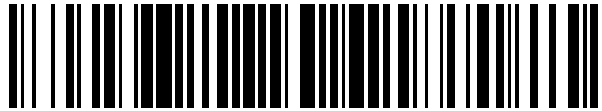


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 916**

21 Número de solicitud: 200930540

51 Int. Cl.:
C12N 5/0775 (2010.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G06F 19/00 (2011.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2011**

Fecha de la concesión: **19.12.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **29.12.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.12.2011

73 Titular/es:
**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES (CNIC)
MELCHOR FERNANDEZ ALMAGRO 3
28029 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**ESTRADA RODRIGUEZ, JUAN CAMILO;
BERNAD MIANA, ANTONIO y
SAMPERE RODRIGUEZ, ENRIQUE**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **METODO DE IDENTIFICACION DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES SENESCENTES**

57 Resumen:

Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes.

La invención se refiere a un método para identificar células madre mesenquimales senescentes creciendo en cultivos in vitro, que comprende: medir la longitud de los telómeros de los cromosomas, determinar el nivel de ploidía en la célula, analizar la presencia de mitosis multipolares y analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y/o CD70. Este método puede ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre mesenquimales cuyas células van a ser empleadas en terapia celular, lo que permite identificar y seleccionar aquellos más estables y apropiados para tal fin.

ES 2 351 916 B1

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la biología celular y la genética y se refiere a un método para identificar células madre mesenquimales senescentes creciendo en cultivos *in vitro*, que comprende: medir la longitud de los telómeros de los cromosomas, determinar el nivel de ploidía en la célula, analizar la presencia de mitosis multipolares y analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y/o CD70. Este método puede ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre
10 mesenquimales cuyas células van a ser empleadas en terapia celular, lo que permite identificar y seleccionar aquellos más estables y apropiados para tal fin.

Estado de la técnica anterior

15 Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) han sido propuestas en los últimos años como una poderosa herramienta en terapia celular por su elevado potencial para proliferar y diferenciarse en células derivadas del mesodermo (osteocitos, condrocitos y adipocitos), lo que permite su uso en el tratamiento de algunas patologías asociadas con inflamación crónica, envejecimiento, enfermedades autoinmunes y patologías asociadas a traumas, como por ejemplo la enfermedad del injerto contra el huésped, las fístulas relacionadas con la enfermedad de Chron, la
20 artritis reumatoide, el infarto de miocardio o las condiciones degenerativas de cartílago y hueso.

No obstante, aunque existen fuentes de MSCs disponibles en diferentes tejidos, su cantidad en el cuerpo es escasa. La mayoría de los protocolos de terapia celular utilizan entre 10-50 millones de hMSCs por tratamiento, por lo que estas células necesitan ser expandidas en cultivos *in vitro* durante 4 a 8 semanas antes de su implantación. Además, estos cultivos con frecuencia se llevan a cabo en presencia de condiciones pro-oxidativas (20% de O₂) y de concentraciones elevadas de suero y glucosa donde las células sufren mutaciones y anomalías cromosómicas que ponen en peligro su bioseguridad para ser utilizadas en clínica. Estos largos períodos de cultivo y el daño oxidativo contribuyen a la senescencia celular y a la inestabilidad genética, lo que puede alterar las propiedades de las células limitando su
25 utilidad biomédica.

30 La senescencia está mediada principalmente por la activación de los genes supresores tumorales que detienen el ciclo celular p15/p16/Rb y p19^{arf}/p53/p21 (US2002123526 A1). Además, las células senescentes tienen sobreexpresados marcadores asociados a estrés como SA-β-galactosidasa o Lipofuscina (Krzysztof Ksiazek, 2009, *Rejuvenation Research*, Vol. 12, No. 2: 105-116), así como programas que incrementan el nivel de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, es necesaria la identificación de biomarcadores de senescencia más específicos que permitan detectar el nivel de senescencia en los cultivos de células madre mesenquimales para la realización de controles de calidad antes de su
35 aplicación biomédica.

40 Las células senescentes poseen alteraciones en algunos parámetros de su fisiología y alteran las características de las células vecinas. La poliploidía (duplicaciones de todo el complemento cromosómico) constituye un marcador de estrés celular en la mayoría de los tejidos y se cree que es un mecanismo precursor de la aneuploidía, la cual se considera un factor fundamental asociado con el envejecimiento y con la transformación celular, ya que la mayoría de los tumores son aneuploides. Algunos autores han demostrado la presencia de aneuploidía en células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea de primates no humanos creciendo en cultivo (Reza Izadpanah, *et al.*, 2008, *Cancer Research*, Vol. 68, No. 11: 4229-4238). Por lo tanto, la aneuploidía ha sido propuesta como otra característica de las células senescentes (Steven R. Schwarze, *et al.*, 2005, *Neoplasia*, Vol. 7, No. 9: 816-823). Estudios previos, han demostrado que durante el cultivo celular prolongado de las células madre embrionarias humanas se produce una predisposición para el mantenimiento y la selección de aneuploidías cromosómicas específicas para los cromosomas
45 12, 17, X y 20q que posiblemente proporcionan una ventaja selectiva para la propagación de las células madre embrionarias humanas que se mantienen indefinidamente en cultivo (Spits, C. *et al.*, 2008, *Nature Biotechnology*, Vol. 26:1361-1363).

50 Por otro lado, uno de los mecanismos principales de inducción de senescencia en las células es el acortamiento de los telómeros. Los telómeros son los extremos terminales de los cromosomas eucariotas y son cruciales para mantener la estabilidad genética: el mantenimiento de la longitud y la función de los telómeros es un requisito para la división celular y para una correcta segregación cromosómica. Este proceso de mantenimiento en la mayoría de las células es llevado a cabo por la telomerasa transcriptasa inversa que añade repeticiones al final de los cromosomas. La senescencia de las células madre mesenquimales se ha asociado con un acortamiento progresivo de la longitud telomérica a medida que van avanzando los pases del cultivo (Melissa A. Baxter, *et al.*, 2004, *Stem Cells*, 22:675-682).
55

60 Otra de las aproximaciones que se han llevado a cabo para la detección de biomarcadores de senescencia en células madre mesenquimales en cultivo pasa por el análisis de la expresión genética de todo el transcriptoma de estas células para identificar aquellos genes que se expresan de manera diferencial en las células senescentes y en las no senescentes. Los genes identificados para su uso como biomarcadores de senescencia en su mayoría se encuentran relacionados con la proliferación celular, la respuesta a estrés, el desarrollo, el ciclo celular, la mitosis, la replicación y reparación del ADN, etc. (Eunsook Ryu, *et al.*, 2008, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371:431-436).
65

Otros estudios basados en la identificación de biomarcadores de senescencia han analizado el impacto de la senescencia en el fenotipo, la diferenciación y los patrones de expresión génica global de MSC creciendo en cultivo. Así, se ha asociado un acortamiento de los telómeros de los cromosomas y una expresión reducida de algunos de los genes implicados en la replicación y reparación del ADN con la senescencia en estas células (Wolfgang Wagner, *et al.*, 2008, *PLoS ONE*, Vol. 3, No. 5).

De manera que el acortamiento de los telómeros, la aneuploidía y las alteraciones en los patrones de expresión génica respecto a las células no senescentes son características que han sido asociadas con el fenotipo senescente. No obstante, es necesario disponer de un método completo, que sea fiable y reproducible, que analice todos los parámetros implicados en el desarrollo de la senescencia, capaz de detectar células madre mesenquimales senescentes en cultivo. Este método permitiría analizar la estabilidad genética de las mismas, lo cual es de especial relevancia dadas las importantes aplicaciones que poseen estas células en el campo de la terapia celular.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para identificar células madre mesenquimales senescentes creciendo en cultivos *in vitro*, que comprende: medir la longitud media de los telómeros de los cromosomas, determinar el nivel de ploidía en la célula, analizar el número de mitosis multipolares y analizar el nivel de expresión de los genes SCIN (escinderina), EDN-1 (endotelina-1), AKAP9 (proteína de anclaje Kinasa A, yotatio), CXCL12, CXCL1 o CD70, implicados en el control de la ploidía y la poliploidización. Este método puede ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre mesenquimales cuyas células van a ser empleadas en terapia celular, lo que permite identificar y seleccionar aquellos más estables y apropiados para tal fin.

Los inventores han llevado a cabo un análisis de la expresión genética diferencial de células madre mesenquimales en el pase 21 y en el pase 2 de un cultivo en presencia de 20% de O₂ para conocer qué genes se expresan de manera diferencial en ambas poblaciones y si esta diferencia en la expresión es significativa. Tras llevar a cabo un análisis para conocer qué genes de expresión alterada están implicados en procesos de inestabilidad genética, han demostrado que existen 69 genes alterados implicados en procesos de cáncer y del ciclo celular. De todos estos genes cuya expresión se encuentra alterada en la senescencia se han seleccionado los 8 de expresión diferencial más significativa que están implicados en el mantenimiento del nivel de ploidía.

