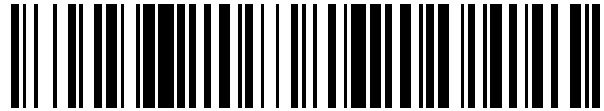


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 042**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2005** **E 10183073 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015** **EP 2292736**

54 Título: **Identificación y aislamiento de células multipotentes de tejido mesenquimal no osteocondral**

30 Prioridad:

04.10.2004 ES 200402355

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

04.05.2015

73 Titular/es:

TIGENIX, S.A.U. (50.0%)
Parque Tecnológico de Madrid, C/ Marconi, 1
28760 Tres Cantos (Madrid), ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)

72 Inventor/es:

GARCÍA CASTRO, ROSA ANA;
FERNÁNDEZ MIGUEL, MARÍA GEMA;
GARCÍA ARRANZ, MARIANO;
GONZÁLEZ DE LA PEÑA, MANUEL ÁNGEL y
GARCÍA OLMO, DAMIÁN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 535 042 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

Identificación y aislamiento de células multipotentes de tejido mesenquimal no osteocondral

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una población celular aislada sustancialmente homogénea pasada de forma consecutiva que comprende células adultas multipotentes que se han aislado a partir de tejido adiposo y están caracterizadas por la presencia o ausencia de un conjunto de marcadores de superficie.

Antecedentes de la invención

10 Las células madre presentan como características diferenciales el ser células capaces de automantenerse y de diferenciarse a uno o más tipos celulares. Aunque las investigaciones sobre las células madre y sus aplicaciones se encuentran en una fase inicial, las células madre adultas presentes en la médula ósea han sido utilizadas en trasplantes durante más de 30 años. No obstante, en los últimos años la tecnología de las células madre ha experimentado un importante desarrollo que ha hecho que, en la actualidad, sean consideradas como una prometedora fuente de tejidos y órganos, presentando un importante potencial terapéutico en la reparación y regeneración de tejidos.

15 El uso de células madre constituye una terapia alternativa para diversas patologías humanas, en especial, en aquellas en que existe una pérdida de células funcionales, incluyendo: lesiones condrales, óseas y musculares, enfermedades neurodegenerativas, rechazo inmunológico, enfermedades cardíacas y desórdenes de la piel (ver los números de patente US 5.811.094, US 5.958.767, US 6.328.960, US 6.379.953, US 6.497.875).

20 Además de las aplicaciones en terapia celular, las células madre presentan potenciales aplicaciones en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Por una parte, el estudio de los mecanismos implicados en la proliferación y diferenciación de las células madre tiene un gran valor en el proceso de búsqueda y caracterización de nuevos genes involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la diferenciación celular y los procesos neoplásicos (Phillips et al., 2000; Ramalho-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002). Por otra parte, la tecnología de las células madre permite la generación de tipos celulares especializados y el desarrollo de modelos celulares de enfermedades humanas y animales, en los que poder determinar la eficacia y toxicidad de nuevos principios activos en fase preclínica (ver patente US 6.294.346).

25 Una célula madre somática adulta es una célula indiferenciada que se halla en un tejido diferenciado y que presenta capacidad de proliferación y de diferenciación a uno o más tipos celulares. Las células madre adultas están presentes en diversos tejidos adultos, encontrándose ampliamente descrita su presencia en médula ósea, sangre, córnea, retina, cerebro, músculo, esqueleto, pulpa dental, epitelio gastrointestinal, hígado y piel (Jiang et al., 2002). Por su naturaleza, las células madre adultas pueden usarse en un entorno autólogo, y como tales, son inmunocompatibles y su uso no presenta impedimentos de tipo ético.

30 Una célula madre adulta debe ser capaz de dar lugar a células totalmente diferenciadas que presenten fenotipos maduros y se integren en el tejido en el que se encuentran, siendo capaces de realizar aquellas funciones especializadas propias de dicho tejido. El término fenotipo, se refiere a las características observables de la célula: morfología característica, interacciones con otras células y con la matriz extracelular, proteínas de la superficie celular (marcadores de superficie) y funciones características.

