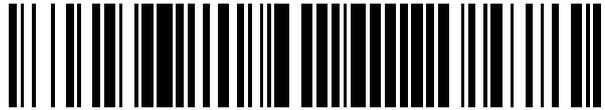


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 892 487**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6881 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2016 PCT/EP2016/060351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16180788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2016 E 16723062 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 3294904**

54 Título: **Procedimientos para evaluar la pureza de una preparación de células madre mesenquimales**

30 Prioridad:

08.05.2015 US 201562158875 P
31.07.2015 EP 15179417

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN (33.3%)
Place de l'Université 1
1348 Louvain-la-Neuve, BE;
CLINIQUES UNIVERSITAIRES SAINT-LUC (33.3%)
y
NOVADIP BIOSCIENCES SA (33.3%)

72 Inventor/es:

DUFRANE, DENIS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 892 487 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

Procedimientos para evaluar la pureza de una preparación de células madre mesenquimales

Campo de invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para evaluar la pureza de una preparación celular, en particular de una preparación de células madre mesenquimales. En particular, la presente invención se refiere a factores de crecimiento como biomarcador de la pureza de una preparación de células madre mesenquimales.

Antecedentes de la invención

10 El uso de terapias basadas en células madre para la reparación y regeneración de diversos tejidos y órganos ofrece soluciones terapéuticas alternativas para varias enfermedades. Las células madre mesenquimales (MSC) son células estromales adherentes al plástico que se caracterizan por su capacidad para diferenciarse en tejidos mesenquimales como huesos, cartílagos y grasas. Debido a estas propiedades, las MSC parecen ser una población ideal de células madre para la práctica de la medicina regenerativa. Una de las fuentes más ricas de MSC es el tejido adiposo y las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC) se investigan ampliamente para el desarrollo de nuevas terapias en el campo de la medicina regenerativa (como, por ejemplo, para la cicatrización de heridas, la regeneración de huesos/cartílagos, Enfermedad de Crohn...).

15 Los productos de terapia celular deben fabricarse siguiendo las recomendaciones de "Buenas prácticas de fabricación" que requieren un análisis de pureza de los productos celulares finales. Sin embargo, los fibroblastos pueden ser contaminantes celulares comunes que afectan la pureza de las preparaciones de células madre mesenquimales. Actualmente, los productos de terapia celular siguen sin caracterizarse en términos de pureza celular para las células fibroblásticas. De hecho, los criterios actualmente definidos para la caracterización de las células madre mesenquimales, incluidas las ASC, son (i) adherencia a plástico para la propagación y proliferación celular; (ii) perfil de marcadores de superficie (CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+); y (iii) capacidad de diferenciación hacia linajes adiposos/osteogénicos/condrogénicos. Sin embargo, las células madre mesenquimales y los fibroblastos se consideran hoy en día como una subfamilia sin capacidad para diferenciarse según estos criterios (Hematti, Cytotherapy, 2012; 14:516-521). Los fibroblastos son células ubicuas, presentes en tejidos variables (dermis, tejido adiposo, músculo ...). También son adherentes al plástico, expresan el fenotipo de marcador de superficie similar al de las MSC y tienen la capacidad de diferenciarse hacia los linajes mesenquimales cuando se cultivan en medios específicos.

20 Pocos estudios se refieren a la identificación de fibroblastos de otras células. Pilling et al. divulgan la identificación de marcadores que discriminan entre monocitos de sangre periférica humana, macrófagos tisulares, fibrocitos y fibroblastos (PLoS One. 2009, 4(10): e7475). Sin embargo, las células madre mesenquimales no se incluyen en este estudio. Además, Goodpaster et al. describen que los fibroblastos pueden ser identificados positivamente por el anticuerpo TE-7 que reconoce específicamente fibroblastos en crecimiento y en reposo en muestras de tejido fijadas con formalina e incrustadas en parafina (Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2008, 56(4):347-358). Sin embargo, el anticuerpo TE-7 no se probó en células madre mesenquimales.

25 Alt et al (Biol. Cell, 2011, 193(4): 197-208) y Blasi et al (Vascular cell, 2011, 3(1): 5) compararon perfiles de expresión de antígenos y genes de fibroblastos y MSC.

30 Por consiguiente, actualmente no existe un procedimiento cuantitativo y objetivo para distinguir las MSC de los fibroblastos. Sin embargo, los fibroblastos están asociados con células cancerosas en todas las etapas de la progresión del cáncer. Por tanto, un producto de terapia celular que comprende fibroblastos es potencialmente cancerígeno. Por tanto, existe una necesidad de herramientas para evaluar la pureza de una preparación de MSC con respecto a la contaminación fibroblástica, en particular en el contexto de la preparación de productos de terapia celular.

35 Los inventores de la presente memoria demuestran sorprendentemente que las células madre mesenquimales y los fibroblastos se pueden diferenciar según su capacidad para secretar factores tales como SDF-1 α y VEGF.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la presencia de fibroblastos en una preparación de células madre mesenquimales, por ejemplo, una composición que comprende células y para cuantificar la pureza de tal preparación.

Resumen

45 Esta invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para valorar, evaluar y/o controlar la pureza de una preparación celular heterogénea que comprende células madre mesenquimales (MSC) con respecto a la contaminación fibroblástica, en el que dicho procedimiento comprende medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento expresado por dicha preparación celular, en el que dicha preparación celular se cultiva en un medio que comprende de 2 a 10 g/l de glucosa, en el que dicho al menos un factor de crecimiento es VEGF y en el que dichas células madre mesenquimales son células madre adiposas (ASC).

Según una forma de realización, el procedimiento de la invención comprende además comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión de referencia.

5 Según una forma de realización, el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento expresado por dicha preparación celular de la invención se evalúa a nivel de proteína, preferiblemente mediante la detección y/o cuantificación de dicho al menos un factor de crecimiento secretado en el sobrenadante de cultivo celular. En una forma de realización particular, el nivel de expresión se evalúa a nivel de ARN, preferiblemente mediante RT-PCR, RT-qPCR, Northern Blot y/o técnicas de hibridación.

Según una forma de realización, el medio comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 g/l de glucosa, preferiblemente aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

10 Según otra forma de realización, la preparación celular de la invención es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF es de al menos 200 pg/ml en el medio de cultivo celular, preferiblemente de al menos 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml; dicha preparación celular se cultiva en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, antes de medir el nivel de expresión.

15 Según otra forma de realización, la preparación celular de la invención es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF es de al menos 90 pg/ml en el medio de cultivo celular, preferiblemente de al menos 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 pg/ml; dicha preparación celular se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, antes de medir el nivel de expresión.

20 Esta invención también se refiere al uso de VEGF como un biomarcador de la calidad de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales (MSC) con respecto a la contaminación fibroblástica, en particular de una preparación celular que comprende MSC para ser utilizada como producto de terapia celular a base de MSC en medicina regenerativa, en el que dichas MSC son células madre adiposas (ASC), y en el que dicha preparación celular se cultiva en un medio que comprende desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 g/l de glucosa.

25 Esta invención también abarca un kit para implementar el procedimiento *in vitro* como se describe anteriormente, en el que dicho kit comprende medios para determinar o medir el nivel de expresión de VEGF, que comprende además la referencia para comparar el nivel de expresión de VEGF; dicha referencia es una preparación pura de fibroblastos y/o una preparación pura de MSC que ha sido cultivada en un medio que comprende de 2 a 10 g/l de glucosa, y los medios para determinar o medir el nivel de expresión de VEGF se seleccionan en el grupo que consiste en anticuerpos
30 específicos de VEGF y cebadores de PCR o qPCR específicos de VEGF.

Definiciones

En la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

– "Pureza de una preparación celular" se refiere al enriquecimiento de células de interés de una población heterogénea (también denominada población mixta). Como se divulga en el presente documento, las células de la
35 invención son células madre mesenquimales, en particular células madre mesenquimales de tejido adiposo. Como se divulga en el presente documento, la pureza de acuerdo con la invención se expresa en porcentaje de células madre mesenquimales, en particular células madre mesenquimales de tejido adiposo, de una población mixta que comprende otros tipos de células, preferiblemente fibroblastos.

– Las "células madre mesenquimales" o MSC son células madre multipotentes que pueden diferenciarse en una
40 variedad de tipos de células que incluyen: linajes osteogénicos, condrogénicos, adipogénicos, estromales mielofavorables, miogénicos o neurogénicos. Las células madre mesenquimales se pueden aislar de tejidos que incluyen, sin limitación, tejido adiposo, médula ósea, tejido del cordón umbilical, líquido amniótico, gelatina de Wharton, placenta, sangre periférica, trompas de Falopio, estroma corneal, tejido de pulmón, músculo, piel, hueso, dental, líquido premenstrual, prepucio e hígado fetal, y similares.

– "Tejido adiposo" se refiere a cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón, amarillo o
45 blanco. Preferiblemente, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. El tejido adiposo incluye adipocitos y estroma. El tejido adiposo se puede encontrar en todo el cuerpo de un animal. Por ejemplo, en los mamíferos, el tejido adiposo puede estar presente en el mesenterio, la médula ósea, el espacio subcutáneo, las almohadillas de grasa (por ejemplo, las almohadillas de grasa escapular o infrapatelar) y alrededor de la mayoría de los órganos. Las células
50 obtenidas del tejido adiposo pueden comprender un cultivo celular primario o una línea celular progenitora. El tejido adiposo puede ser de cualquier organismo que tenga tejido graso.