En base a este análisis se ha concluido que la senescencia de las células madre mesenquimales esta relacionada con una sobreexpresión de SCIN (escinderina), EDN-1 (endotelina-1) y/o AKAP9 (proteína de anclaje Kinasa A, yotatio), y/o con una reducción en la expresión de CXCL12, CXCL1 y/o CD70 implicados en el control de la ploidía y la poliploidización. Por tanto, estos genes se proponen en la presente invención como biomarcadores de inestabilidad genética en cultivos de células madre mesenquimales.

Además, las MSC humanas senescentes presentan una reducción significativa de la longitud telomérica y elevados niveles de aneuploidía y de mitosis multipolares, lo que está relacionado con la disminución en la expresión de los genes que controlan la ploidía. Por ello, el método de la presente invención comprende el análisis de todos estos parámetros de senescencia conjuntamente para detectar senescencia en MSC que están siendo expandidas en cultivos *in vitro*.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de identificación de células madre mesenquimales senescentes, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a. medir la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula madre mesenquimal,
- b. determinar el nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal del paso (a),
- c. analizar la presencia de mitosis multipolar en la célula madre mesenquimal del paso (b),
- d. analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, EDN-1, AKAP9, CXCL1, CXCL12 y/o CD70 en la célula madre mesenquimal del paso (c), y
- e. asociar los datos obtenidos en los pasos (a)-(d) con un fenotipo senescente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la medida de la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se realiza mediante al menos uno de los siguientes métodos: FISH cuantitativo o TRAP. En otra realización preferida, la determinación del nivel de ploidía del paso (b) se realiza mediante la hibridación con sondas cromosómicas específicas y un posterior recuento de su señal fluorescente. En otra realización preferida las sondas cromosómicas específicas son sondas CEP. En una realización más preferida las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17. En una realización aún más preferida las sondas CEP son específicas del cromosoma 10.

En la presente descripción se entiende por “células madre mesenquimales” o “células progenitoras mesenquimales” las células madre adultas que se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos como la médula ósea, la sangre periférica, el cordón umbilical, el hueso trabecular, el tejido adiposo, el tejido sinovial, los dientes deciduales, el músculo esquelético así como en algunos tejidos del feto, cuyos marcadores característicos son, pero

sin limitarnos, SH2, SH3, SH4, CD10, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 o CD166, y son negativas para los marcadores CD31, CD34, CD38, CD40 o CD45. Estas células poseen capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares del mesodermo, como células de la línea osteogénica, adipogénica o condrogénica.

5 Estas células madre mesenquimales, para poder ser aplicadas en terapia celular, como por ejemplo en regeneración tisular, necesitan ser expandidas en cultivos *in vitro* que proporcionen cantidades celulares terapéuticamente adecuadas. No obstante, después de un cierto número de divisiones entran en senescencia y encuentran limitaciones en su capacidad proliferativa, en su potencial de diferenciación, en su estabilidad genética, etc. Se entiende por “senescencia” el fenómeno que provoca alteraciones en algunos parámetros de la fisiología celular, limita la capacidad proliferativa, la replicación, la diferenciación, etc. de las células, además altera los patrones de expresión
10 génica. Puede ser inducida por varias fuentes de estrés como la irradiación ionizante, la activación oncogénica, el acortamiento de los telómeros, la reparación incompleta del ADN, las perturbaciones de la cromatina o el daño oxidativo y está asociada con respuestas al daño en el ADN. Las células que se encuentran creciendo en cultivos *in vitro* durante un tiempo prolongado manifiestan senescencia.

15 Para identificar a una célula madre mesenquimal como senescente, el método de la invención comprende, en primer lugar, la medida de la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula, por ser la reducción de la longitud telomérica una de las característica que se encuentran asociadas al fenotipo senescente. Los “telómeros” son las regiones de ADN no codificantes que se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales. En los cromosomas de las células humanas los telómeros están formados por la repetición en tándem de la secuencia telomérica “TTAGGG/AATCCC” que se encuentra repetida unas 2.000 veces. Los telómeros están implicados en numerosas funciones celulares relacionadas con la estabilidad de los cromosomas y la división celular.

25 La medida de la longitud telomérica se podría llevar a cabo mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica para tal fin, como por ejemplo, pero sin limitarnos, *slot-blot*, TRF o análisis de los fragmentos de restricción terminal, obtenidos mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción y posterior *Southern blot*, TRAP o “Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*)” que analiza los niveles de actividad de la telomerasa, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) cuantitativo o no cuantitativo o PRINS (“*Primed In Situ Syntesis*”). En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la medida de la longitud de los telómeros de los cromosomas se realiza mediante FISH cuantitativo y/o TRAP, cuyos protocolos se describen en los ejemplos de la presente invención. En el método de la invención no es necesario llevar a cabo los dos métodos, FISH cuantitativo y TRAP, para medir la longitud telomérica ya que cualquiera de ellos por separado aporta información suficiente de este parámetro, aunque preferiblemente se realizan ambos para obtener una información más completa porque el método TRAP aporta evidencias sobre la actividad de la telomerasa, enzima encargada de mantener la longitud telomérica. Por ello, en una realización preferida la medida de la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se realiza mediante FISH cuantitativo, en otra realización preferida la medida de la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se realiza mediante TRAP, y en una realización más preferida esta medida se realiza mediante FISH cuantitativo y TRAP.

40 En segundo lugar, el método de la invención comprende analizar el nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal, entendiéndose por “nivel de ploidía” el número de juegos completos de cromosomas en una célula, por ejemplo, 2n, 3n, 4n, etc. Las células somáticas humanas son diploides (2n) y cualquier cambio en este número de juegos cromosómicos se entiende como “aneuploidía”. La determinación del nivel de ploidía en una célula se podría realizar mediante técnicas citogenéticas que incluyen, sin limitarse, el uso de sondas que identifican estructuras específicas y/o repetitivas de los cromosomas, como por ejemplo, pero sin limitarnos, FISH con sondas centroméricas, como por ejemplo pero sin limitarnos, con sondas CEP o LS1, con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) o con sondas específicas cromosómicas o mediante el *Sistema ImagePath™ DNA Ploidy*. En una realización preferida, el análisis del nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal se realiza mediante la hibridación con sondas centroméricas específicas cromosómicas, en concreto, pero sin limitarnos, con sondas CEP, conocidas en el estado de la técnica. Estas sondas podrían ser las específicas para cualquiera de los cromosomas, ya que la señal de hibridación fluorescente de estas sondas con cualquier cromosoma permitiría obtener información sobre el nivel de ploidía celular, pero en la presente invención, preferiblemente, son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17, ya que se ha podido comprobar que durante el cultivo celular prolongado se produce un aumento progresivo de los niveles de aneuploidía para estos cuatro cromosomas (preferentemente hacia una ganancia en el número de copias). Este aumento del nivel de ploidía es especialmente marcado en el caso del cromosoma 10, como se muestra en los ejemplos y figuras de la presente invención. Por ello, en una realización preferida, el análisis del nivel de ploidía del paso (b) se realiza mediante la hibridación con sondas cromosómicas específicas CEP del cromosoma 10 y un recuento posterior de su señal fluorescente.

55 El posterior análisis de la señal fluorescente de estas sondas permite visualizar el número de cada uno de estos cromosomas en la célula, de manera que en los casos en los que más o menos de dos señales por sonda cromosómica son detectadas existe aneuploidía.

60 El tercer paso del método de la invención comprende analizar la presencia en la célula de mitosis multipolar. Se entiende por “mitosis multipolar” aquella división celular en la que el huso tiene tres o más polos, dando lugar a la formación del número correspondiente de células hijas. La mitosis multipolar puede ser una causa de poliploidía en las células. El análisis de mitosis multipolares podría llevarse a cabo, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante cualquier técnica citológica conocida en el estado de la técnica que permita el análisis del núcleo celular, como por ejemplo, pero sin limitarnos, la tinción con anticuerpos anti-tubulina.

Un cuarto paso del método de la invención comprende el análisis del nivel de expresión de los genes SCIN (escinderina), EDN-1 (endotelina-1), AKAP9 (proteína de anclaje Kinasa A, yotatio), CXCL12 (chemokina ligando 12, Factor derivado del estroma-1) y CXCL1 (chemokina ligando 1, Gro-alfa) y/o CD70 (molécula CD70) en la célula madre mesenquimal. El análisis de la expresión de estos genes podría realizarse mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, PCR, RT-PCR, técnicas inmunohistoquímicas de detección de estas proteínas en la célula, *microarrays* de proteínas, *microarrays* de ADNc, *western blot*, análisis de sus niveles de ARNm en la célula, por ejemplo pero sin limitarnos, mediante la cuantificación de señales de sondas fluorescentes de ARNm, etc. El método de análisis de la expresión de estos genes que se lleva a cabo en el método de la invención es preferiblemente el que se describe en los ejemplos.

