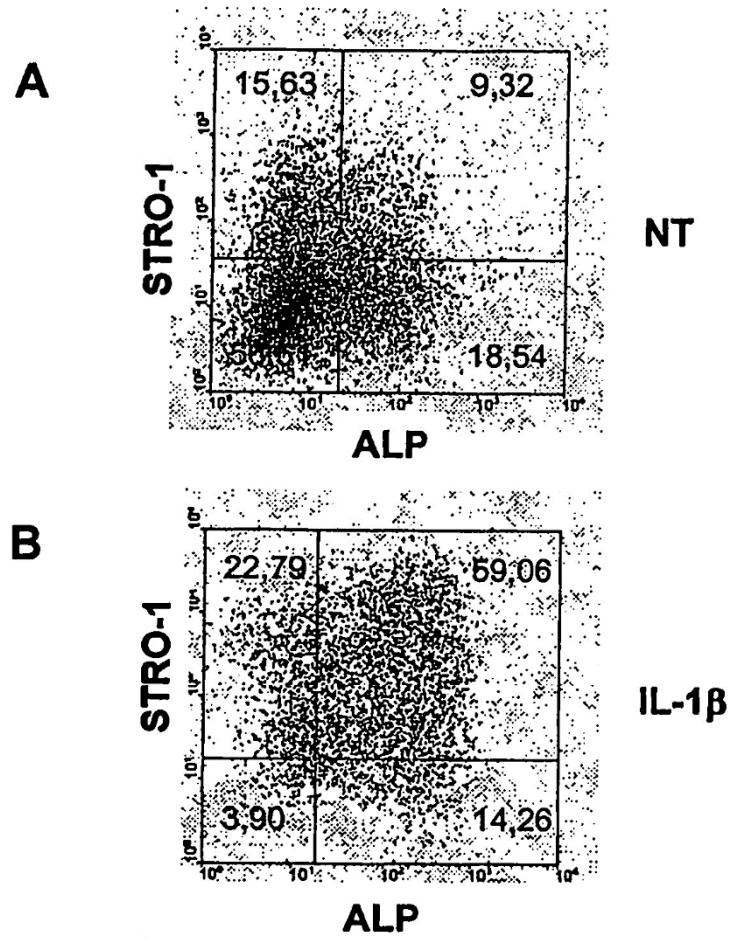


Figura 12

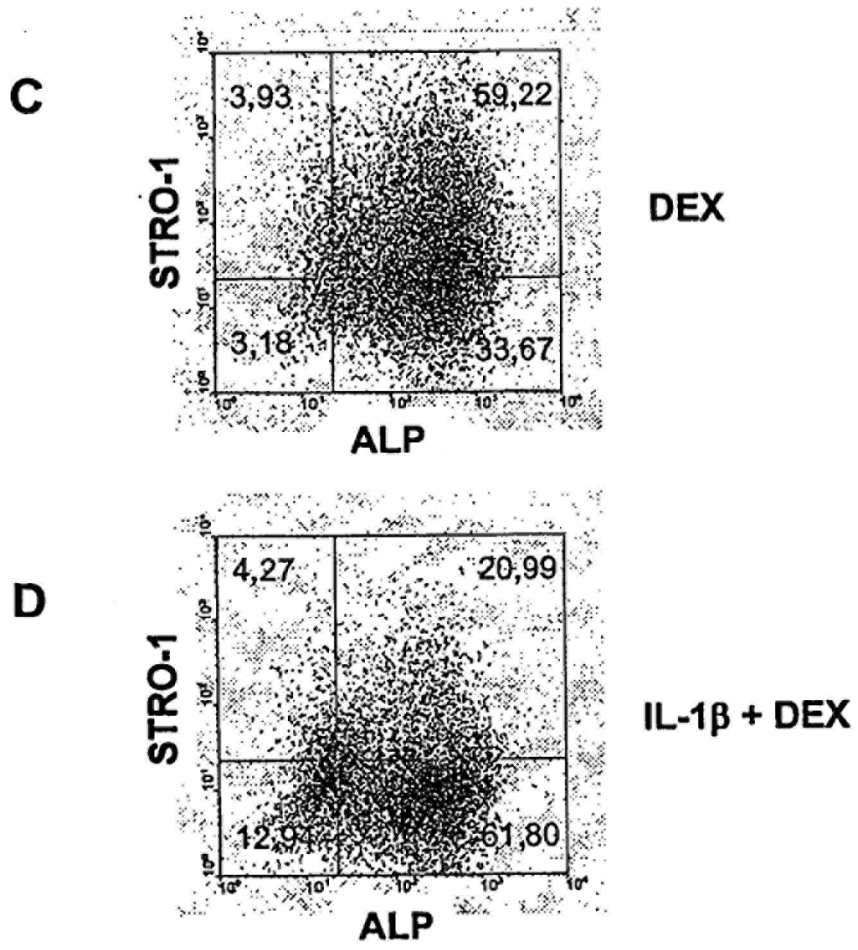


Figura 12 (continuación)