35 Se han descrito diversas poblaciones de células madre adultas capaces de contribuir a la reparación de distintos tejidos. Entre dichas poblaciones, las de origen mesodérmico tienen un especial interés, pues ofrecen la posibilidad teórica de regenerar un gran número de tejidos conectivos clínicamente muy relevantes, tales como: hueso, cartílago, tendones, músculo esquelético, músculo cardíaco, endotelio vascular, grasa subdérmica y estroma medular. La primera población celular aislada de este tipo fueron las llamadas células madre mesenquimales (MSC), contenidas en el estroma de la médula ósea (Friedenstein et al., 1976; Caplan et al., 1991; Pittenger et al., 1999). Estas células han sido extensamente caracterizadas y estudios realizados en las mismas han demostrado que pueden diferenciarse a distintos linajes celulares mesenquimales, tales como: adipocitos (Beresford et al., 1992), condrocitos (Johnstone et al., 1998), mioblastos (Wakitani et al., 1995) y osteoblastos (Haynesworth et al., 1992). Asimismo, presentan también capacidad de diferenciación a neuronas (Sánchez-Ramos et al., 2000).

40 La fuente ideal de células madre adultas es aquella en que el proceso de obtención es fácil, no invasivo y permite el aislamiento de un número de células suficientemente alto. En particular, una fuente de células madre que permita que puedan ser fácilmente aisladas de un sujeto vivo sin que esto implique riesgos o molestias significativas y que permita obtener un rendimiento elevado con una contaminación mínima por otros tipos celulares, sin que el coste del aislamiento y cultivo sea excesivo.

45 El proceso de obtención de médula ósea es doloroso y el rendimiento es muy bajo, siendo necesario un incremento importante del número de células, mediante su expansión *ex vivo*, para obtener una cantidad clínicamente relevante. Dicho paso implica un coste, a nivel económico y de tiempo, así como un mayor riesgo de contaminación y de pérdida de material. Por estas razones, sería muy deseable el poder aislar células multipotentes a partir de tejidos

mesenquimales distintos de la médula ósea. En particular, dada su accesibilidad quirúrgica, sería muy conveniente aislar dichas células a partir de tejidos mesodérmicos no osteocondrales, tales como, pero sin limitarse a: dermis, grasa y músculo esquelético.

5 La presencia de diversas poblaciones de células madre multipotentes en tejidos blandos derivados del mesodermo embrionario, ha sido descrita por varios autores. Así, por ejemplo, se ha descrito la obtención de células multipotentes a partir de músculo esquelético y otros tejidos conectivos de mamíferos (Young et al. 1993, Rogers et al. 1995). También han sido obtenidas células multipotentes a partir de tejidos lipoaspirados humanos (Zuk et al., 2001). El documento WO/022988 A2 da a conocer células madre derivadas de tejido adiposo y fracciones enriquecidas con células madre derivadas de tejido adiposo, así como su capacidad para diferenciarse a distintos linajes celulares. Otro ejemplo de células multipotentes aisladas de tejidos conectivos adultos, lo constituyen las llamadas Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC) obtenidas a partir de médula ósea (Jiang et al., 2002). En principio, todas estas poblaciones celulares aisladas podrían ser utilizadas en la reparación y regeneración de tejidos conectivos de forma similar a las MSC de médula ósea (Caplan et al., 2001). Sin embargo, salvo las MAPC, ninguna de estas poblaciones ha sido, hasta la fecha, suficientemente caracterizada a nivel fenotípico. Por tanto, aunque ha sido descrita la presencia de células adultas multipotentes en diversos tejidos conectivos, en el estado actual de la técnica no es posible identificar y distinguir entre sí de manera inequívoca distintos tipos de poblaciones celulares multipotentes obtenidas a partir de tejidos blandos, ni obtener una población sustancialmente pura.