El último paso del método de la invención consiste en asociar los datos obtenidos al medir la longitud de los telómeros de los cromosomas, al determinar el nivel de ploidía, al analizar la presencia de mitosis multipolar y al analizar el nivel de expresión de los genes anteriormente mencionados en la célula madre mesenquimal con un fenotipo senescente.

Por ello, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el fenotipo senescente del paso (e) se caracteriza por presentar:

- a. una reducción en la longitud de los telómeros de los cromosomas respecto a una célula no senescente,
- b. aneuploidía,
- c. mitosis multipolar,
- d. una expresión elevada de los genes SCIN, AKAP9 y/o EDN-1, y/o
- e. una expresión reducida de los genes CXCL1, CXCL12 y/o CD70.

La reducción en la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se puede determinar mediante la comparación de la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula madre mesenquimal senescente con una célula madre mesenquimal no senescente. La aneuploidía se entiende, en el fenotipo senescente, como el aumento o la disminución en el número de copias de los cromosomas, pero sin limitarnos, 8, 10, 11 y/o 17 en la célula madre mesenquimal senescente respecto al número normal de copias de los mismos en una célula no senescente, es decir, una alteración en el número de copias de estos cromosomas por encima o por debajo de dos, como se ha explicado anteriormente, aunque preferiblemente, y sin limitarnos, la aneuploidía del fenotipo senescente de la invención se caracteriza por presentar un aumento en el número de copias de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17 y más preferiblemente del cromosoma 10, entendiéndose como “aumento en el número de copias” la presencia de una o más copias de estos cromosomas en la célula por encima del número normal de copias de los mismos en una célula no senescente, es decir, una o más copias de estos cromosomas por encima de dos.

La mitosis multipolar se entiende, en el fenotipo senescente, como la presencia de divisiones celulares en las que el huso tiene tres o más polos.

Se entiende por “expresión elevada” aquella expresión en la que los niveles de los genes SCIN, AKAP9 y EDN-1 se encuentran por encima de los niveles de expresión de estos mismos genes en una célula madre mesenquimal no senescente. De igual manera, una “expresión reducida” es aquella expresión en la que los niveles de los genes SCIN, AKAP9 y EDN-1 se encuentran por debajo de los niveles de expresión de estos mismos genes en una célula madre mesenquimal no senescente.

En otra realización preferida, las células madre mesenquimales se encuentran creciendo en un cultivo *in vitro*. En otra realización preferida las células madre mesenquimales proceden de un humano.

El método de la invención puede aplicarse, pero sin limitaciones, a células mesenquimales que se encuentran creciendo en cultivos *in vitro*, de manera que podría servir tanto para la identificación de senescencia en una célula mesenquimal aislada como para la identificación de senescencia en un cultivo de células madre mesenquimales que preferiblemente van a ser usadas en terapia celular.

Por tanto, el método de la invención podría ser de utilidad para la realización de estudios de estabilidad genética en los cultivos de células madre mesenquimales. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los cultivos de células madre mesenquimales son para su uso en terapia celular.

La senescencia y el acortamiento de los telómeros pueden llevar a un aumento de la inestabilidad genética. Así, la identificación de células madre mesenquimales senescentes en un cultivo *in vitro* puede aportar información sobre el grado de estabilidad genética de esas células en cultivo, un parámetro que es importante conocer para determinar la calidad de las células que van a ser empleadas en fines terapéuticos. Se entiende por “estabilidad genética” el estado en el que las células no presentan alteraciones significativas en sus perfiles de expresión génica respecto al perfil de expresión esperado en células de su mismo linaje, ni un elevado número de mutaciones, ni alteraciones en su nivel de ploidía, ni un elevado número de mitosis multipolares, ni alteraciones significativas en su longitud telomérica, etc.

Se entiende por “terapia celular” la utilización de células vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de identificación de células madre mesenquimales senescentes, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende los medios adecuados para llevar a cabo el método de la invención. En una realización preferida, el kit de la invención comprende: sondas PNA, sondas CEP y sondas Taqman específicas para los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70. En una realización más preferida, las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17.

Se entiende por “sondas PNA” las sondas teloméricas *Peptide Nucleic Acid* LL(CCCTAA)₃ marcadas, por ejemplo, pero sin limitarnos con Cy3. Son sondas híbridas entre ácido nucleico y proteínas, diseñadas para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Su estructura esta formada por una cadena de aminoácidos que forman el esqueleto principal a los cuales se les unen las bases nitrogenadas. Estas sondas podrían ser empleadas, pero sin limitarnos, en técnicas de FISH cuantitativo o FISH-Q.

Las sondas Taqman específicas de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70 son las recogidas en la tabla 1 de los ejemplos de la presente invención u otras homologas.

Dicho kit puede comprender, sin ningún tipo de limitación, medios de cultivo, tampones, reactivos, agentes para prevenir la contaminación. Puede comprender, además, cebadores, sondas, fluorocromos, polimerasas, anticuerpos, reactivos, etc. Por otro lado el kit puede incluir métodos y medios necesarios para llevar a cabo la extracción, purificación, etc. de ácidos nucleicos y/o proteínas. También podría incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá elementos necesarios para la identificación de células madre mesenquimales senescentes por la técnica que se ha descrito anteriormente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. A) Muestra el análisis de la longitud telomérica de las MSCs por Q-FISH en MSCs en interfase de los pases 2 y 15 representado frente a la duplicación poblacional. Las líneas punteadas representan el acortamiento de los telómeros de las MSCs creciendo en 3% de O₂. Las líneas no punteadas representan el acortamiento de los telómeros de las MSCs creciendo en 20% de O₂. B) Muestra la cuantificación de la pérdida de la longitud telomérica en Kb por duplicación poblacional. La conversión de fluorescencia de los telómeros a Kb se lleva a cabo utilizando las líneas fibroblásticas (TIN2 y TIN2-13). La pérdida de longitud telomérica en 3% O₂ está reducida un 24% en comparación con 20% de O₂ (p=0,015). C-D) Muestra ejemplos de MSCs (C) en metafase y de células inmortalizadas hTert (D) hibridadas con sondas PNA teloméricas (señales brillantes al final de los cromosomas y contratiñción con DAPI).

Fig. 2. Muestra el incremento en los niveles de aneuploidía a medida que la población celular se va duplicando.

Fig. 3. Muestra los niveles de aneuploidía en los distintos pases de MSCs, bajo condiciones de 20% y de 3% de O₂, y dos líneas hTert independientes a pase 22 (P22), bajo condiciones de 20% de O₂. Determinación por FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 8, 13 y 17. Las células no senescentes (3% O₂) tienen reducido su nivel de aneuploidía de manera significativa (p<0,05) desde el pase 2 en adelante.

Fig. 4. Representa el porcentaje de células aneuploides que presentan una o más copias extras de los cromosomas 8, 11 y 17 a diferentes pases de cultivo. En ninguno de los pases (P2-P20) ninguno de los cromosomas presenta diferencias significativas en el porcentaje de aneuploidía respecto a los otros cromosomas.

Fig. 5. a) Representa el porcentaje de células aneuploides que presentan un número de copias superior a 2 para los cromosomas 8, 10, 11 y 17, a pase tardío (P20) de 4 líneas independientes de hMSCs b) Representa la media del porcentaje de células aneuploides con número de copias superior a 2 de las 4 líneas de hMSCs a pase 20. Aproximadamente el 80% de las hMSCs a pase tardío mantienen una copia extra del cromosoma 10 (*=valor p<0,002) y sólo el 20% de las hMSCs a pase tardío presentan copias extras para los otros cromosomas.

Fig. 6. Muestra la cuantificación de los transcritos de ARNm de escinderina (*scin*), endotelina-1 (*edn-1*), kinasa A (*PRKA*) proteína de anclaje (*yotiao*) 9, *cd70*, chemokina (C-X-C) ligando 1 (*Gro-alpha*) y chemokina ligando 12 (*Factor derivado del estroma-1*) por RT-PCR utilizando un ensayo Taqman en MSCs en el pase 2 (P2) frente al pase 21 (P21). Las barras representan las veces que están alterados estos genes en cuatro líneas celulares independientes.

Fig. 7. *Muestra anafases multipolares en MSCs creciendo en 20% de O₂*. Se observan husos mitóticos aberrantes con múltiples polos, lo cual se visualiza gracias a la tinción con alfa-tubulina (paneles de la derecha), y con alineamientos cromosómicos anormales (paneles de la izquierda), tinción con DAPI, en estas mismas células. Ejemplos de células en anafase normal con dos polos mitóticos normales en MSCs creciendo en 3% de O₂.

Fig. 8. *Muestra la cuantificación del porcentaje de husos aberrantes en 40-50 células analizadas por línea celular (n=4) y concentraciones de O₂ de las MSCs en el pase 20.*

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto efectividad del método de identificación de células madre mesenquimales senescentes. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Células y condiciones de cultivo

Las células madre mesenquimales humanas se obtienen en el Inbiobank Stem Cell Bank (www.inbiobank.org) y proceden del tejido adiposo. Estas células presentan el fenotipo CD29+, CD73+ (SH3 y SH4), CD105+ (SH2), CD166+, CD45- y CD31-. Todos los donadores de las células son analizados para VIH-1, VIH-2, hepatitis B y C y micoplasma. El proceso de extracción celular se desarrolla a partir de lipoaspirados que posteriormente se tratan con colagenasa.