– "Célula derivada de tejido adiposo" se refiere a una célula que se origina a partir del tejido adiposo. En particular, "células madre mesenquimales de tejido adiposo" (ASC) se refieren a células estromales que se originan a partir de
55 tejido adiposo que pueden servir como precursoras de una variedad de diferentes tipos de células tales como, pero sin limitarse a, adipocitos, osteocitos, condrocitos.

- "Factor de crecimiento" se refiere a cualquier sustancia que participa en la regulación de la proliferación o diferenciación celular.
- "Niveles de oxígeno tisular" se refiere a niveles de oxígeno de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 6%, preferiblemente a un nivel de oxígeno de aproximadamente el 5%.
- 5 – "Entorno hipóxico" se refiere a niveles de oxígeno de aproximadamente 0% a aproximadamente 1%, preferiblemente a un nivel de oxígeno de aproximadamente 0.1%.
- "Condiciones normoglucémicas" se refieren a una concentración de glucosa de aproximadamente 0.5 g/l a aproximadamente 1.5 g/l, preferiblemente a una concentración de glucosa de aproximadamente 1 g/l.
- 10 – "Condiciones hiperglucémicas" se refieren a una concentración de glucosa de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 10 g/l, preferiblemente de aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 6 g/l, más preferiblemente a una concentración de glucosa de aproximadamente 4.5 g/l.
- "Aproximadamente", precedente a un valor, significa más o menos el 10% de dicho valor.
- "De paso", también conocido como subcultivo o división de células, se refiere a la transferencia de una pequeña cantidad de células a un nuevo recipiente cuando las células están en confluencia o casi, para prolongar la vida y/o expandir el número de células en el cultivo. Como se divulga en el presente documento, el paso 0 (P0) es el punto en el que las células se colocaron inicialmente en cultivo.
- 15 – "Célula madre mesenquimatosa de pases tardíos" se refiere a una célula que presenta una característica menos inmunogénica en comparación con una célula de pases más tempranos. La inmunogenicidad de una célula madre mesenquimatosa corresponde al número de pases. Preferiblemente, la celda ha sido pasada hasta al menos el cuarto pase; más preferiblemente, la celda ha sido pasada hasta al menos el sexto pase, y más preferiblemente, la celda ha sido pasada hasta al menos el octavo pase.
- 20

Descripción detallada

25 Esta divulgación se refiere a un procedimiento, preferiblemente un procedimiento *in vitro*, para valorar, evaluar y/o controlar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales (MSC), por ejemplo, una composición de células que comprende MSC; dicho procedimiento comprende determinar o medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento expresado por dicha preparación celular. En una forma de realización, las MSC son células madre mesenquimales (ASC) derivadas de tejido adiposo.

30 Esta invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para valorar, evaluar y/o controlar la pureza de una preparación celular heterogénea que comprende células madre mesenquimales (MSC) con respecto a la contaminación fibroblástica; dicho procedimiento comprende medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento expresado por dicha preparación celular; dicha preparación celular se cultiva en un medio que comprende de 2 a 10 g/l de glucosa; dicho al menos un factor de crecimiento es VEGF y dichas células madre mesenquimales son células madre adiposas (ASC).

35 En una forma de realización, el procedimiento de la invención es para evaluar la presencia de fibroblastos en una preparación celular que comprende células madre mesenquimales. Según esta forma de realización, el procedimiento de la invención puede corresponder así a un procedimiento de control de calidad, destinado a comprobar, por ejemplo, la pureza de una preparación celular que comprende MSC con respecto a la contaminación fibroblástica. Esas MSC pueden usarse, por ejemplo, para productos de terapia celular a base de MSC.

40 El procedimiento de la divulgación es para cuantificar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales. Como se divulga en el presente documento, la preparación celular es una preparación heterogénea que comprende células madre mesenquimales y otros tipos de células. Como se divulga en el presente documento, la preparación celular comprende células madre mesenquimales y fibroblastos.

El procedimiento de la divulgación es para cuantificar el porcentaje de células madre mesenquimales de una población heterogénea que comprende células madre mesenquimales y otros tipos de células, preferiblemente fibroblastos.

45 La solicitante demostró que con contaminaciones progresivas de MSC por fibroblastos, el nivel de expresión de factores de crecimiento tiende a aumentar o disminuir. En consecuencia, esta invención demuestra la capacidad de discriminar MSC de fibroblastos basándose en la expresión de sus factores de crecimiento específicos. En particular, la discriminación puede basarse en la expresión de sus factores de crecimiento en condiciones específicas de oxigenación y/o glucemia.

50 Por tanto, en una forma de realización, el procedimiento de la invención es para valorar, evaluar y/o controlar la pureza de una preparación celular que comprende MSC con respecto a la contaminación fibroblástica, en base a la expresión de sus factores de crecimiento específicos.

Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, adipocitocinas, angiopoyetinas, proteínas de tipo angiopoyetina y receptores de las mismas, quimiocinas y receptores de las mismas, receptores de cadena beta comunes, receptores de cadena gamma comunes, EGF, FGF, proteínas de erizo, IGF, interferones, interleucinas y receptores, PDGF, TGF, TNF, VEGF, SDF-1 y Wnt.

5 Un procedimiento de la presente divulgación comprende medir el nivel de expresión de SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales, también conocido como quimiocina 12 con motivo CXC o CXCL12, factor estimulante del crecimiento de células pre-B (PBSF), SCYB12 o TLSF) y/o VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). Preferiblemente, SDF-1 está en forma de SDF-1 α .

10 Un procedimiento según la divulgación comprende medir el nivel de expresión de SDF-1 α . El procedimiento según la invención comprende medir el nivel de expresión de VEGF. Otro procedimiento según la divulgación comprende medir el nivel de expresión de SDF-1 α y VEGF.

15 Según la divulgación, las MSC se aíslan de tejidos seleccionados del grupo que comprende tejido adiposo, médula ósea, sangre del cordón umbilical, gelatina de Wharton (como, por ejemplo, gelatina de Wharton que se encuentra dentro del cordón umbilical), placenta, sangre periférica, trompa de Falopio, estroma corneal, pulmón, piel muscular, hueso, tejido dental e hígado fetal, o similares. En una forma de realización particular, las MSC se aíslan del tejido adiposo. En una forma de realización preferida, las MSC son células madre adiposas (ASC).

Como se divulga en el presente documento, las MSC se aíslan de cualquier tejido animal de sangre caliente, preferiblemente de tejidos humanos. En una forma de realización particular, las MSC son ASC humanas.

20 Como se divulga en el presente documento, las células son células en cultivo, preferiblemente son líneas celulares y/o se derivan de células primarias, es decir, células aisladas directamente del tejido. Como se divulga en el presente documento, las células se recuperan de una muestra de un individuo, obtenida, por ejemplo, mediante biopsia. Preferiblemente, el paso de recuperar la muestra de un individuo no forma parte del procedimiento de la presente invención.

25 El aislamiento de células madre mesenquimales se puede lograr mediante cualquier procedimiento aceptable conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos de procedimientos para aislar MSC incluyen, pero no se limitan a, digestión por colagenasa, tripsinización o cultivo de explantes.

Como se divulga en el presente documento, las células madre mesenquimales se aíslan del tejido adiposo mediante digestión del tejido, por ejemplo, mediante colagenasa.

30 De acuerdo con la presente divulgación, después del aislamiento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en cualquier medio de cultivo diseñado para apoyar el crecimiento de las células conocido por un experto en la técnica. Como se usa en el presente documento, dicho medio de cultivo se denomina "medio de proliferación" o "medio de crecimiento". Los ejemplos de medio de crecimiento incluyen, sin limitación, MEM, DMEM, IMDM, RPMI 1640, FGM o FGM-2, medio 199/109, HamF10/HamF12 o McCoy 5A, preferiblemente DMEM o RPMI.

35 Como se divulga en el presente documento, el medio de crecimiento puede comprender además cualquier factor suplementario conocido por el experto en la técnica y que pueda usarse en cultivo celular. Los ejemplos de factores complementarios incluyen, entre otros, FBS; glicina; aminoácidos, tales como glutamina, asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina, prolina o alanina, preferiblemente la configuración L de los aminoácidos; y antibióticos, como estreptomina o penicilina.

40 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en DMEM complementado con suero bovino fetal, glutamina, preferiblemente L-glutamina, y antibióticos tales como penicilina, estreptomina y anfotericina B.

En una forma de realización, la preparación celular que comprende MSC puede estar contaminada por otros tipos de células tales como, por ejemplo, por fibroblastos. En una forma de realización particular, la preparación celular que comprende MSC está contaminada por fibroblastos.

45 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en medio de crecimiento hasta al menos 2 pases, preferiblemente al menos 3 pases, más preferiblemente al menos 4 pases. Como se usa en este documento, el término "cultivado hasta al menos 4 pases" significa que la preparación celular se desprende

50 Para el paso de células, las células pueden desprenderse mediante uno de varios procedimientos conocidos por un experto en la técnica, incluido el tratamiento con tripsina para descomponer las proteínas responsables de la adherencia a la superficie, quelar los iones de sodio con EDTA, lo que altera algunos mecanismos de adherencia de proteínas. o procedimientos mecánicos como el lavado repetido o el uso de un raspador de celdas. Las células desprendidas se resuspenden luego en medio fresco.

5 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva durante al menos 24 horas, preferiblemente durante al menos 36, 48, 60 o 72 horas. Como también se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva durante al menos 1 día, preferiblemente durante al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. Como se divulga adicionalmente en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva durante al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 días.

Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en condiciones de cultivo estándar. Como se usa en este documento, "condiciones de cultivo estándar" significa a una temperatura de aproximadamente 37°C, y a una tensión de aproximadamente 21% de O₂ y de aproximadamente 5% de CO₂.