En la actualidad, la caracterización fenotípica de células madre comprende la determinación de marcadores, tales como receptores de la superficie celular, entre otros; y la determinación de su capacidad de diferenciación en cultivo *in vitro*. Cada tipo celular presenta una determinada combinación de marcadores en su superficie, es decir, presenta un perfil de expresión determinado que caracteriza dicho tipo celular distinguiéndolo de otros.

Diferentes combinaciones de marcadores de superficie han sido utilizados para identificar y aislar poblaciones sustancialmente puras de células madre hematopoyéticas de médula ósea de ratones, como: [$\text{Lin}^{\text{neg/low}}$, $\text{Thy1.1}^{\text{low}}$, $\text{c-Kit}^{\text{high}}$, Sca-1^+], [Lin^- , $\text{Thy1.1}^{\text{low}}$, Sca-1^+ , $\text{rhodamine 123}^{\text{low}}$] (Morrison, S.J. et al., 1995) o [Lin^- , CD34^{int} , c-Kit^+ , Sca-1^+] (Osawa, M. et al., 1996). Asimismo, combinaciones similares de marcadores se han utilizado para enriquecer poblaciones de células madre hematopoyéticas humanas [Lin^- , Thy1^+ , CD34^+ , $\text{CD38}^{\text{neg/low}}$] (Morrison, S.J. et al., 1995).

Actualmente, no se conoce cuantos marcadores asociados con células comprometidas y diferenciadas se encuentran también presentes en las distintas poblaciones de células mesenquimales adultas multipotentes. Por ejemplo, un marcador comúnmente utilizado en el enriquecimiento en células mesenquimales adultas multipotentes es CD44 (receptor del ácido hialurónico). No obstante, CD44 se encuentra también presente en diversos tipos celulares comprometidos y diferenciados. La incertidumbre de cuáles son los marcadores asociados a células madre que permiten distinguir las de aquellas células que presentan un mayor grado de diferenciación, junto con el bajo porcentaje de células madre presentes en tejidos adultos, han hecho difícil la identificación y purificación de poblaciones de células mesenquimales adultas multipotentes.

Una desventaja importante del uso de las células adultas multipotentes consiste en que la mayoría de las actuales fuentes de obtención de células adultas multipotentes están contaminadas con otros tipos celulares, complicando el proceso de identificación, aislamiento y caracterización de las poblaciones de células adultas multipotentes cuyo objetivo es ser utilizadas con fines terapéuticos u otros usos. De aquí el interés de obtener una población de células adultas multipotentes aisladas en una forma sustancialmente pura.

La caracterización de una población de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral, permitirá el diseño de un método de identificación y aislamiento, así como también la identificación de factores de crecimiento asociados con su autorregeneración. Además, puede que existan factores de crecimiento asociados con las primeras fases de diferenciación, cuyo conocimiento permitiría una diferenciación más eficiente *in vivo* y *ex vivo*, así como ejercer un control sobre la proliferación de las células madre.

La presente invención proporciona una población de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral, preferentemente de tejido adiposo, aisladas y caracterizadas mediante marcadores inmunofenotípicos presentes en la superficie celular, demostrando además su multipotencialidad.

Asimismo, la presente invención proporciona un método para la identificación y aislamiento de una población de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral, en función de un patrón de marcadores inmunofenotípicos característicos, permitiendo la obtención de una composición de marcadores de células madre multipotentes sustancialmente homogénea.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a una población celular aislada sustancialmente homogénea pasada de forma consecutiva, a continuación en el presente documento denominada la población celular de la invención, que comprende células adultas multipotentes aisladas, que (a) se han aislado a partir de tejido mesenquimal no osteocondral; (b) expresa CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105; y (c) carece de la expresión de CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133. Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención presentan la capacidad

de proliferar y ser diferenciadas a distintos linajes. En una realización particular, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención pueden diferenciarse a células de fenotipo óseo, células de fenotipo muscular y células de fenotipo neuronal.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una población de células adultas multipotentes de la invención para su uso terapéutico, por ejemplo, para su uso como un medicamento.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células adultas multipotentes de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, dicha composición farmacéutica es útil para la reparación y regeneración de tejidos.