Las MSCs (1-2 x 10⁴ células/ml) se cultivan en un medio rico en glucosa, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma, EEUU), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma, EEUU), glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células se cultivan en presencia de dos concentraciones de O₂ diferentes, en 20% y en 3%, para así obtener una población celular senescente y otra no senescente, respectivamente, susceptibles de ser comparadas. Aquellas células capaces de adherirse a la placa se consideran el primer extracto de hMSC derivado de tejido adiposo. El medio se cambia dos veces por semana y las células se pasan una vez cada siete días hasta llegar a una confluencia aproximada del 80%. El crecimiento celular *in vitro* es monitoreado y se cuenta el número de células con un hemocitómetro.

Ejemplo 2

Medida del acortamiento de los telómeros de las células madre mesenquimales humanas creciendo in vitro

2.1. Ensayo de la longitud de los telómeros

Para analizar si la senescencia en las células madre mesenquimales humanas es debida a un acortamiento de los telómeros, se lleva a cabo una hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa (Q-FISH) usando una sonda telomérica PNA (*Peptide Nucleic Acid*) LL(CCCTAA)₃ marcada con Cy3 (Eurogentec) en el núcleo en interfase de las MSCs en cuatro líneas diferentes, creciendo a 20% de O₂ y a 3% de O₂ en pase 2 y en el pase 15 (ver Fig. 1 (A)). Después de la hibridación las células se lavan tres veces en 0,1% PBS Tween durante 10 minutos a 60°C y se deshidratan en etanol durante 5 minutos. Finalmente, se realiza una tinción de contraste en *Vectashield mountain médium* con DAPI (Vector Laboratories, Inc). Las imágenes se toman con CytoVision. Las señales de los telómeros se capturan al mismo tiempo de exposición en todas las muestras. La longitud de los telómeros en Kb se calcula en función de la fluorescencia de los fibroblastos 82-6 inmortalizados con hTert expresando las proteínas TIN2 y TIN2-13 con longitudes teloméricas estables y conocidas (3,4 y 8,4 Kb respectivamente). Las señales de los telómeros de al menos 20-30 núcleos por grupo se cuantifican usando TFL-Telo versión 2.

En las células creciendo en 20% de O₂ la media de la longitud telomérica en el pase 2 y en el pase 15 es de 8,43±1,28 Kb y 3,76±0,7 Kb, respectivamente. Las mismas células en 3% de O₂ de los mismos pases presentan una media de la longitud telomérica de 8,21±1,1 Kb y 5,04±0,95 Kb, respectivamente, lo que indica que las células que crecen bajo condiciones de estrés oxidativo (20% O₂) acortan su ADN telomérico en un grado mucho más elevado que las células cultivadas en 3% de O₂ (ver Fig. 1(B)). Esto demuestra que el ratio de acortamiento de los telómeros es 378±46 y 470±61 pares de bases por división celular en 3% de O₂ y en 20% de O₂, respectivamente. Este experimento sugiere que el crecimiento de las MSCs depende del mantenimiento de los telómeros.

2.2. Ensayo de la actividad telomerasa

Ya que la longitud de los telómeros se encuentra fuertemente influenciada por la telomerasa, se analizan los niveles de la actividad de esta enzima utilizando un ensayo TRAP basado en Q-PCR. El ensayo de la telomerasa se lleva a cabo en células madre mesenquimales y en fibroblastos, los cuales se consideran telomerasa negativos. Se emplean 5.000 MSCs por ensayo: se añaden 2 µl de la reacción de extensión a 23 µl de mezcla de reacción PCR que contiene

(1 x PCR Master Mix power SYBR Green, 5 mM EGTA, 4 ng/ μ l Oligo ACX, 2 ng/ μ l Oligo TS). La PCR se lleva a cabo en 40 ciclos a 94°C durante 10 minutos, a 94°C durante 15 segundos y a 60°C durante 1 minuto. La PCR se sigue mediante el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem) y el análisis se lleva a cabo usando el software 7900HT v2.3 (Applied Biosystem).

5 Se observa así, que las células madre mesenquimales primarias poseen un nivel equivalente de actividad telomerasa a los fibroblastos primarios que normalmente se consideran telomerasa negativos. Aunque en ambos casos se detectan bajos niveles de actividad de la telomerasa gracias a la sensibilidad del método.

10 Para confirmar que la senescencia de las MSCs depende de la actividad de la telomerasa y de la longitud de los telómeros, las MSCs primarias del pase 5 se incuban con un lentivirus (pRRL.SIN18) que codifica para la subunidad catalítica de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTert). Para comprobar la expresión de la telomerasa tras la infección se llevan a cabo ensayos TRAP.

15 Se observa que las MSCs infectadas con lenti-hTert se immortalizan, escapando de la senescencia y elongan sus telómeros dos y tres veces (ver Fig. 1 C-D).

Estos resultados indican que la senescencia de las MSC humanas derivadas del tejido adiposo es dependiente del acortamiento de los telómeros y que además la infección con la subunidad catalítica de la telomerasa es suficiente para immortalizar este tipo celular.

Ejemplo 3

25 *Análisis del nivel de ploidía de las células madre mesenquimales humanas*

Se analizan los niveles de ploidía en MSCs en interfase en los pases 2 a 15 mediante FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 8, 11 y 17 en ambas condiciones de cultivo con tensiones de oxígeno diferentes (ver Fig. 2 y 3). Para ello, las células se incuban con 10 μ g/ml de Colcemida durante 4 horas a 37°C, se tratan con 0,56% de KCl durante 15 minutos a 37°C y se fijan en metanol: ácido acético (3:1) tres veces. Las suspensiones celulares se depositan en portaobjetos y se secan al aire durante 24 horas. Antes de la hibridación los portas se tratan con solución de proteasa (0,1% Pepsina y HCl) y se fijan en 4% formaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se deshidratan con incubaciones seriadas a concentraciones crecientes de etanol (70, 90 y 100%) durante 5 minutos cada una. Las células se desnaturalizan en 70% formamida desionizada y 2X SSC durante 5 minutos a 73°C. Seguidamente se deshidratan como se ha descrito anteriormente. Tras la deshidratación las células se incuban durante 24 h a 37°C en oscuridad, y se añade a las células 2-3 μ l de sondas comerciales específicas de regiones CEP y LS1 de los centrómeros de los cromosomas 8, 10, 11 y 17 (kit comercial *Breast Aneusomy Multi-Color Probe*-<http://www.abbottmolecular.com>). Las células se lavan en dos pasos con 0,4XSSC/0,3% NP40 durante 2 minutos a 73°C y 2XSSC/0,1% NP40 durante 1 minuto a temperatura ambiente, tras los lavados se tiñen los cromosomas usando medio de montaje vectashield (laboratorios VECTOR) con DAPI (4,6-diamidino-2 fenilindol). Se captados entre 100 y 200 núcleos por línea celular y pase y se cuenta individualmente para cada núcleo el número de copias de cada uno de los cromosomas. Los datos se analizan estadísticamente mediante el método de *t de student* usando las 5 líneas celulares. Las señales se toman con un microscopio Nikon 90i que posee un objetivo de 100 aumentos polanfluor 1,3 N/A y filtros apropiados. Las imágenes digitales se toman mediante el software Genus (Cytovision).

Tras estudiar la presencia de aneuploidías cromosómicas en interfase en 4 líneas de hMSCs independientes usando sondas específicas para estos tres cromosomas diferentes (8, 11 y 17) se comprueba que durante el cultivo celular prolongado se produce un aumento progresivo de los niveles de aneuploidía para estos tres cromosomas (preferentemente hacia una ganancia en el número de copias), sin presentar diferencias significativas en el porcentaje de aneuploidías entre cromosomas (ver Fig. 4). Se observa que incluso en pases tempranos los niveles de aneuploidía para cualquiera de estos cromosomas son del 15%. Los resultados indican que existe una tendencia a incrementar la aneuploidía a medida que avanzan los pases del cultivo bajo ambas concentraciones de O₂, pudiendo alcanzar el 35% en el pase 15 (ver Fig. 3).