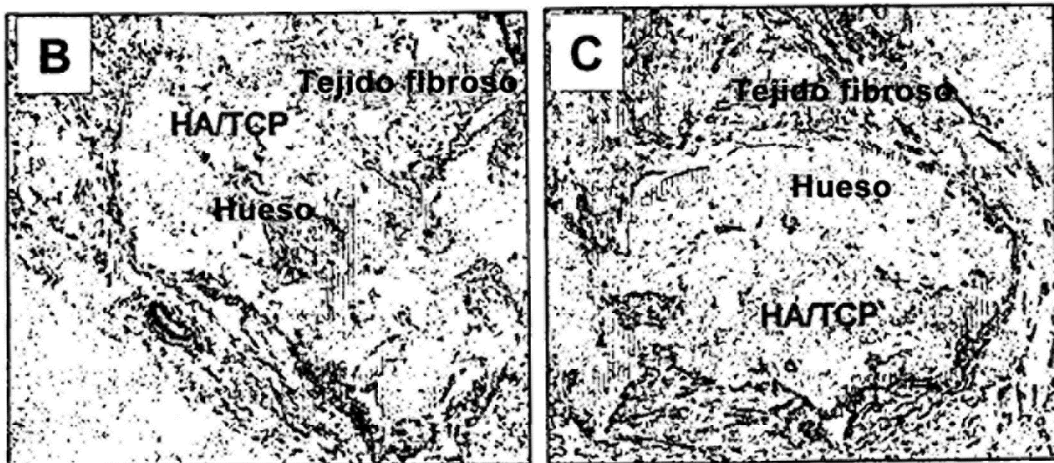
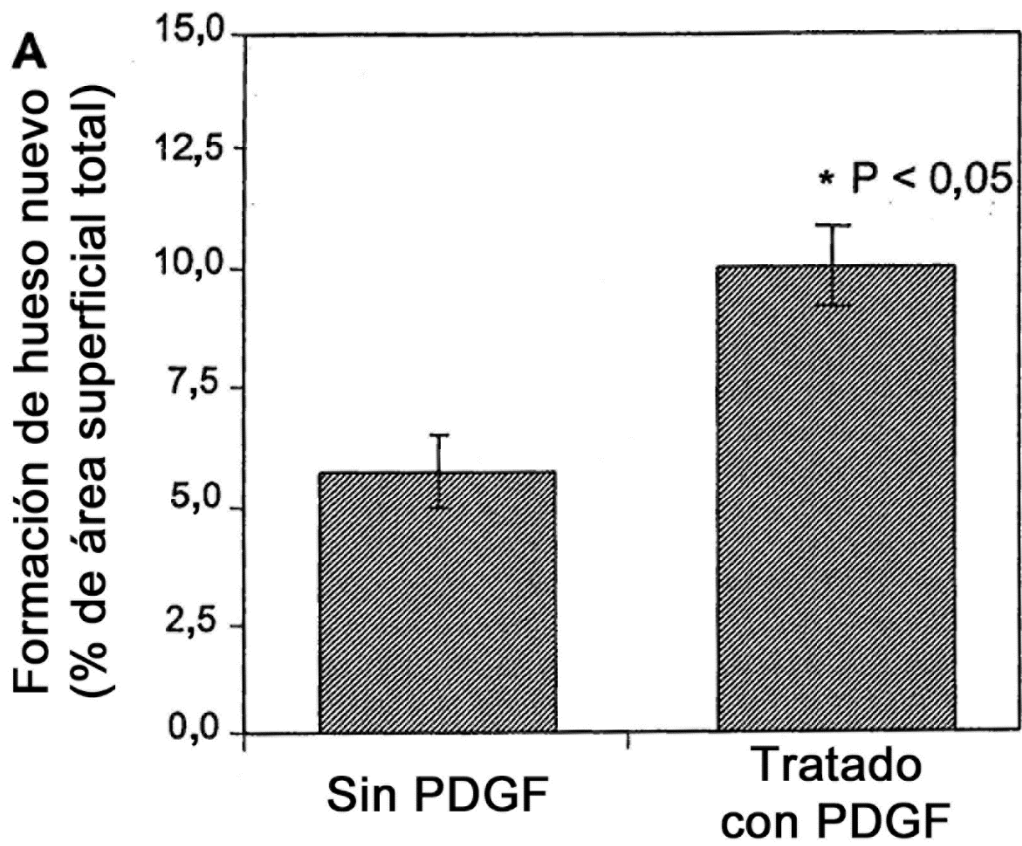


Figura 13

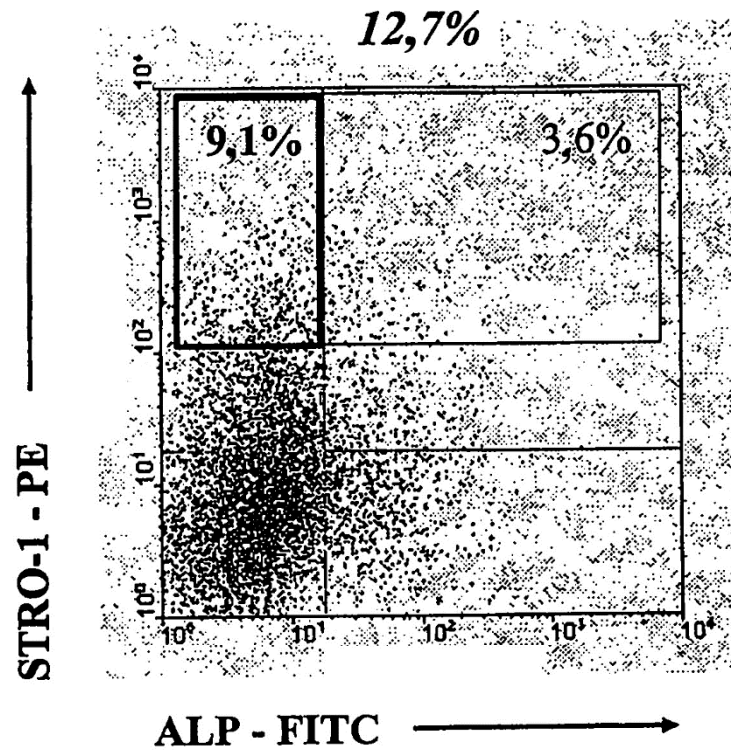


Figura 14