Breve descripción de las figuras

10 Las figuras 1a-1d muestran los histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes al perfil de marcadores de superficie obtenidos a partir de células aisladas de muestras de lipoaspirados de un donante sano. Los resultados muestran la evolución de los marcadores estudiados a lo largo del tiempo en los cultivos celulares y se indica en cada caso a qué momento del periodo de cultivo pertenecen las células analizadas. La figura 1a muestra la expresión de marcadores realizados a día 0. La figura 1b muestra la expresión de marcadores a día 7 en cultivo. La figura 1c muestra la expresión de marcadores a las 4 semanas en cultivo y la figura 1d muestra la expresión de marcadores a los 3 meses en cultivo.

20 Las figuras 2a-2d muestran los histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes al perfil de marcadores de superficie obtenidos a partir de células aisladas de muestras de lipoaspirados de un segundo donante sano. Los resultados muestran la evolución de los marcadores estudiados a lo largo del tiempo en cultivo y se indica en cada caso a qué momento del periodo de cultivo pertenecen las células analizadas. La figura 2a muestra la expresión de marcadores realizados a día 0. La figura 2b muestra la expresión de marcadores a día 7 en cultivo. La figura 2c muestra la expresión de marcadores a las 4 semanas en cultivo y la figura 2d muestra la expresión de marcadores a los 3 meses en cultivo.

25 Las figuras 3a-3d muestran los histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes al perfil de marcadores de superficie obtenidos a partir de células aisladas de muestras de lipoaspirados de un tercer donante sano. Los resultados muestran la evolución de los marcadores estudiados a lo largo del tiempo en cultivo y se indica en cada caso a qué momento del periodo de cultivo pertenecen las células analizadas. La figura 3a muestra la expresión de marcadores realizados a día 0. La figura 3b muestra la expresión de marcadores a día 7 en cultivo y la figura 3c muestra la expresión de marcadores a las 4 semanas en cultivo y la figura 3d muestra la expresión de marcadores a los 3 meses en cultivo.

30 Las figuras 4a-4d muestran microfotografías de las células incubadas en medio osteoinductor durante tres semanas. La figura 4a muestra células madre mesenquimales de médula ósea humana (control positivo). La figura 4b muestra las células de la invención, células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral, incubadas en medio osteoinductor durante la primera semana. La figura 4c muestra las células adultas multipotentes de la invención, incubadas en medio osteoinductor durante la segunda semana. La figura 4d muestra las células adultas multipotentes de la invención, incubadas en medio osteoinductor durante la tercera semana.

Descripción detallada de la invención

40 Con el objetivo de diseñar un método de identificación y aislamiento útil que permita obtener una población definida de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral ("tejidos blando"), se realizó la caracterización fenotípica de células mesenquimales humanas aisladas obtenidas a partir de tejido adiposo subdérmico y se estudió la evolución de marcadores de superficie a lo largo de la expansión de las células *in vitro*, así como su capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares.

45 En primer lugar, se monitorizó mediante citometría de flujo la expresión de una serie de marcadores de superficie en las células adultas procedentes de tejido adiposo subdérmico, recién aisladas y a lo largo del desarrollo del cultivo *in vitro*. Para ello, se utilizaron una serie de marcadores comúnmente utilizados en la identificación de células madre, así como en la caracterización de células diferenciadas, incluyendo pero sin limitarse a: integrinas, marcadores hematopoyéticos, receptores de factores de crecimiento y receptores de matriz extracelular (Ejemplo 1).

50 La caracterización de las células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral mediante la determinación de su perfil inmunofenotípico, nos permite definir dicha población en función de la presencia o ausencia de un conjunto determinado de marcadores de superficie. Dichos marcadores, son epítomos que pueden ser identificados mediante anticuerpos específicos, constituyendo una valiosa herramienta que nos permite identificar la población, así como diseñar una estrategia de aislamiento o purificación de la misma.