Por otro lado, se analizan los niveles de aneuploidía cromosómica para otros cromosomas en células que han sido crecidas hasta alcanzar la senescencia. De este modo, se encuentra un alto porcentaje de células en interfase a pase 20 que presentan copias extras del cromosoma 10 respecto a los otros cromosomas analizados (ver Fig. 5 (a)), llegando a alcanzar niveles próximos al 80% de células con copias extras para el cromosoma 10 respecto a porcentajes cercanos a la 20% para los otros 3 cromosomas (valor $p < 0,002$) (ver Fig. 5 (b)). Estas observaciones citogenéticas indican: 1) que copias extras del cromosoma 10 están asociadas a la senescencia de las hMSCs y 2) que la adquisición de copias extras para el cromosoma 10 está proporcionando a estas células una ventaja selectiva en estas condiciones de cultivo. *Por lo tanto, se propone que el cromosoma 10 puede ser utilizado como un biomarcador de senescencia y de inestabilidad genética de las células hMSCs.*

Un posible factor inductor de la aneuploidía es el acortamiento de los telómeros. Para medir si este acortamiento es el responsable de la aneuploidía observada en las MSCs se miden los niveles de aneuploidía de las células inmortalizadas hTert-MSCs creciendo en 20% de O₂. Estas células en el pase 22 muestran 19,48% y 13,70% de aneuploidía

(ver Fig. 3) lo cual es similar al nivel de aneuploidía del pase 2 de las MSC, lo que indica que el acortamiento de los telómeros es un factor importante que induce aneuploidía.

5 Ejemplo 4

Perfil de expresión génica de pases avanzados de cultivos de células madre mesenquimales humanas: desregulación de los genes encargados del control del nivel de ploidía

10 Para buscar posibles biomarcadores de inestabilidad genética y descubrir los mecanismos que juegan un papel importante en la senescencia de las MSCs humanas, se lleva a cabo un análisis de la expresión génica de las MSC creciendo en el pase 2 (n=4) y en el pase 21 (n=4) en 20% de O₂. Se emplea el protocolo de análisis de la expresión génica basado en *microarrays* de un color (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) para amplificar y marcar el ARN. Se realiza una retrotranscripción de 400 ng del total del ARN mediante el Primer promotor T7 y MMLV-RT.
 15 El ADNc se convierte a ARNa utilizando la ARN polimerasa T7, que amplifica el material diana e incorpora CTP marcado con cianina 3 simultáneamente. Las muestras se hibridan al *microarray* de todo el genoma humano 4 x 44K (G4112F, Agilent Technologies). Se hibridan 1,65 mg del ARNa marcado con Cy3 durante 17 horas a 65°C en un set de hibridación en estufa (G2545A, Agilent) a 10 rpm en una concentración final de 1X GEx Hybridization Buffer HI-RPM. Los arrays se lavan y se secan por centrifugación. Se escanean a una resolución de 5 mm en un escáner de alineamiento de *microarrays* de ADN (G2565BA, Agilent Technologies). Las imágenes aportadas por el escáner se analizan utilizando el software de extracción de rasgos (Feature Extraction, Agilent Technologies).

Los datos de la extracción de rasgos se importan al software GeneSpring® GX versión 9.0. (Agilent Technologies). Se cuantifican los valores de la normalización y de la expresión (log₂ transformado) para cada sonda. Las sondas también se marcan (*presente, marginal, ausente*) mediante GeneSpring®. Se seleccionan para los siguientes análisis aquellas sondas cuyos valores de señal se encuentran por encima del percentil más bajo (20) y marcadas como *presente* o *marginal* en el 100% de las replicaciones en al menos una de las dos condiciones en estudio (23.716 sondas).

El análisis estadístico de la expresión génica diferencial entre el pase 21 y el pase 2 se realiza mediante un test *two-class paired SAM*.

Se utiliza un análisis de enriquecimiento génico y vías de señalización utilizando el software *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems®) para generar una red de interacción entre los genes de interés y para el análisis funcional de los genes específicos, y así analizar qué procesos o vías de señalización están implicados en la inestabilidad genética.

El ARN de las MSCs se extrae utilizando el método estándar TRIzol y la reacción de retrotranscripción se lleva a cabo mediante el kit de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen). Se añaden 10 ng de ADNc por reacción a 10 µl de 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las sondas *Taqman* que se han empleado en los ensayos de expresión génica para la cuantificación del ARNm son las que se describen a continuación en la tabla 1 (Applied Biosystems):

TABLA 1

Sondas Taqman empleadas para la cuantificación del ARNm de los genes empleados como biomarcadores de senescencia

CXCL1	Hs00605382_gH
SCIN	Hs00263961_m1
CXCL12	Hs00171022_m1
EDN1	Hs01115919_m1
AKAP9	Hs00323978_m1
CD70	Hs00174297_m1

La PCR se carga en un aparato ABI PRISM 7700 y se cuantifica utilizando el software 7900HT v2.3 (Applied Biosystem).

Estos análisis indican que las células de los pases avanzados del cultivo tienen sobreexpresados 23 genes y reducida la expresión de 17 genes, q (%)<15%. El análisis funcional muestra que existen 69 genes asociados a procesos de cáncer y del ciclo celular que están significativamente alterados (p< 0,02) en los datos de expresión génica. Dentro de la categoría de ciclo celular y cáncer, 8 genes se encuentran alterados significativamente (FDR<12%) (Tabla 2).

De estos, 5 codifican para proteínas que están implicadas en ploidía y poliploidización: escinderina (SCIN), Kinasa A proteína de anclaje (yotatio) 9 (AKAP9) y Endotelina-1 (EDN-1) que se encuentran sobreexpresadas 12,31 veces, 2,36 veces y 1,89 veces, respectivamente, y CXCL12 y CXCL1 que presentan una expresión reducida 7,14 y 11 veces, respectivamente (Tabla 2). Para verificar el análisis de expresión génica y el análisis de las vías de señalización se realiza una RT-PCR para la expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN1, CXCL1, CXCL12 y CD70 en MSCs en el pase 2 y en el pase 21 y se observa un aumento significativo en la expresión de SCIN, AKAP9, EDN1 ($p < 0.05$), una reducción significativa en la expresión de CXCL1 y CD70 ($p < 0.05$) y una tendencia a la reducción en la expresión de CXCL12 ($p = 0.09$) (ver Fig. 6).

TABLA 2

Resultados del análisis de expresión génica de las MSCs en el pase 21 respecto a las células del pase 2. Solo están representados aquellos genes que se identifican con el *Ingenuity Pathway Analysis* como expresados de manera diferencial significativamente ($p < 0,02$) y que están implicados en el ciclo celular y en el control de la ploidía

Gen	Descripción	Veces que está alterado	LOG de veces que está alterado	q-valor (%)
SCIN	escinderina (SCIN)	12,31	3,62	2,95
ACVR1C	receptor de activina A, tipo IC	2,94	1,56	2,95
AKAP9	kinasa A (PRKA) proteína de anclaje (yotatio) 9	2,36	1,24	11,50
EDN1	endotelina 1 (EDN1)	1,89	0,92	5,03
CXCL2	chemokina (C-X-C) ligando 2	0,19	-2,39	4,61
CXCL12	ARNm de la proteína FLJ00404	0,14	-2,86	3,69
CD70	molécula CD70 (CD70)	0,10	-3,36	3,69
CXCL1	chemokina (C-X-C) ligando 1	0,09	-3,45	0,00

Como los resultados del FISH muestran que las MSCs creciendo en 20% de O_2 sufren un aumento significativo en la aneuploidía comparado con las mismas células creciendo en 3% de O_2 , se analiza si algunos de los genes identificados mediante el análisis de la expresión génica y el análisis de las vías de señalización cambian su expresión de acuerdo con la concentración de O_2 . Así, en las células creciendo en presencia de 20% O_2 hay un incremento en la expresión de SCIN, EDN-1 y AKAP9 y una reducción en la expresión de CXCL12. Esta expresión diferencial demuestra el potencial de estos genes para ser usados como biomarcadores de la estabilidad genética y de la senescencia en MSCs.

Ejemplo 5

Análisis de los efectos de la expansión in vitro sobre el huso mitótico de células madre mesenquimales humanas creciendo a 20% de O_2

Los resultados de expresión génica sugieren que además del acortamiento de los telómeros, los defectos en el huso mitótico podrían estar implicados en la generación de aneuploidía en las MSCs. A la luz de esta posibilidad se analiza el porcentaje de polos en los husos mitóticos de las MSCs. Las MSCs creciendo en 20% de O_2 y 3% de O_2 de los pases 18 a 20 se siembran en cubreobjetos de cristal y se tratan con 0,1% de gelatina. Los cubreobjetos se lavan dos veces en PBS, se fijan en 4% de PBS paraformaldehído durante 15 minutos, se permeabilizan en PBS, 0,25% Tritón X-100 durante 10 minutos y se bloquean en PBS-0,1% Tween, 1% BSA durante 1 hora. Los cubreobjetos se incuban con un anticuerpo anti-alfa tubulina (CP06 Calbiochem) (1:100) durante 1 hora. La detección se lleva a cabo con una dilución 1:200 del anticuerpo secundario conjugado Goat anti-mouse Alexa Fluor-488. También se lleva a cabo una tinción con DAPI (ver Fig. 7). Se analizan 32-49 células mitóticas por línea en 4 líneas independientes por concentración de oxígeno. Todas las líneas se analizan en el pase 20+/-2.