10 Como se divulga en el presente documento, la etapa de cultivar la preparación celular que comprende MSC no forma parte del procedimiento de la presente invención.

Como se divulga en el presente documento, las condiciones de cultivo de la preparación celular que comprende MSC se cambian antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento.

15 Como se usa en este documento, el término "antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento" significa al menos 6 horas, preferiblemente al menos 9, 12, 15, 18 o 24 horas entre el último pase y la medición del nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento.

20 Como se describe en este documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a una tensión de oxígeno de no más del 21%, preferiblemente como máximo del 15%, más preferiblemente como máximo del 10% antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. Como también se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a un nivel de oxígeno de aproximadamente 3% a aproximadamente 6%, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂ correspondiente a la tensión de oxígeno tisular antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. Como se divulga adicionalmente en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a un nivel de oxígeno de aproximadamente 0% a aproximadamente 1%, a aproximadamente 0.1% de O₂ correspondiente al entorno hipóxico antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento.

25 Como se describe en este documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en un medio que comprende desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 g/l de glucosa, preferiblemente desde aproximadamente 0.5 a aproximadamente 6 g/l de glucosa, más preferiblemente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento.

30 Como se describe en este documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en un medio que comprende una concentración baja de glucosa, correspondiente a los niveles normales de azúcar en sangre in vivo, es decir, en un medio que comprende de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1.5 g/l de glucosa, preferiblemente alrededor de 1 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. En una forma de realización, la preparación celular que comprende MSC se cultiva en un medio que comprende una alta concentración de glucosa, correspondiente a condiciones hiperglucémicas; es decir, en un medio que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 g/l de glucosa, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 g/l de glucosa, más preferiblemente alrededor de 4.5 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento.

40 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 21% de O₂ y aproximadamente 1 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. En una forma de realización, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 21% de O₂ y aproximadamente 4.5 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente un 5% de O₂ y aproximadamente 1 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. En una forma de realización, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 5% de O₂ y aproximadamente 4.5 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 0.1% de O₂ y aproximadamente 1 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento. En una forma de realización, la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 0.1% de O₂ y aproximadamente 4.5 g/l de glucosa antes de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento.

Según la presente divulgación, las condiciones de cultivo de la preparación celular que comprende MSC son siempre las mismas durante todas las etapas del procedimiento de la invención.

Un procedimiento divulgado comprende las siguientes etapas:

- a) cultiva una preparación celular que comprende células madre mesenquimales,
- 55 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, y

c) cuantificar el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF.

Un procedimiento divulgado para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- 5 a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂, y
 c) cuantificar el nivel de expresión de SDF-1 α y/o VEGF.

Un procedimiento divulgado para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- 10 a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂, y
 c) cuantificar el nivel de expresión de SDF-1 α .

15 Un procedimiento divulgado para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂, y
 c) cuantificar el nivel de expresión de SDF-1 α y VEGF.

20 Como se usa en este documento, el término "expresión" puede referirse alternativamente a la transcripción de un factor de crecimiento (es decir, la expresión del ARN) o a la traducción (es decir, la expresión de la proteína) de un factor de crecimiento, o a la presencia del factor de crecimiento en el sobrenadante de las células en cultivo (es decir, a la secreción del factor de crecimiento).

25 Los procedimientos para determinar el nivel de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, determinar el transcriptoma (en una forma de realización en la que la expresión se relaciona con la transcripción de un factor de crecimiento) o el proteoma (en una forma de realización en la que la expresión se relaciona a la traducción o secreción de un factor de crecimiento) de una célula.

30 En una forma de realización de la invención, la expresión del factor de crecimiento se evalúa a nivel de ARN. Los procedimientos para evaluar el nivel de transcripción de un factor de crecimiento son bien conocidos en la técnica anterior. Los ejemplos de tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, RT-PCR, RT-qPCR, Northern Blot, técnicas de hibridación como, por ejemplo, el uso de micromatrices y combinaciones de los mismos que incluyen, pero no se limitan a, hibridación de amplicones obtenidos por RT-PCR, secuenciación como, por ejemplo, secuenciación de ADN de próxima generación (NGS) o secuenciación de ARN (también conocida como "secuenciación de escopeta de transcriptoma completo") y similares.

35 En otra forma de realización de la invención, la expresión del factor de crecimiento se evalúa a nivel de proteína. Los procedimientos para determinar un nivel de proteína en una muestra son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica, procedimientos múltiples (Luminex), western blot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ELISA tipo sándwich, ensayo inmunoabsorbente ligado a fluorescencia (FLISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), citometría de flujo (FACS) y similares. Preferiblemente, la determinación del nivel de proteína del factor de crecimiento se evalúa mediante un
 40 ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

45 En una forma de realización de la invención, la determinación del nivel de expresión del factor de crecimiento corresponde específicamente a la detección y cuantificación de dicho factor de crecimiento secretado en el sobrenadante del cultivo celular. El procedimiento de la invención comprende medir el nivel de expresión de VEGF en el sobrenadante del cultivo celular de la preparación celular que comprende MSC.

50 Como se divulga en el presente documento, la etapa de medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento se realiza cuando las MSC comprendidas en la preparación celular tienen una densidad que conduce a aproximadamente un 80% de confluencia, de preferencia a aproximadamente 85, 90, 95, 99 o 100% de confluencia. En el sentido de la divulgación, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando dicha preparación celular comprende menos del 25% de fibroblastos, preferiblemente menos del 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11% de los fibroblastos. Como se divulga en el presente documento, la preparación celular

que comprende MSC es sustancialmente pura cuando dicha preparación celular comprende menos del 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% de fibroblastos.

5 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC es como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

10 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a aproximadamente 21% de O₂, es como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, es como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

15 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, es como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

20 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa, es como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

25 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, es como máximo 50 pg/ml, preferiblemente como máximo 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

30 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a aproximadamente 21% de O₂ y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa, es como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

35 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a aproximadamente 21% de O₂ y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, es como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

40 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa, es como máximo 100 pg/ml, preferiblemente como máximo 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

45 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, es como máximo 50 pg/ml, preferiblemente como máximo 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

50 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada en condición hipóxica, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa, es como máximo 100 pg/ml, preferiblemente como máximo 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

55 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC cultivada en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, es como máximo 50 pg/ml, preferiblemente como máximo 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

Según una forma de realización, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC cultivada en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, es al menos de 200 pg/ml, preferiblemente al menos 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml.

Según otra forma de realización, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, es al menos de 90 pg/ml, preferiblemente al menos de 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 188, 119 o 120 pg/ml.

Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa, es al menos de 160 pg/ml, preferiblemente al menos de 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 o 169 pg/ml, más preferiblemente al menos de 170 pg/ml.

Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando la preparación celular que comprende MSC cultivada en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a una alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, presenta un nivel de expresión de SDF-1α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 200 pg/ml, preferiblemente de al menos 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml.

Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, presenta un nivel de expresión de SDF-1α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 90 pg/ml, preferiblemente de al menos 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 188, 119 o 120 pg/ml.

Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando la preparación celular que comprende MSC cultivada a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa, presenta un nivel de expresión de SDF-1α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 160 pg/ml, preferiblemente al menos de 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 o 169 pg/ml, más preferiblemente al menos 170 pg/ml.

Un procedimiento divulgado comprende las siguientes etapas:

- a) cultiva una preparación celular que comprende células madre mesenquimales,
- b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, y
- c) cuantificar la secreción de al menos un factor de crecimiento en el sobrenadante del cultivo celular, preferiblemente SDF-1α y/o VEGF.

Un procedimiento de la presente divulgación para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
- b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂, y
- c) cuantificar la secreción de SDF-1α y/o VEGF en el sobrenadante del cultivo celular.

Un procedimiento de la presente divulgación para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
- b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂, y
- c) cuantificar la secreción de SDF-1α en el sobrenadante del cultivo celular.

Un procedimiento de la presente divulgación para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
- 5 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂, y
- c) cuantificar la secreción de SDF-1 α y VEGF en el sobrenadante del cultivo celular.

El procedimiento de la presente divulgación comprende además una etapa de comparar el nivel de expresión medido con un nivel de referencia.

10 Como se usa en este documento, el término "referencia" abarca ampliamente cualquier nivel de expresión de referencia adecuado que pueda usarse como base para la comparación con respecto al nivel de expresión medido.

15 Como se divulga en el presente documento, la referencia es una preparación de fibroblastos pura. Como se usa en el presente documento, "una preparación de fibroblastos pura", por ejemplo, una composición que comprende fibroblastos, significa una preparación que se sabe que está libre de cualquier otro tipo de células distintas de fibroblastos. Como se divulga en el presente documento, la preparación de fibroblastos pura se cultiva en las mismas condiciones que la preparación celular que comprende MSC.

20 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC es significativamente más bajo que el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación de fibroblastos pura. Como se usa en este documento, el término "significativamente más bajo" significa al menos 1,5 veces más bajo, preferiblemente al menos 2, 3 o 4 veces más bajo, más preferiblemente al menos 5, 6, 7 u 8 veces más bajo.

25 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC es significativamente más alto que el nivel de expresión de VEGF de la preparación de fibroblastos pura. Como se usa en este documento, el término "significativamente más alto" significa al menos 1,5 veces más alto, preferiblemente al menos 2 veces más alto, más preferiblemente al menos 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 o 2.5 veces más alto.

30 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC es significativamente más bajo que el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación de fibroblastos pura y cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC es significativamente más alta que el nivel de expresión de VEGF de la preparación de fibroblastos pura.