55 Posteriormente, una vez caracterizadas, las células aisladas se sometieron a ensayos de diferenciación con el objetivo de mostrar su multipotencialidad. Para ello, las células aisladas y caracterizadas fueron inducidas a diferenciarse *in vitro* a células que expresen al menos una característica de una célula especializada. Los métodos que se pueden usar para inducir la diferenciación de las células adultas multipotentes de la presente invención a diversos tipos celulares

específicos son conocidos por los expertos en la materia y algunos de ellos se explican en detalle en los Ejemplos 2, 3 y 4, que muestran diferenciación *in vitro* de las células adultas multipotentes de la invención a células de fenotipo óseo, células de fenotipo muscular y células de fenotipo neuronal, respectivamente.

5 Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una población celular aislada sustancialmente homogénea pasada de forma consecutiva, a continuación en el presente documento denominada la población celular de la invención, que comprende células adultas multipotentes, que (a) se han aislado a partir de tejido mesenquimal no osteocondral; (b) expresa CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105; y (c) carece de la expresión de CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133.

10 En una realización particular, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se aíslan a partir de tejido adiposo subdérmico.

15 Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada de tejido adiposo procedente de cualquier animal adecuado, incluyendo seres humanos. También, en una realización particular, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se aíslan a partir de un mamífero, por ejemplo, un roedor, primate, etc., preferentemente, a partir de un ser humano.

20 Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención también están caracterizadas por la presencia y ausencia de un conjunto de marcadores, concretamente, dichas células están caracterizadas por que (i) son positivas para algunos marcadores [CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105] y (ii) son negativas para algunos marcadores [CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133].

25 La caracterización fenotípica de las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención mediante marcadores de superficie puede realizarse habitualmente bien mediante tinción individualizada de las células (citometría de flujo) o bien mediante cortes histológicos de la población *in situ*, realizados de acuerdo con los métodos habituales. En una realización particular, la expresión de dichos marcadores de superficie en las células adultas multipotentes de la invención se puede monitorear mediante citometría de flujo.

30 La caracterización de las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención mediante su perfil inmunofenotípico se puede utilizar para definir dichas células o población celular en función de la presencia o ausencia de un conjunto determinado de marcadores de superficie. Dichos marcadores son epítomos que pueden ser identificados con anticuerpos específicos, constituyendo una valiosa herramienta que permite identificar la población, así como diseñar una estrategia de aislamiento o purificación de la misma. Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales contra dichos marcadores de superficie para identificar las células adultas multipotentes de la invención.

La determinación del perfil de marcadores de superficie mediante anticuerpos (caracterización inmunofenotípica) puede ser directa, utilizando un anticuerpo marcado, o indirecta, utilizando un segundo anticuerpo marcado dirigido contra el anticuerpo primario específico del marcador celular, consiguiéndose una amplificación de la señal.

35 Por otra parte, la presencia o ausencia de unión al anticuerpo puede ser determinada por distintos métodos que incluyen pero no se limitan a microscopía de inmunofluorescencia y radiografía. Asimismo, se puede llevar a cabo la monitorización de los niveles de unión del anticuerpo mediante citometría de flujo, técnica que permite correlacionar los niveles de fluorocromo con la cantidad de antígenos presentes en la superficie celular unidos específicamente a los anticuerpos marcados.

40 En los ensayos de identificación o aislamiento, la población celular se pone en contacto con un reactivo específico, marcado o no, en función de si el ensayo se realiza mediante un método de detección directa o indirecta, respectivamente. El término "reactivo específico" hace referencia a un miembro de una pareja de unión específica. Como miembros de una pareja de unión específica se incluyen, pero no están limitados a, parejas de unión compuestas por antígenos y anticuerpos, parejas compuestas por antígenos MHC y receptores de células T, secuencias nucleotídicas complementarias, así como parejas de ligandos peptídicos y su receptor. Las parejas de unión específicas incluyen análogos, fragmentos y derivados de un miembro específico de la pareja de unión.