Este análisis indica que las MSCs creciendo en 20% O_2 durante 18-20 pases presentan una media de mitosis multipolar de 9,7+/-0,29% mientras que las mismas células creciendo en 3% de O_2 solo mostraron un 3,4+/-0,18% de defectos en el huso (ver figura 8). Esto indica que las células senescentes presentan un número de mitosis multipolares superior al que presentan las células no senescentes.

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes que comprende:

- 5
- a. medir la longitud de los telómeros de los cromosomas de la célula madre mesenquimal,
 - b. determinar el nivel de ploidía de la célula madre mesenquimal del paso (a),
 - 10 c. analizar la presencia de mitosis multipolar en la célula madre mesenquimal del paso (b),
 - d. analizar el nivel de expresión de los genes SCIN, EDN-1, AKAP9, CXCL1, CXCL12 y/o CD70 en la célula madre mesenquimal del paso (c), y
 - 15 e. asociar los datos obtenidos en los pasos (a)-(d) con un fenotipo senescente.

2. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 1 donde la medida de la longitud de los telómeros de los cromosomas del paso (a) se realiza mediante al menos uno de los siguientes métodos: FISH cuantitativo y/o TRAP.

3. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la determinación del nivel de ploidía del paso (b) se realiza mediante la hibridación con sondas cromosómicas específicas y un posterior recuento de su señal fluorescente.

4. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 3 donde las sondas cromosómicas específicas son sondas CEP.

5. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 4 donde las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17.

6. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 5 donde las sondas CEP son específicas del cromosoma 10.

7. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el fenotipo senescente del paso (e) se caracteriza por presentar:

- a. una reducción en la longitud de los telómeros de los cromosomas respecto a una célula no senescente,
- b. aneuploidía,
- c. mitosis multipolar,
- d. una expresión elevada de los genes SCIN, AKAP9 y/o EDN-1, y/o
- e. una expresión reducida de los genes CXCL1, CXCL12 y/o CD70.

8. Método de identificación de células madre mesenquimales senescentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde las células madre mesenquimales proceden de un humano.

9. Kit de identificación de células madre mesenquimales senescentes que comprende: sondas PNA, sondas CEP y sondas Taqman específicas para los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y CD70.

10. Kit de identificación de células madre mesenquimales senescentes según la reivindicación 9 donde las sondas CEP son específicas de los cromosomas 8, 10, 11 y/o 17.