35 Como se divulga en el presente documento, la muestra de referencia es una preparación pura de células madre mesenquimales. Como se usa en este documento, "una preparación de células madre mesenquimales puras", por ejemplo, una composición que comprende células madre mesenquimales significa una preparación que se sabe que está libre de fibroblastos. Como se divulga en el presente documento, la preparación de células madre mesenquimales puras se cultiva en las mismas condiciones que la preparación celular que comprende MSC a ensayar.

Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC es al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% del nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación de MSC pura.

40 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es totalmente pura, es decir, sin contaminación fibroblástica, cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC y de la preparación de MSC pura es el mismo.

45 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC es al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% del nivel de expresión de VEGF de la preparación de células puras que comprende MSC.

Como se divulga en el presente documento, la preparación celular que comprende MSC es totalmente pura, es decir, sin contaminación fibroblástica, cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende MSC y de la preparación de MSC pura es el mismo.

50 Como se divulga en este documento, la preparación celular que comprende MSC es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación celular que comprende MSC es al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% del nivel de expresión de SDF-1 α de la preparación de MSC pura y cuando el nivel de expresión de VEGF de la preparación celular que comprende

MSC es al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% del nivel de expresión de VEGF de la preparación de MSC pura.

Un procedimiento divulgado comprende las siguientes etapas:

- a) cultiva una preparación celular que comprende células madre mesenquimales,
- 5 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo,
- c) cuantificar el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF, y
- d) comparar el nivel de expresión medido en la etapa (c) con un nivel de expresión de referencia.

Un procedimiento divulgado para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- 10 a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
- b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂,
- c) cuantificar el nivel de expresión de SDF-1 α y/o VEGF, y
- 15 d) comparar el nivel de expresión medido en la etapa (c) con los niveles de expresión de SDF-1 α y/o VEGF de una población de referencia de células cultivadas en las mismas condiciones que las MSC.

Un procedimiento divulgado para evaluar la pureza de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas, comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una preparación celular que comprende células madre mesenquimales, preferiblemente células madre adiposas,
- 20 b) opcionalmente cambiar las condiciones de cultivo, preferiblemente la tensión de O₂,
- c) cuantificar el nivel de expresión de SDF-1 α y VEGF, y
- d) comparar el nivel de expresión medido en la etapa (c) con los niveles de expresión de SDF-1 α y VEGF de una población de referencia de células cultivadas en las mismas condiciones que las MSC.

25 La presente divulgación también se refiere a una población celular identificada mediante un procedimiento como se ha descrito anteriormente.

Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada se evalúa por su pureza con respecto a la contaminación fibroblástica.

30 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada es sustancialmente pura; es decir, dicha población celular comprende menos del 25% de fibroblastos, preferiblemente menos del 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11% de fibroblastos. En una forma de realización, la preparación celular así identificada comprende menos del 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% de fibroblastos.

Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.

35 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 21% de O₂.

40 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂.

45 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂.

Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

5 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 10 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a una alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

10 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 21% de O₂ y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

15 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a aproximadamente 21% de O₂ y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

20 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente un 5% de O₂ y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

25 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

30 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

35 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva en condiciones hipóxicas, preferiblemente en aproximadamente 0.1% de O₂, y a alta concentración de glucosa, preferiblemente de aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

40 Según una forma de realización, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de VEGF de al menos 200 pg/ml, preferiblemente al menos de 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

Según otra forma de realización, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de VEGF de al menos 90 pg/ml, preferiblemente al menos de 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

45 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de VEGF de al menos 160 pg/ml, preferiblemente al menos de 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 o 169 pg/ml, más preferiblemente al menos de 170 pg/ml cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

50 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 200 pg/ml, preferiblemente de al menos 250, 206, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml, cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

55

- 5 Como se divulga en el presente documento, la población celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 90 pg/ml, preferiblemente de al menos 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 pg/ml, cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a 5% de O₂ y alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.
- 10 Como se divulga en el presente documento, la preparación celular así identificada presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 160 pg/ml, preferiblemente al menos de 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 o 169 pg/ml, más preferiblemente al menos 170 pg/ml, cuando la preparación celular que comprende MSC se cultiva a 5% de O₂ y baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa. Otro objeto de la divulgación es una población de células madre mesenquimales sustancialmente pura, preferiblemente una población de células madre adiposas.
- 15 La población de células sustancialmente pura de la presente divulgación comprende menos del 25% de fibroblastos, preferiblemente menos del 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11 % de fibroblastos. La preparación celular puede comprender menos del 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% de fibroblastos.
- 20 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml.
- 25 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan a aproximadamente un 5% de O₂.
- 30 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂.
- 35 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.
- 40 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.
- 45 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan a aproximadamente 21% de O₂ y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.
- 50 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan a aproximadamente 21% de O₂ y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.
- 55 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente un 5% de O₂, y a una alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultiva en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂ y a baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

5 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml cuando se cultivan en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y a alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

10 Según una forma de realización, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de VEGF de al menos 200 pg/ml, preferiblemente al menos 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml cuando se cultivan en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

15 Según otra forma de realización, la población celular sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de VEGF de al menos 90 pg/ml, preferiblemente al menos de 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 pg/ml cuando se cultivan a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y una alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

20 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de VEGF de al menos 160 pg/ml, preferiblemente al menos de 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 o 169 pg/ml, más preferiblemente al menos de 170 pg/ml cuando se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

25 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 200 pg/ml, preferiblemente de al menos 250, 206, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml, cuando se cultivan en condiciones hipóxicas, de preferencia a aproximadamente 0.1% de O₂, y alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

30 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 50 pg/ml, preferiblemente como máximo de 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 90 pg/ml, preferiblemente de al menos 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 pg/ml, cuando se cultivan a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y alta concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.

35 Como se divulga en el presente documento, la población de células sustancialmente pura presenta un nivel de expresión de SDF-1 α como máximo de 100 pg/ml, preferiblemente como máximo de 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/ml; y un nivel de expresión de VEGF de al menos 160 pg/ml, preferiblemente al menos de 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 o 169 pg/ml, más preferiblemente al menos 170 pg/ml, cuando se cultiva a tensión de oxígeno tisular, de preferencia a aproximadamente 5% de O₂, y baja concentración de glucosa, de preferencia a aproximadamente 1 g/l de glucosa.

40 Esta invención también se refiere al uso de VEGF como biomarcador de la calidad de una preparación celular que comprende células madre mesenquimales (MSC) con respecto a la contaminación fibroblástica, en particular de una preparación celular que comprende MSC para ser utilizada como producto de terapia celular, basado en MSC, en medicina regenerativa, en el que dichas MSC son células madre adiposas (ASC), y en el que dicha preparación celular se cultiva en un medio que comprende desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 g/l de glucosa.

45 Otro objeto de la divulgación es un kit para implementar procedimientos descritos en este documento; dicho kit comprende medios para determinar o medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento de una preparación de células madre mesenquimales (MSC), preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF.

50 Un objeto de la invención se refiere a un kit para implementar el procedimiento *in vitro* según la invención; dicho kit comprende medios para determinar o medir el nivel de expresión de VEGF; comprende además la referencia para comparar el nivel de expresión de VEGF; dicha referencia es una preparación de fibroblastos pura y/o una preparación de MSC pura cultivada en un medio que comprende desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 g/l de glucosa, y los medios para determinar o medir el nivel de expresión de VEGF se seleccionan en el grupo que consta de anticuerpos específicos de VEGF y cebadores de PCR o qPCR específicos para VEGF.

55 Como se divulga en el presente documento, el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento se evalúa al nivel de proteína, y el kit divulgado puede comprender medios para detectar el al menos un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF. Como se divulga en este documento, dicho medio para detectar el al menos un factor de crecimiento es un anticuerpo específico de dicho al menos un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α

y/o VEGF. El kit divulgado también puede comprender un medio para detectar el nivel de expresión de al menos una proteína de normalización.

5 Como se divulga en el presente documento, el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento se evalúa al nivel de ARN, y el kit divulgado puede comprender medios para la extracción de ARN total, medios para la transcripción inversa del ARN total y medios para cuantificar la expresión de ARN de al menos un factor de crecimiento, preferiblemente VEGF y/o SDF-1 α . Como se divulga en el presente documento, los medios para cuantificar la expresión de ARN de al menos un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF, son cebadores de PCR o qPCR específicos para dicho factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF. Como se divulga en el presente documento, el kit también comprende reactivos para realizar una PCR cuantitativa (como, por ejemplo, reguladores de pH, enzimas y similares). El kit divulgado también puede comprender medios para detectar el nivel de expresión de al menos un gen de normalización al nivel de ARN.

El kit divulgado puede comprender además la referencia para comparar el nivel de expresión medido del al menos un factor de crecimiento. El kit divulgado comprende además una preparación de fibroblastos pura. El kit divulgado comprende además una preparación de MSC pura.

15 El kit divulgado comprende el sobrenadante de una preparación de fibroblastos pura. El kit divulgado comprende el sobrenadante de una preparación de MSC pura. El kit divulgado comprende un intervalo de dilución de sobrenadante de preparación de MSC pura y sobrenadante de preparación de fibroblastos pura. Un ejemplo de intervalo de dilución es, sin limitación, 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100.

20 La presente divulgación también se refiere a un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF, como biomarcador de la calidad o pureza de una preparación celular que comprende MSC, en particular de una preparación celular que comprende MSC para ser utilizada como producto de terapia celular a base de MSC en medicina regenerativa.

La presente divulgación se refiere a un factor de crecimiento, preferiblemente SDF-1 α y/o VEGF, como biomarcador de la calidad o pureza de una preparación de ASC.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una fotografía que muestra ASC y DF en medio de proliferación (A) y en medio de diferenciación osteogénica (B).

La Figura 2 es un gráfico que muestra la proliferación celular de ASC y DF según el número de pases.