45 Resulta de particular interés, el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. La producción de anticuerpos monoclonales específicos resultará evidente para cualquier experto en la materia. En experimentos de identificación o separación de poblaciones celulares, se procede al marcaje de los anticuerpos. Para ello, se utilizan etiquetas que incluyen pero no se limitan a: partículas magnéticas, biotina y fluorocromos que permitirán la identificación o separación de aquel tipo celular al que se haya unido el anticuerpo. Así por ejemplo, el análisis de la población celular que comprende las células adultas multipotentes de la invención mediante citometría de flujo permite utilizar en una misma muestra distintos anticuerpos marcados con fluorocromos que emiten a una longitud de onda distinta. De modo que podemos conocer el perfil específico de la población para esos marcadores de superficie, así como llevar a cabo
55 una separación por el conjunto de marcadores utilizados.

La separación de las poblaciones que presentan el fenotipo de interés se puede llevar a cabo mediante técnicas de separación por afinidad, entre las que se incluyen: separación magnética (utilizando partículas magnéticas recubiertas

de anticuerpos específicos), cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a anticuerpos monoclonales o usados junto a anticuerpos monoclonales, y "panning" con el anticuerpo asociado a un soporte sólido, así como mediante otras técnicas que resulten adecuadas. Una separación más precisa se obtendría mediante citometría de flujo, técnica que permite separar poblaciones celulares en función de la intensidad de la tinción, junto con otros parámetros como el tamaño celular y la complejidad celular.

Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención presentan la capacidad de proliferar y diferenciarse a distintos linajes celulares. Los ejemplos ilustrativos no limitativos de linajes celulares a los que se pueden diferenciar las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención incluyen, por ejemplo, células de fenotipo óseo, células de fenotipo muscular y células de fenotipo neuronal.

Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención pueden proliferar y diferenciarse a células de otros linajes mediante métodos convencionales. Los métodos de identificación y subsiguiente aislamiento de células diferenciadas a partir de sus homólogos indiferenciados también se pueden llevar a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención también son capaces de expandirse *ex vivo*. Es decir, después del aislamiento, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se pueden mantener y dejar que proliferen *ex vivo* en medio de cultivo. Dicho medio comprende, por ejemplo, el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), antibióticos y glutamina, y generalmente se complementa con suero bovino fetal (FBS) al 2-20%. Está dentro de la habilidad de un experto en la materia modificar o modular las concentraciones de medios y/o complementos de medios según sea necesario para las células utilizadas. Los ejemplos de sueros incluyen FBS, suero bovino (BS), suero de ternero (CS), suero de ternero fetal (FCS), suero de ternero recién nacido (NCS), suero de cabra (GS), suero de caballo (HS), suero porcino, suero de oveja, suero de conejo, suero de rata, (RS), etc. Si las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención son de origen humano, también se contempla complementar el medio de cultivo celular con un suero humano, preferentemente de origen autólogo. Se entiende que los sueros se pueden inactivar por calor a 55-65°C si se considera necesario inactivar los componentes de la cascada complementaria. La modulación de concentraciones de suero, también puede utilizarse la retirada de suero del medio de cultivo para promover la supervivencia de uno o más tipos celulares. Preferentemente, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se benefician de concentraciones de FBS de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 25%. En otra realización, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención pueden expandirse en un medio de cultivo de composición definida, en el que el suero se reemplaza por una combinación de seroalbúmina, transferrina sérica, selenio y proteínas recombinantes, que incluyen, pero sin limitarse a: insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).

Muchos medios de cultivo celular ya contienen aminoácidos; sin embargo, algunos requieren la complementación antes de cultivar células. Dichos aminoácidos incluyen, pero sin limitarse a, L-alanina, L-arginina, L-ácido aspártico, L-asparagina, L-cisteína, L-ácido glutámico, L-glutamina, L-glicina, y similares.

Los agentes antimicrobianos también se utilizan típicamente en cultivos celulares para mitigar la contaminación bacteriana, por micoplasma y fúngica. Típicamente los compuestos antibióticos o antimicóticos utilizados son mezclas de penicilina/estreptomicina, pero pueden incluir, pero sin limitarse a amfotericina (Fungizone®), ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, etc.