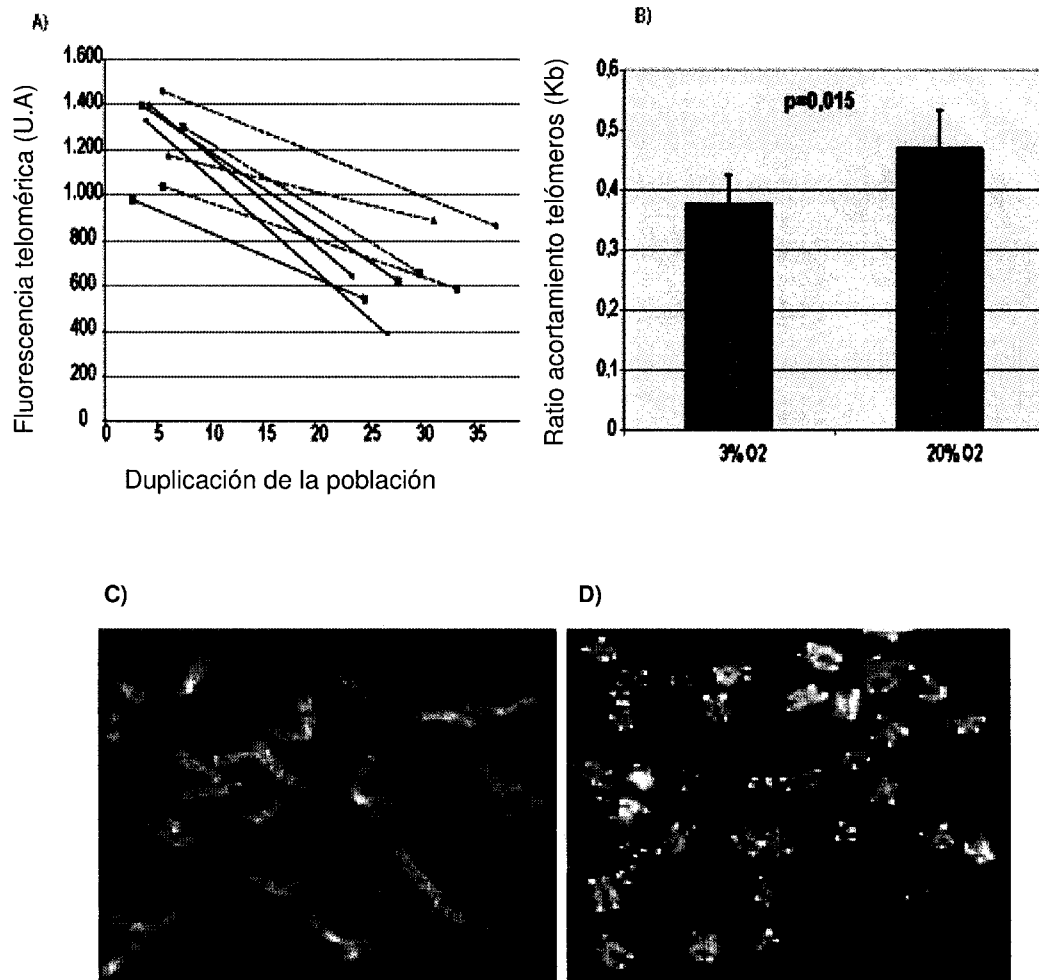


FIG. 1

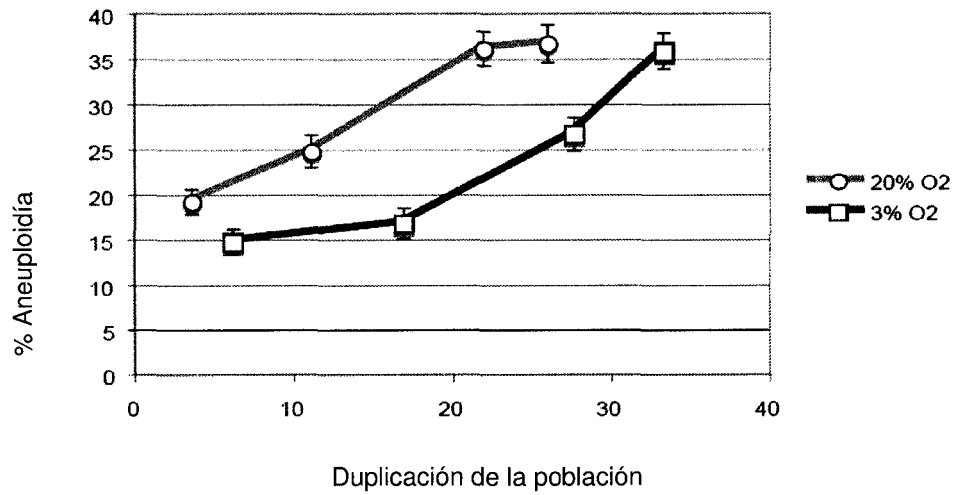


FIG. 2

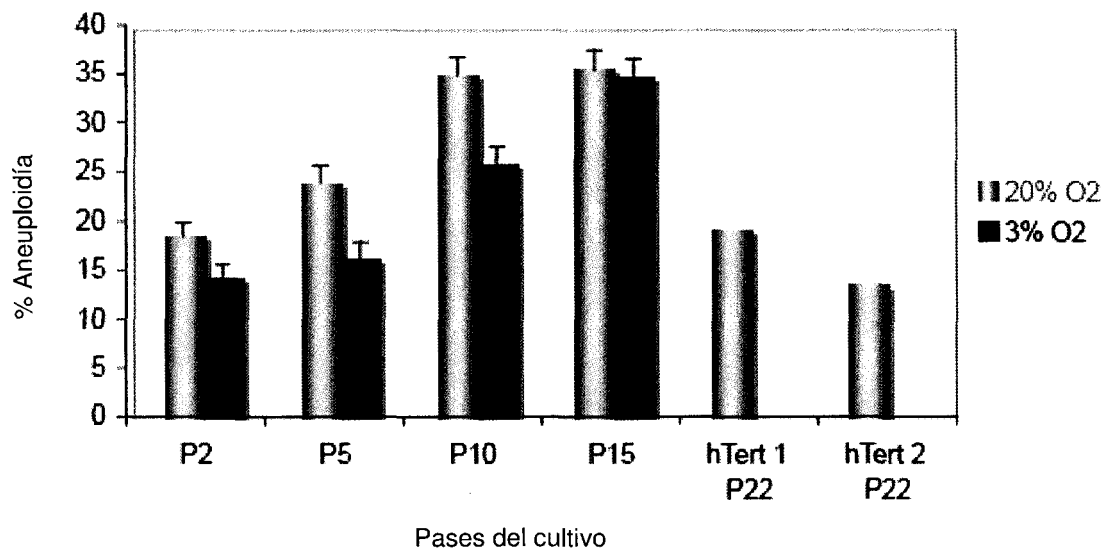


FIG. 3

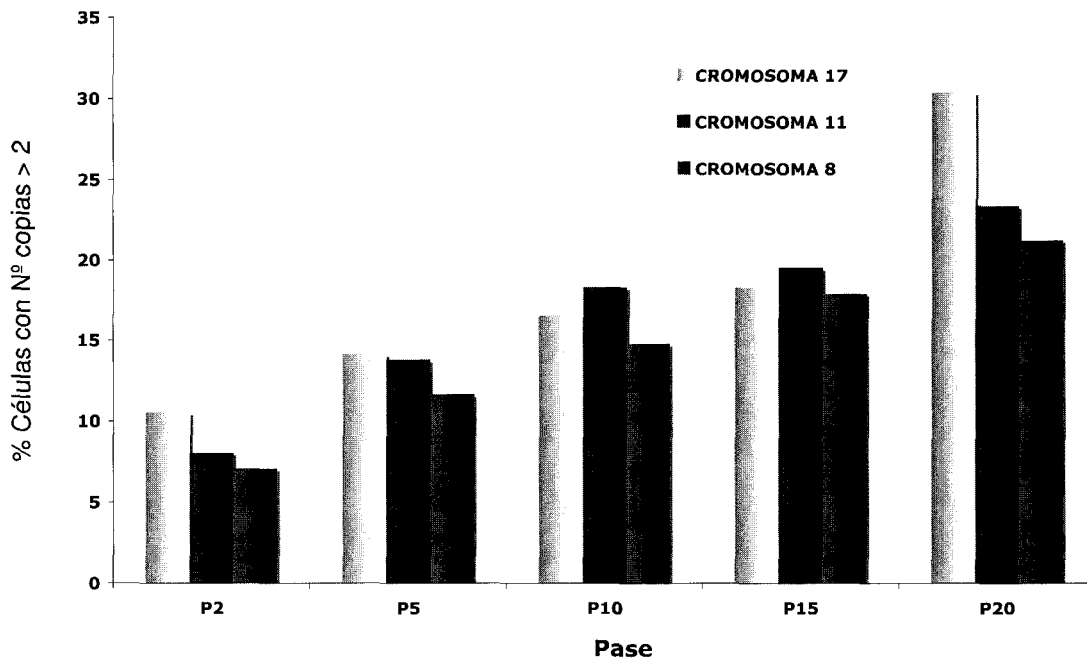


FIG. 4

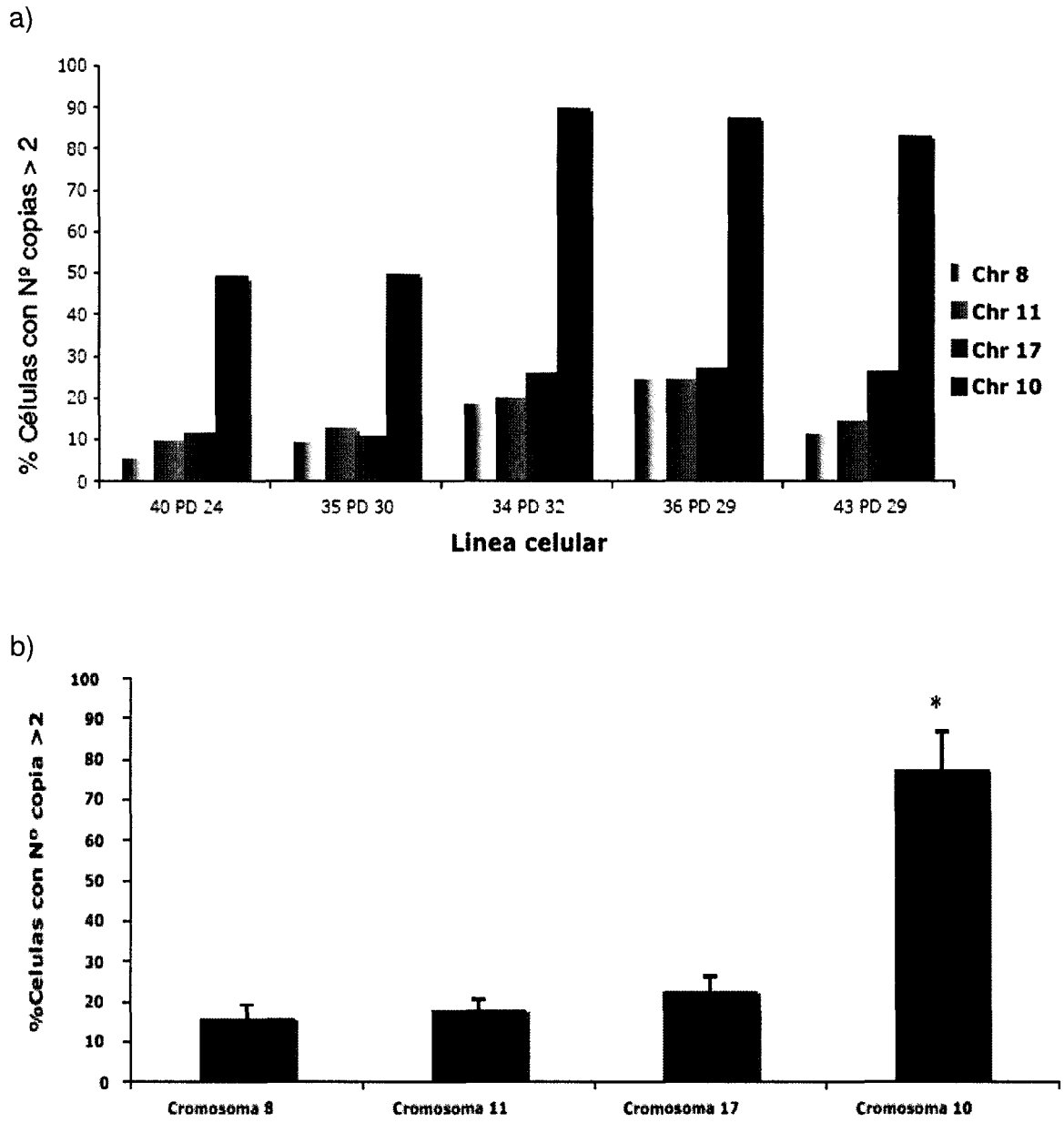


FIG. 5

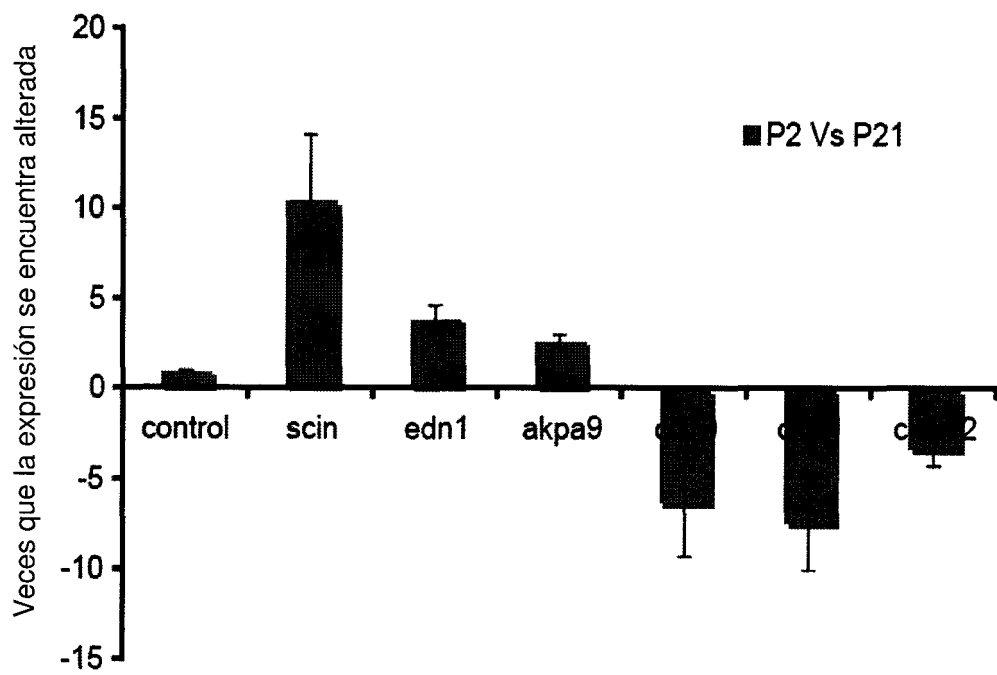


FIG.6

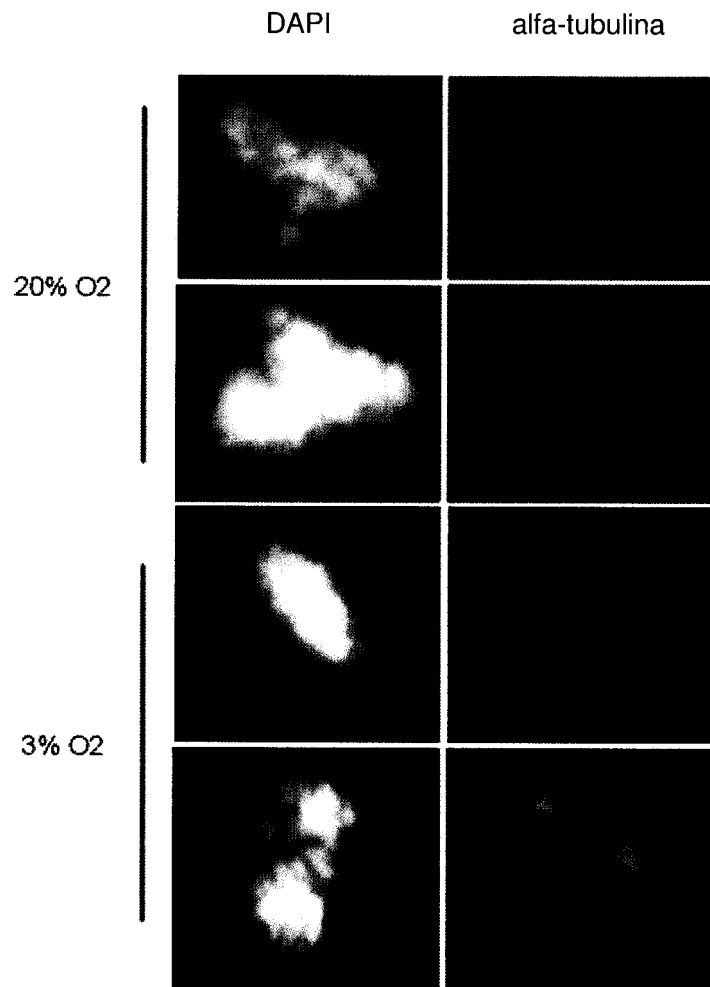


FIG. 7

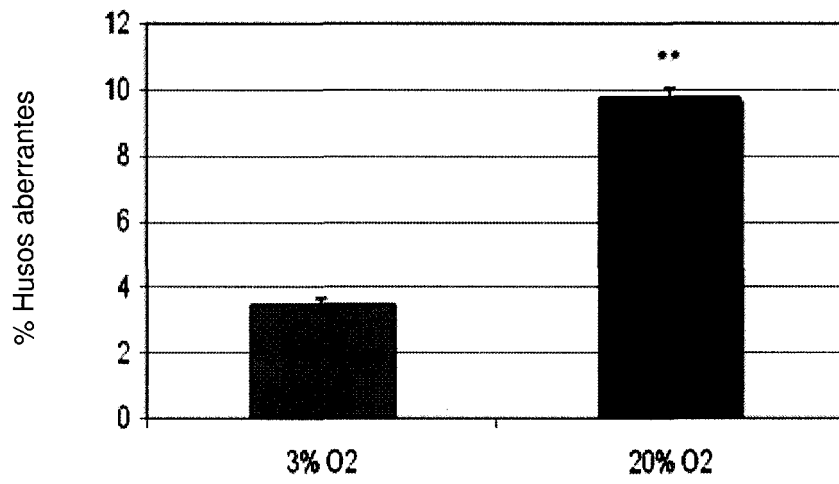


FIG. 8



②① N.º solicitud:200930540

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	LECHEL, A., <i>et al.</i> The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. EMBO reports. Marzo 2005. Vol. 6, nº 3, páginas 275-281. ISSN 1469-221X. Ver todo el documento, especialmente Resumen, primer párrafo de Resultados y primer párrafo de Discusión.	1-4, 7, 8
Y	WALL, I.B., <i>et al.</i> Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. The Journal of investigative dermatology. Octubre 2008. Vol 128, nº 10, páginas 2526-2540. ISSN 1523-1747 (Electrónico). Ver todo el documento, especialmente Resumen, Introducción, sexto apartado de Resultados, primera columna de página 2535, y Tablas 1, 2 y 3.	1-4, 7, 8
A	WO 2009073518 A1 (NEW YORK CHEMICAL COLLEGE) 11-06-2009. Ver todo el documento.	1-10
A	CHAMBERS, S.M., <i>et al.</i> Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. PLoS biology. Agosto 2007. Vol. 5, nº 8, páginas e201. ISSN 1545-7885 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.11.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200930540

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YOON, I.K., <i>et al.</i> Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. <i>Experimental gerontology</i> . Septiembre 2004. Vol. 39, nº 9, páginas 1369-1378. ISSN 0531-5565. Ver todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.11.2010

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/0775(2010.01)
G01N33/53(2006.01)
G06F19/00(2006.01)
C12Q1/68(2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, G01N, G06F, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.11.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5, 6, 9, 10	SI
	Reivindicaciones 1-4, 7, 8	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LECHEL, A., <i>et al.</i> EMBO reports. Marzo 2005. Vol. 6, nº 3, páginas 275-281. ISSN 1469-221X.	Marzo-2005
D02	WALL, I.B., <i>et al.</i> The Journal of investigative dermatology. Octubre 2008. Vol 128, nº 10, páginas 2526-2540. ISSN 1523-1747 (Electrónico).	Octubre-2008
D03	WO 2009073518 A1 (NEW YORK CHEMICAL COLLEGE)	11-06-2009
D04	CHAMBERS, S.M., <i>et al.</i> PLoS biology. Agosto 2007. Vol. 5, nº 8, páginas e201. ISSN 1545-7885 (Electrónico).	Agosto-2007
D05	YOON, I.K., <i>et al.</i> Experimental gerontology. Septiembre 2004. Vol. 39, nº 9, páginas 1369-1378. ISSN 0531-5565.	Septiembre-2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud describe y reivindica un método para identificar células madre mesenquimales senescentes que comprende medir la longitud de los telómeros por FISH cuantitativo o TRAP, determinar el nivel de ploidía en la célula mediante hibridación con sondas cromosómicas específicas, analizar la presencia de mitosis multipolares y analizar (por técnicas de microarrays y RT-PCR) la expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1 (cuyos niveles de expresión están incrementados en células senescentes), CXCL1, CXCL12 y/o CD70 (cuya expresión se inhibe en células senescentes).