30 La Figura 3 es un histograma que muestra la supervivencia celular de ASC y DF en medio de proliferación sin FBS, al 0.1 o al 5% de O₂.

La Figura 4 es un conjunto de histogramas que muestran la secreción de KGF (A), la secreción de b-FGF (B), la secreción de IGF-1 (C) y la secreción de HGF (D) de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 4.5 g/l de glucosa, al 0.1 o al 5% de O₂.

35 La Figura 5 es un conjunto de histogramas que muestran la secreción de VEGF (A) y la secreción de SDF-1 α (B) de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 4.5 g/l de glucosa, al 0.1% de O₂.

La Figura 6 es un conjunto de histogramas que muestran la secreción de VEGF (A) y la secreción de SDF-1 α (B) de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 4.5 g/l de glucosa, al 5% de O₂.

La Figura 7 es un histograma que muestra la secreción de SDF-1 α de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 4.5 g/l de glucosa, al 21% de O₂.

40 La Figura 8 es un conjunto de histogramas que muestran la secreción de VEGF (A) y la secreción de SDF-1 α (B) de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 1 g/l de glucosa, al 0.1% de O₂.

La Figura 9 es un conjunto de histogramas que muestran la secreción de VEGF (A) y la secreción de SDF-1 α (B) de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 1 g/l de glucosa, al 5% de O₂.

45 La Figura 10 es un histograma que muestra la secreción de SDF-1 α de 5 diluciones diferentes de ASC/DF en medio de proliferación con 1 g/l de glucosa, al 21% de O₂.

Ejemplos

Las presentes invención y divulgación se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1:

Materiales y procedimientos

Este estudio se realizó de acuerdo con las directrices del Ministerio de Salud belga. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (Université Catholique de Louvain) para la adquisición de tejidos y el estudio clínico (B40320108280). Todos los materiales se obtuvieron de Lonza (Verviers, Suiza), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) o Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.) a menos que se indique algo diferente.

5 Aislamiento y cultivo de ASC y DF

Se realizó una extracción combinada de tejido adiposo humano (media: 7.4 g) y dérmico (media: 1.5 cm²) en 8 pacientes (Tabla 1) sometidos a cirugía plástica electiva después del consentimiento informado y la detección serológica, mediante lipoaspiración utilizando la técnica de Coleman y biopsia de piel, respectivamente. Las muestras de piel y tejido adiposo se mantuvieron en condiciones estériles durante un máximo de 60 minutos a 4°C antes del aislamiento de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) y fibroblastos dérmicos (DF).

Tabla 1: Características de los donantes de ASC/DF acoplados

Donante	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad (años)	19	44	40	62	56	46	45	41
Sexo	F	F	F	F	F	F	F	F
Indicación Clínica	Mamo-plastia	Abdomino-plastia	Mamo-plastia	Colgajo musculocutáneo del dorsal ancho	Abdominoplastia	Mamo-plastia	Mamo-plastia	Mamo-plastia

El tejido adiposo se digirió con colagenasa (1/2 p/v) en un baño de agua a 37°C durante 60 minutos. La colagenasa se inactivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%. El tejido recogido se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. La pella se suspendió en un medio de proliferación compuesto de DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina (2 mM) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycinina y 1 µl/ml de anfotericina B) y se filtró a través de una criba de malla de 500 µm. A continuación, la suspensión recogida se sembró en matraces de cultivo de 25 cm² con medio de proliferación.

Los DF se aislaron mediante extracción de biopsias dérmicas desepidermizadas, se trituraron en fragmentos de 2 mm x 2 mm y se colocaron en pocillo de plástico. Se añadió un pequeño volumen del medio de proliferación para evitar el desprendimiento de la superficie plástica.

Después de 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se reemplazaron los medios de proliferación. Este pase inicial de las células primarias se denomina pase 0. Se retiraron los trozos dérmicos de la placa de cultivo cuando las células adherentes eran visibles en la superficie plástica que rodeaba los fragmentos de tejido. Las células se mantuvieron en medio de proliferación (cambiado 2 veces/semana) hasta el pase 4, después de tripsinizaciones secuenciales. Se cultivaron células de 3 donantes hasta el pase 15 para estudiar el perfil de proliferación en condiciones de cultivo estándar (37°C, 21% de O₂, 5% de CO₂, 4.5 g/l de glucosa).

Caracterización del perfil de marcador de membrana

En la etapa 4, ASC y DF se caracterizaron por marcadores de superficie celular estándar (CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, stro-1, CD106, CD146, CD166, CD19, CD31, CD11b, CD79α, CD13, HLA- DR, CD14, CD34) [Dominici et al., Cytotherapy. 2006; 8(4):315-317; Bourin et al., Cytotherapy. 2013; 15:641-648] mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACSscan; BD Biosciences, San José, CA).

Brevemente, las ASC se tiñeron con cantidades saturantes de anticuerpos monoclonales: anti-Stro-1, anti-CD90, anti-CD 106, anti-CD105, anti-CD 146, anti-CD166, anti-CD44, anti-CD19, anti-CD45 (panel de anticuerpos marcadores de células madre mesenquimales humanas, R&D System, Minneapolis, MN, EE. UU.), anti-CD44 (CD44 anti-humano de ratón PE, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), anti-CD73 (CD73 anti-humano de ratón FITC, BD Bioscience), anti-CD31 (FITC, anti-humano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD11b (FITC, anti-humano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD79a (PE, antihumano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD13 (FITC, antihumano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-HLA-DR (FITC, antihumano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD14 (FITC, anti-humano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD34 (PE, anti-humano de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Mediante citometría de flujo con el software CellquestPro se analizaron al menos 10,000 eventos regulados. Los resultados se expresan en intensidad de fluorescencia media (MFI) y se expresan como porcentaje de células positivas (umbral: 95% del isotipo).

45 Capacidad de diferenciación

Se probaron ASC y DF en el pase 4 en medios específicos para evaluar la capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico. La diferenciación se evaluó mediante tinción con rojo de alizarina después de cultivar la célula durante 3 semanas en medio de diferenciación específico (medio de proliferación suplementado con dexametasona (1 μ M), ascorbato de sodio (50 μ g/ml) y dihidrofosfato de sodio (36 mg/ml) [Qu et al., *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007; 43:95-100]. La diferenciación osteogénica se confirmó mediante tinción para fosfato cálcico con rojo de alizarina después de la fijación con formalina. Además, se realizó inmunohistoquímica para osteocalcina para confirmar el fenotipo óseo.

Impacto de la tensión de oxígeno y del suero fetal bovino (FBS) en la proliferación celular: ensayo EdU

Se ensayó la capacidad de proliferación celular mediante medición directa de la síntesis de ADN mediante incorporación de 5-etinil-2'-desoxiuridina usando el kit de ensayo de citometría de flujo Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 (Life Technology, Waltham, MA, EE. UU.). Se sembraron ASC (n = 3) y DF (n = 3) en placas de cultivo de 21.5 cm² a una densidad de 5000 células/cm² y se cultivaron durante 24 horas en SFB al 10%, O₂ al 21%. A continuación, se detuvo la proliferación celular reemplazando el medio de proliferación por el mismo, sin FBS, durante 24 horas. Las células se colocaron finalmente durante 48 horas en las condiciones específicas: O₂ al 0.1%, O₂ al 5% y O₂ al 21% en medio de proliferación suplementado con SFB al 1% o SFB al 5% y se adicionó EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina, un nucleósido análogo de timidina e incorporado en el ADN durante la síntesis activa de ADN). Después de la revelación con Alexa Fluor® 488, las células positivas se contaron mediante citometría de flujo (FACScan; BD Biosciences, San José, CA).

Perfil de secreción del factor de crecimiento

Después de la tripsinización, se contaron las células (después del pase 3) y se obtuvieron 5 diluciones progresivas: 100% ASC + 0% DF; 75% ASC + 25% DF; 50% ASC + 50% DF; 25% ASC + 75% DF; y 0% ASC + 100% DF, y se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos con células a una densidad que conduzca a aproximadamente 80% a 95% de confluencia por triplicado para la incubación en cámaras hipóxicas (Modular Incubator Chamber MIC-101; Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, EUA) a 0.1% O₂ y 5% O₂, correspondientes a ambiente altamente hipóxico y tensión de oxígeno tisular, respectivamente. Las células se expusieron (para cada dilución y tensión de oxígeno) a medios de proliferación normoglucémicos (1 g/L) o hiperglucémicos (4.5 g/L). Después de la incubación durante 24 horas en estas condiciones controladas los sobrenadantes de cultivos celulares se recolectaron individualmente y se almacenaron a -20°C para una seguir cuantificando el factor de crecimiento mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (VEGF, HGF, IGF-1, SDF-1 α y FGF básico mediante el kit de ELISA Quantikine; R&D System, Minneapolis, MN, Estados Unidos). La viabilidad celular se evaluó inmediatamente después del estrés hipóxico mediante ensayo con una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio (MTS; Promega, Leiden, Países Bajos). Las pruebas de estrés hipóxico/glucémico y las cuantificaciones del factor de crecimiento se realizaron por triplicado y por duplicado, respectivamente. Los resultados se expresan en picogramos por milímetro.

Análisis estadístico

Se utilizaron la prueba de Kolmogorov de una muestra y los gráficos Q-Q para evaluar la distribución normal de valores. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (con distribución normal) se probaron mediante la prueba t emparejada y el análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Bonferroni. Las pruebas estadísticas se realizaron con PASW 18 (SPSS; IBM, Nueva York, NY, EE. UU.); p < 0.05 se consideró significativo.