Ventajosamente también se pueden utilizar hormonas en el cultivo celular e incluyen, pero sin limitarse a D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, b-estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona del crecimiento humano (HGH), etc.

Las condiciones de mantenimiento de las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención también pueden contener factores celulares que permiten que las células permanezcan en formas indiferenciadas. También es evidente que las no todas las células requieren estos factores. De hecho, estos factores pueden provocar efectos no deseados, dependiendo del tipo de célula.

Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención también se pueden transfectar o genomanipular para expresar, al menos, un polipéptido de interés. En una realización, el polipéptido de interés es un producto capaz de inducir o incrementar la expresión de genes implicados en la reparación o regeneración de un tejido.

En otro aspecto, se da a conocer un método para obtener la población celular de la invención, que comprende:

- (a) recolección del tejido adiposo;
- (b) obtención de una suspensión celular mediante digestión enzimática;
- (c) sedimentación de las células y resuspensión de las células en un medio de cultivo apropiado; y

(d) cultivo de las células en una superficie sólida y eliminación de las células que no muestran adhesión a dicha superficie sólida

(e) expansión mediante el paso de forma consecutiva de las células.

5 Las células obtenidas según dicho método contienen las características de las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "superficie sólida" hace referencia a cualquier material que permite que las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se adhieran. En una realización particular, dicho material es un material plástico tratado para promover la adhesión de células de mamífero a su superficie.

10 Las etapas a)-d) se pueden llevar a cabo mediante técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia. De manera concisa, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención pueden obtenerse mediante medios convencionales a partir de cualquier fuente de tejido mesenquimal no osteocondral a partir de cualquier animal adecuado, incluyendo seres humanos, por ejemplo, a partir de tejido adiposo humano. El animal puede estar vivo o muerto, siempre que las células de tejido mesenquimal no osteocondral del animal sean viables.

15 Típicamente, las células de tejido adiposo humano se obtienen a partir de donantes vivos utilizando protocolos bien establecidos, tales como quirúrgicos o de liposucción. De hecho, como los procedimientos de liposucción son tan comunes, el efluente de liposucción es una fuente particularmente preferente a partir de la que pueden derivar las células comprendidas en la población celular de la invención. De esta manera, en una realización particular, las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención son de tejido adiposo subdérmico humano

20 obtenido por liposucción.

La muestra de tejido mesenquimal no osteocondral se lava preferentemente antes de procesarse. En un protocolo, la muestra de tejido mesenquimal no osteocondral se lava con solución salina fisiológicamente compatible (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS)) y luego se agita vigorosamente y se deja reposar, una etapa que elimina materia suelta (por ejemplo, tejido dañado, sangre, eritrocitos, etc.) del tejido. De esta manera, las etapas de lavado y

25 reposo se repiten generalmente hasta que el sobrenadante esté relativamente libre de impurezas. Las células restantes generalmente están presentes en agrupamientos de varios tamaños, y el protocolo continúa utilizando las etapas calibradas para degradar la estructura macroscópica mientras se minimiza el daño a las propias células. Un método para lograr este objetivo es tratar los agrupamientos de células lavados con una enzima que debilita o destruye los enlaces entre las células (por ejemplo, colagenasa, dispasa, tripsina, etc.). La cantidad y duración de dicho

30 tratamiento enzimático varía, dependiendo de las condiciones empleadas, pero la utilización de dichas enzimas generalmente se conoce en la materia. De forma alternativa o junto con dicho tratamiento enzimático, los agrupamientos de células se pueden degradar utilizando otros tratamientos, tales como agitación mecánica, energía sónica, energía térmica, etc. Si se consigue la degradación mediante métodos enzimáticos, es deseable neutralizar la enzima tras un periodo adecuado, para minimizar los efectos perjudiciales en las células.