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método de la invención, tal y como se reivindica, por lo que la solicitud cumple el requisito de novedad del artículo 6 de la Ley de Patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. Se trata de un estudio acerca del efecto del acortamiento de los telómeros sobre la inducción de senescencia en hígado de ratón. En este artículo, concretamente en el resumen y en el primer apartado de los epígrafes "Resultados" y "Discusión", se indica claramente que la entrada de las células en senescencia va acompañada de un acortamiento de los telómeros, mitosis aberrantes y poliploidía, además de husos mitóticos trifásicos. Por tanto, en el documento D01 encontramos 3 de las 4 etapas del método reivindicado en la solicitud, faltando el análisis de la expresión de los genes SCIN, AKAP9, EDN-1, CXCL1, CXCL12 y/o CD70.

En el documento D02 se describe un análisis de expresión génica por microarray y ELISA de fibroblastos senescentes. Como en D01, también en este documento se asocia la erosión telomérica con la senescencia replicativa. El análisis muestra que, entre otros, los genes CXCL1 y 12 presentan bajos niveles de expresión (ver tablas 2 y 3).

A la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02, el experto en la materia podría, sin realizar ningún esfuerzo inventivo, combinar lo divulgado en ambos documentos para llegar al método de la invención. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 4, 7 y 8 no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes, pues el mero hecho de que en la solicitud se empleen otro tipo de células no confiere actividad inventiva, y los métodos de las reivindicaciones 2, 3 y 4 son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, como el propio solicitante indica en la descripción.

En el documento D03 se describe un método para el aislamiento de células madre cardíacas no-senescentes, basado en determinar la longitud de los telómeros, la actividad telomerasa y la expresión del receptor IGF-1 (ver, p.ej., la reivindicación 1). Puesto que el método es diferente al de la presente solicitud, este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la misma.

En el documento D04 se divulga un análisis por microarray de los cambios en la expresión génica en células madre hematopoyéticas senescentes. En él se concluye que aumenta la expresión de genes relacionados con estrés celular, inflamación y agregación de proteínas, y disminuye la expresión de genes involucrados en preservación de la integridad del genoma y en el remodelado de la cromatina. Ninguno de los genes seleccionados en el estudio coincide con los genes reivindicados, por lo que el documento D04 no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Finalmente, en el documento D05 encontramos otro análisis de expresión génica en fibroblastos senescentes, empleando microarray y RT-PCR. En este caso se cita uno de los genes empelados en el método reivindicado en la solicitud (CXCL1), pero, mientras en D05 este gen aumenta su expresión en senescencia, en la solicitud la disminuye. Tampoco D05 afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.