Resultados

Los perfiles de marcadores de superficie no permiten la distinción entre las dos poblaciones de células (Tabla 2).

Tabla 2: Caracterización de marcadores de superficie de ASC y DF humanos

	ASC % de células positivas	DF % de células positivas
<i>Marcadores de células mesenquimales (estromales)</i>		
CD13	99.06	99.86
CD44	95.53	99.97
CD73	93.78	99.86
CD90	98.63	100.00
CD105	96.86	99.78
CD166	60.74	96.51

<i>Marcadores de MSC derivadas de médula ósea</i>		
CD106	5.41	2.83
Stro-1	4.03	5.73
CD146	7.16	33.91
<i>Marcadores de células endoteliales</i>		
CD31	5.59	5.41
<i>Marcadores de linaje hematopoyético</i>		
CD14	6.75	28.27
CD45	5.15	0.62
CD11b	5.80	8.65
CD34	5.53	0.54
<i>Antígenos de leucocito humano</i>		
HLA-DR	6.52	1.65
CD19	4.51	2.05
CD79 α	5.10	0.37

5 ASC y DF fueron positivos (> 90% de células positivas) para marcadores de células mesenquimales (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166), negativos para endoteliales (CD31), células estromales derivadas de la médula ósea (CD106, Stro-1, CD146) y marcadores hematopoyéticos (CD14, CD45, CD11b, CD34), y para HLA-DR, CD79 α y CD19. Después del cultivo en medios de diferenciación específicos (Figura 1), se demostró la capacidad de diferenciación osteogénica tanto para ASC como para DF mediante tinción con rojo de alizarina e inmunohistoquímica de osteocalcina.

ASC y DF tuvieron un perfil de proliferación similar hasta el pase 15 (Figura 2, NS).

10 La viabilidad de ASC y DF no se vio afectada significativamente después de 24 horas de cultivo al 0.1% de O₂ y al 5% de O₂ sin SFB (Figura 3). Al 5% de O₂, la viabilidad del DF se redujo en comparación con ASC (87.04% de supervivencia de ASC, p < 0.05).

El estudio de la secreción de HGF, IGF-1, bFGF y KGF (al 0.1% y 5% de O₂, 4.5 g/l de glucosa) de las diluciones secuenciales de ASC y DF no demostró ninguna curva significativa (Figura 4).

15 Sin embargo, para VEGF y SDF-1 α , se observaron regresiones lineales después de la "contaminación" de ASC por DF. De hecho, el nivel de secreción de SDF-1 α disminuye al aumentar la proporción de ASC. Este resultado se encuentra en diferentes condiciones de tensión de oxígeno (21%, 5% o 0.1%) o de concentraciones de glucosa (1 g/l o 4.5 g/l) (Figuras 5 a 10). Además, en condiciones de cultivo de glucosa alta y al 0.1% de O₂ y al 5% de O₂, el nivel de secreción de VEGF aumenta con el aumento de la proporción de ASC (Figuras 5A y 6A). Las mismas mediciones en condiciones de glucosa baja demostraron regresiones lineales significativas para la secreción de VEGF al 5% de O₂ (Figura 8A).

20 Las relaciones se invirtieron ya que el DF liberó niveles más altos de SDF-1 α y el VEGF se produjo en tasas más altas por ASC, lo que permitió la medición de la proporción de células (pureza de ASC).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* para valorar, evaluar y/o monitorear la pureza de una preparación celular heterogénea que comprende células madre mesenquimales (MSC) con respecto a la contaminación fibroblástica, en donde dicho procedimiento comprende medir el nivel de expresión de al menos un factor de crecimiento expresado por dicha preparación celular, en donde dicha preparación celular se cultiva en un medio que comprende de 2 a 10 g/l de glucosa, en donde dicho al menos un factor de crecimiento es VEGF y donde dichas células madre mesenquimales son células madre adiposas (ASC).
2. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento comprende además comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión de referencia.
- 10 3. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho nivel de expresión se evalúa a nivel de proteína, preferiblemente mediante la detección y/o cuantificación de dicho al menos un factor de crecimiento secretado en el sobrenadante del cultivo celular.
4. El procedimiento *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho nivel de expresión se evalúa a nivel de ARN, preferiblemente mediante RT-PCR, RT-qPCR, Northern Blot y/o técnicas de hibridación.
- 15 5. El procedimiento *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho medio comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 g/l de glucosa, preferiblemente aproximadamente 4.5 g/l de glucosa.
6. El procedimiento *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha preparación celular es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF es de al menos 200 pg/ml en el medio de cultivo celular, preferiblemente de al menos 250, 260, 270, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289 o 290 pg/ml; en el que dicha preparación celular se cultiva en condiciones hipóxicas, preferiblemente a aproximadamente 0.1% de O₂, y preferiblemente a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, antes de medir el nivel de expresión.
- 20 7. El procedimiento *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha preparación celular es sustancialmente pura cuando el nivel de expresión de VEGF es de al menos 90 pg/ml en el medio de cultivo celular, preferiblemente de al menos 95, 100, 105, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o 120 pg/ml, en el que dicha preparación celular se cultiva a tensión de oxígeno tisular, preferiblemente a aproximadamente 5% de O₂, y preferiblemente a aproximadamente 4.5 g/l de glucosa, antes de medir el nivel de expresión.
- 25 8. Uso de VEGF como biomarcador de la calidad de una preparación celular heterogénea que comprende células madre mesenquimales (MSC) con respecto a la contaminación fibroblástica, en particular de una preparación celular que comprende MSC para su uso como producto de terapia celular a base de MSC en medicina regenerativa, en donde dichas MSC son células madre adiposas (ASC), y en donde dicha preparación celular se cultiva en un medio que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 g/l de glucosa.
- 30 9. Un kit para implementar el procedimiento *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho kit comprende medios para determinar o medir el nivel de expresión de VEGF, que comprende además la referencia para comparar el nivel de expresión de VEGF, en donde dicha referencia es una preparación de fibroblastos pura y/o una preparación de MSC pura que se ha cultivado en un medio que comprende desde hasta 10 g/l de glucosa, y en donde el medio para determinar o medir el nivel de expresión de VEGF se selecciona en el grupo que consiste en anticuerpos específicos de VEGF, y cebadores de PCR o qPCR específicos para VEGF.
- 35

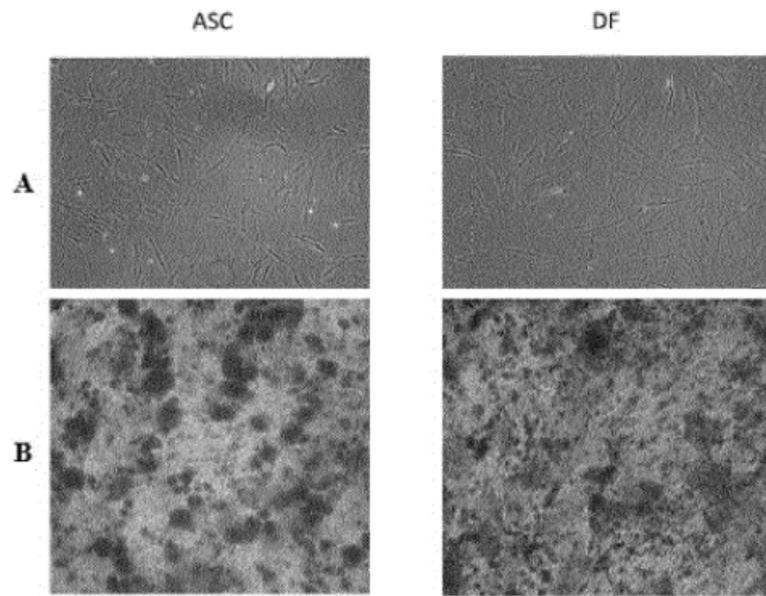


FIG. 1

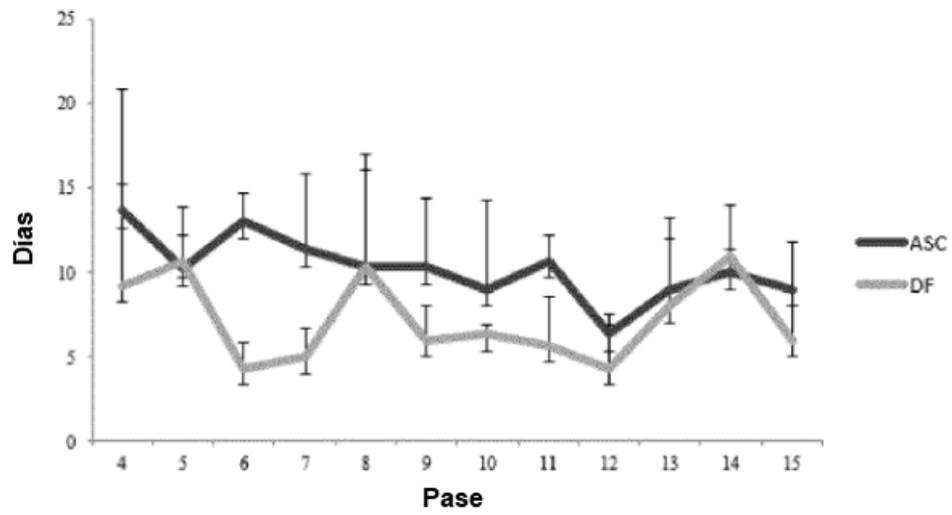


FIG. 2

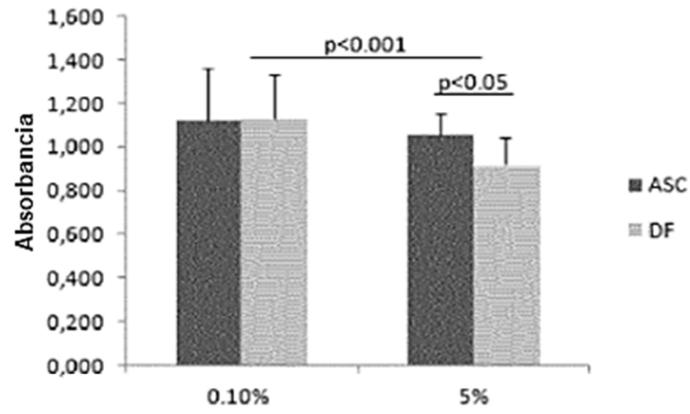


FIG. 3

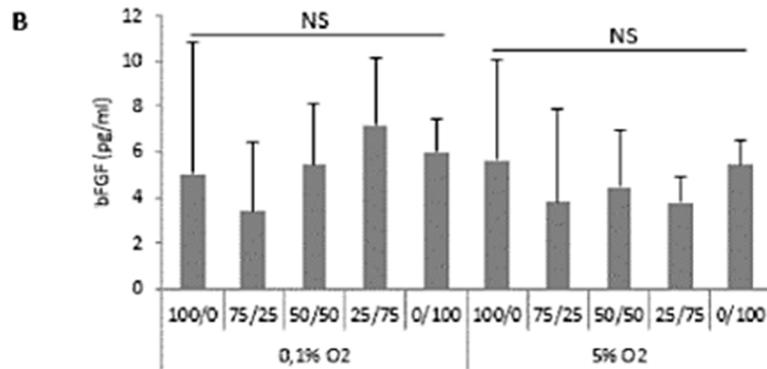
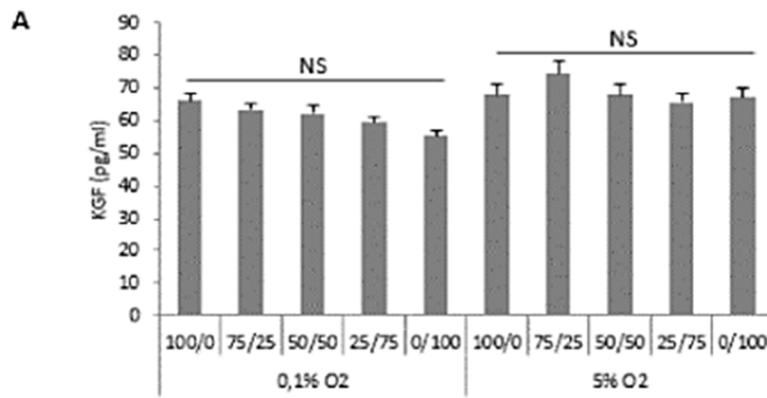


FIG. 4A-B

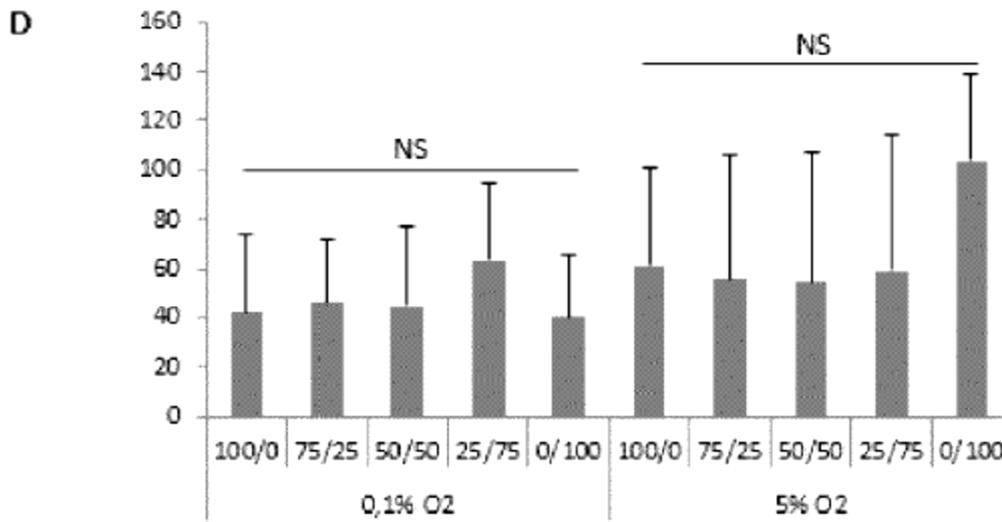
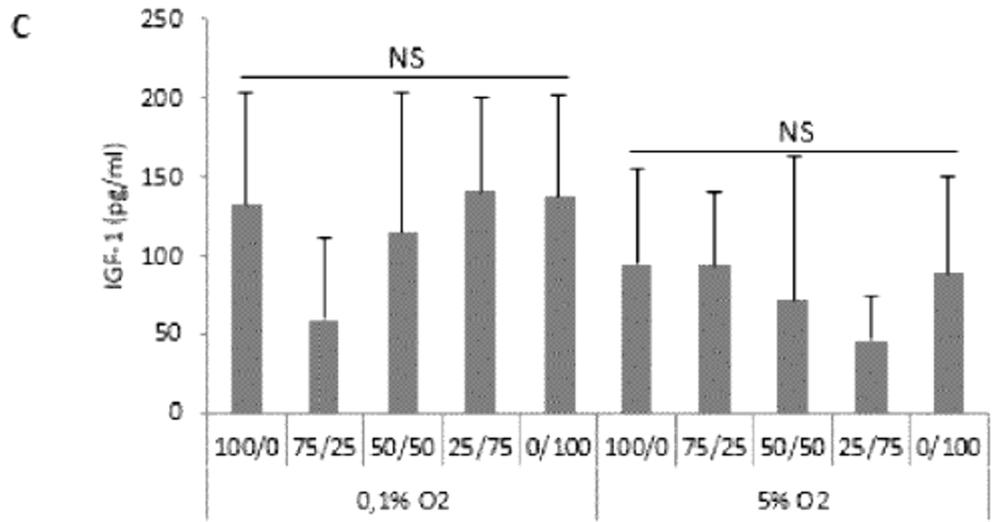


FIG. 4C-D

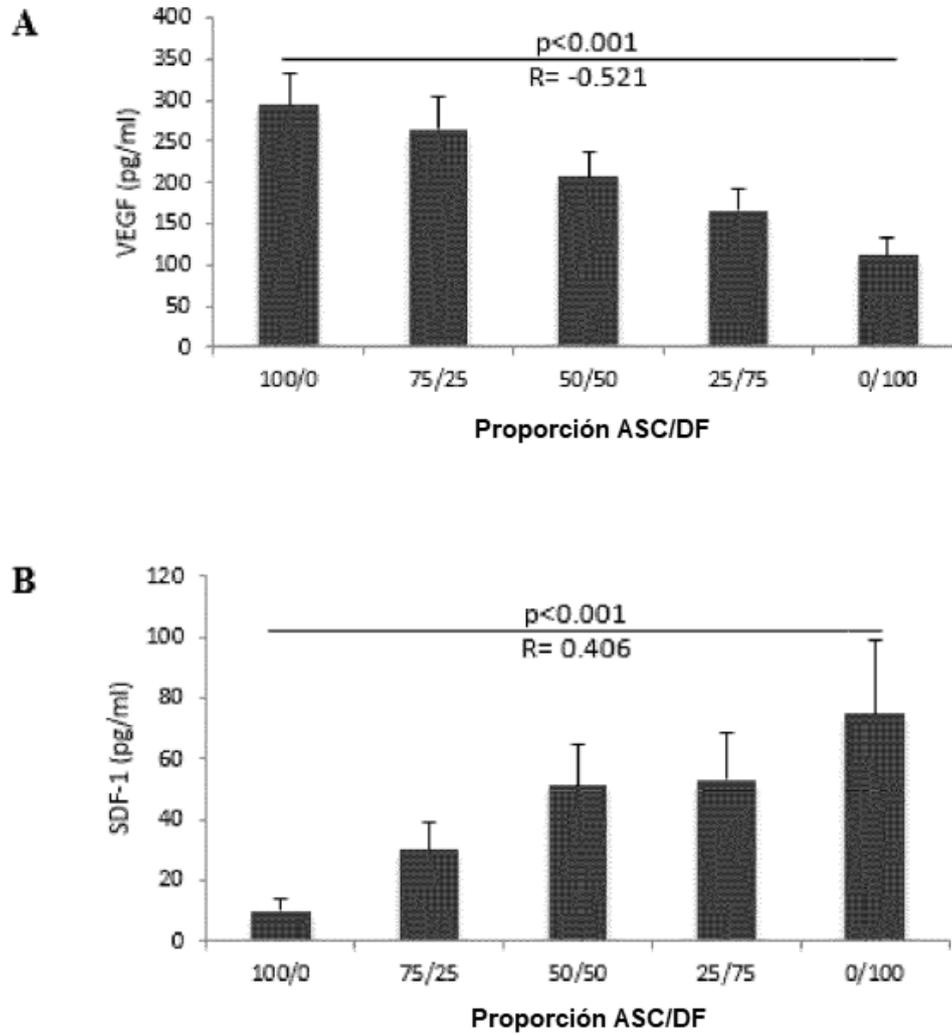


FIG. 5

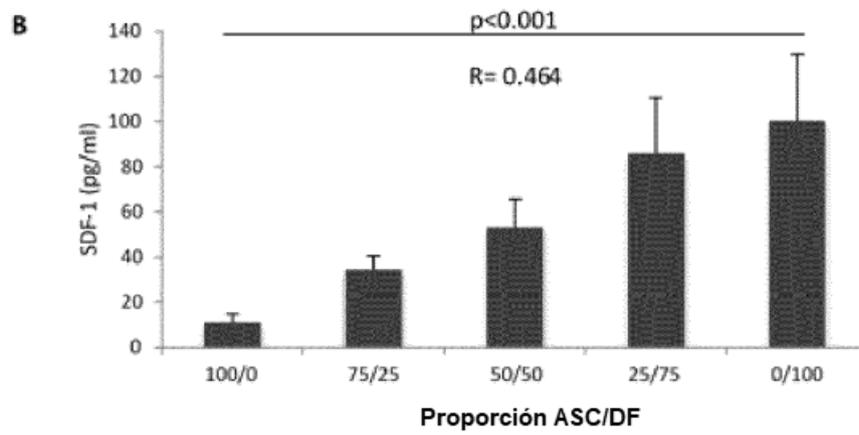
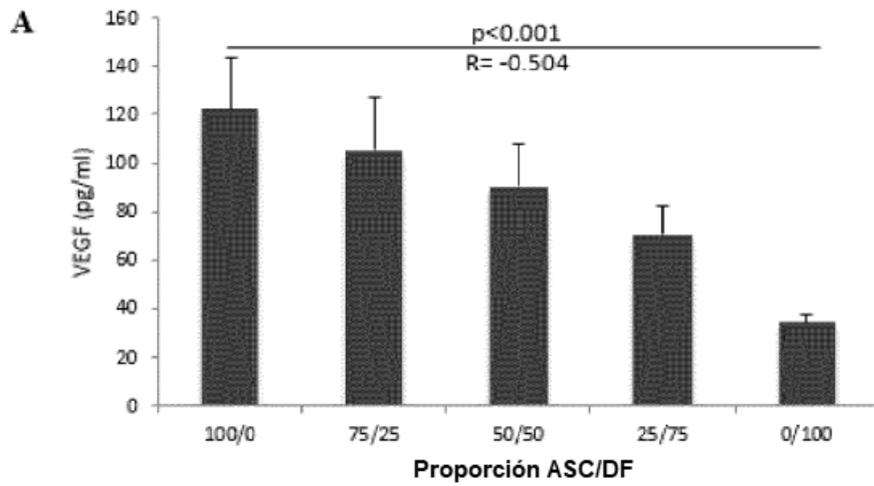


FIG. 6

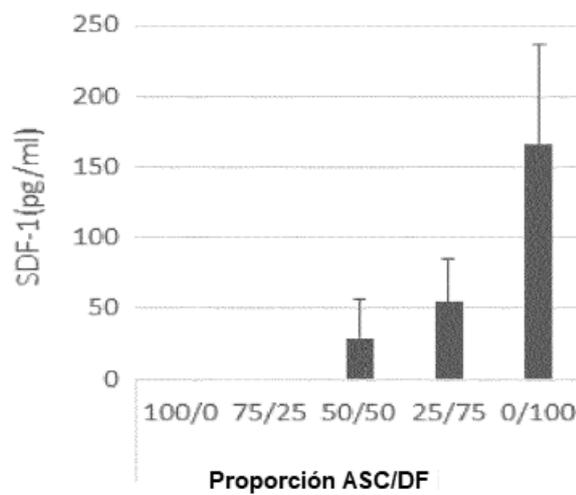


FIG. 7

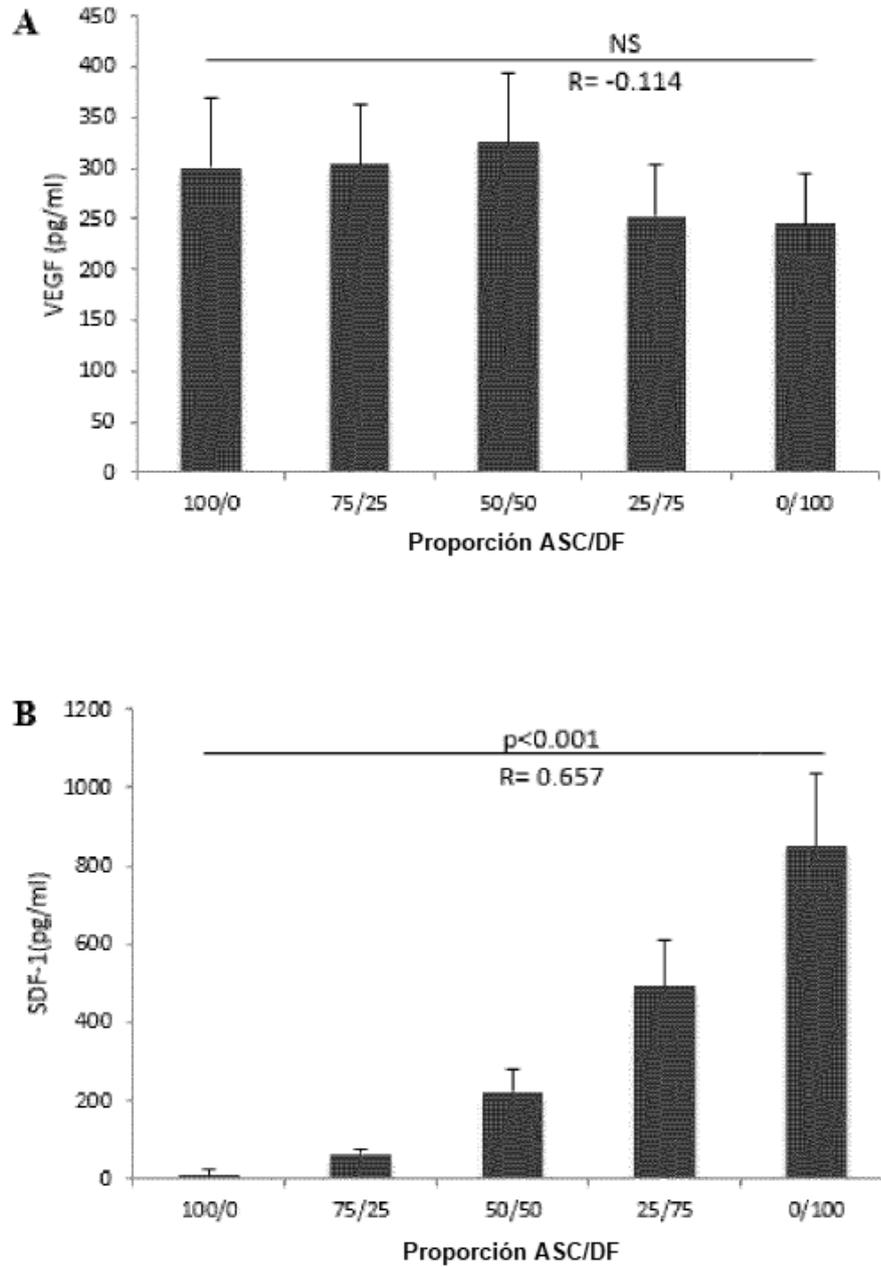


FIG. 8

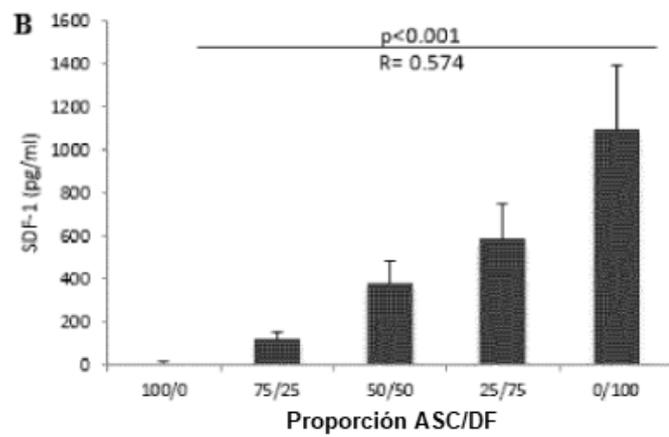
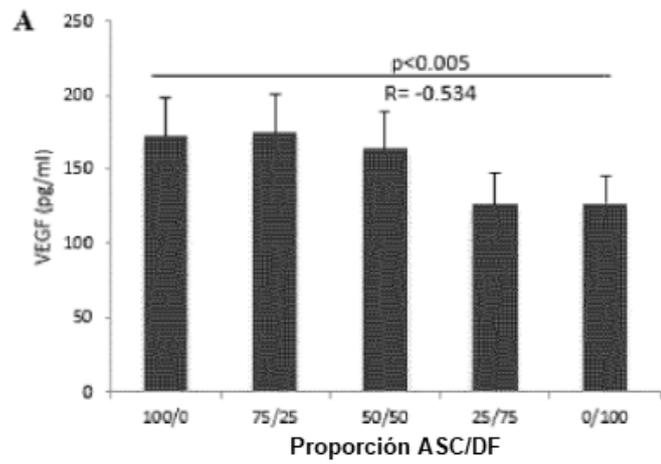


FIG. 9

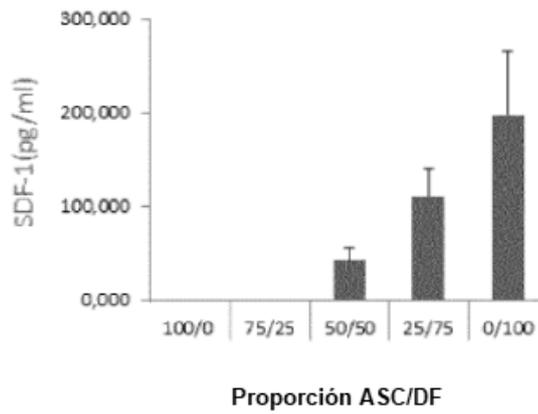


FIG. 10