35 La etapa de degradación produce típicamente una lechada o suspensión de células agregadas y una fracción de fluido que generalmente contiene células estromales libres (por ejemplo, glóbulos rojos, células musculares lisas, células endoteliales, células de fibroblasto y células madre). La siguiente etapa en el procedimiento de separación es separar las células agregadas de las células comprendidas en la población celular de la invención. Esto se puede conseguir mediante centrifugación, que fuerza a las células hacia un sedimento cubierto por un sobrenadante. El sobrenadante pueden luego desecharse y el sedimento suspenderse en un fluido fisiológicamente compatible. Además, las células

40 suspendidas típicamente incluyen eritrocitos, y la mayoría de los protocolos es deseable lisarlos. Los métodos para lisar selectivamente los eritrocitos se conocen en la materia, y se puede emplear cualquier protocolo adecuado (por ejemplo, incubación en un medio hipertónico hipotónico, mediante lisis utilizando un cloruro de amonio, etc.). Por supuesto, si los eritrocitos se lisan, por ejemplo, mediante filtración, sedimentación o fraccionamiento por densidad.

45 Independientemente de si se lisan los eritrocitos, las células suspendidas se pueden lavar, recentrifugar y resuspender una o más veces sucesivas para alcanzar una mayor pureza. De forma alternativa, se pueden separar las células en base al perfil de marcadores de superficie de las células o en base a tamaño celular y granularidad.

Tras el aislamiento final y resuspensión, se pueden cultivar las células, y, si se desea, someter a ensayo para determinar el número y viabilidad para evaluar el rendimiento. De forma deseable, las células se cultivarán sin

50 diferenciación, sobre una superficie sólida, utilizando un medio de cultivo celular adecuado, a las densidades celulares apropiadas y condiciones de cultivo. De esta manera, en una realización particular, las células se cultivan sin diferenciación sobre una superficie sólida, normalmente fabricada de un material plástico, tales como placas de Petri o frascos de cultivo celular, en presencia de un medio de cultivo celular adecuado por ejemplo, DMEM, complementado típicamente con un 5-15% (por ejemplo, un 10%) de un suero adecuado, tal como suero bovino fetal o suero humano]

55 y se incuban en condiciones que permiten que las células se adhieran a la superficie sólida y proliferen. Después de la incubación, se lavaron las células con el fin de eliminar las células no adheridas y fragmentos de células. Las células se mantuvieron en cultivo en el mismo medio y en las mismas condiciones hasta que alcanzaron la confluencia adecuada, típicamente aproximadamente un 80% de la confluencia celular, reemplazando el medio de cultivo celular cuando fue necesario. Después de alcanzar la confluencia celular adecuada, las células se pueden expandir por medio de pasos

consecutivos utilizando un agente de desprendimiento, tal como tripsina y siembra en una superficie de cultivo celular más grande a la densidad celular apropiada (normalmente 2.000-10.000 células/cm²). Las células se pueden pasar algunas veces sin perder su fenotipo de desarrollo. Típicamente, las células se cultivan en placas a una densidad, tal como de entre aproximadamente 100 células/cm² a aproximadamente 10.000 células/cm² (tal como aproximadamente 500 células/cm² a aproximadamente 50.000 células/cm² o más particularmente, entre aproximadamente 1.000 células/cm² a aproximadamente 20.000 células/cm²). Si se desarrollan a densidades menores (por ejemplo, aproximadamente 300 células/cm²), las células pueden ser más fácilmente aisladas clónicamente. Por ejemplo, después de unos pocos días, las células cultivadas en placas a dichas densidades proliferarán en una población homogénea. En una realización particular, la densidad celular es de entre 2.000-10.000 células/cm².

Se seleccionan las células que permanecen adheridas a la superficie sólida y se analiza el fenotipo de las mismas por métodos convencionales con el fin de confirmar la identidad de las células adultas multipotentes de la invención como se mencionará a continuación. Las células que permanecen finalmente adheridas a la superficie sólida constituyen una población celular homogénea de células adultas multipotentes de la invención. El Ejemplo 1 describe de manera detallada el aislamiento de células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención a partir de tejido adiposo subdérmico humano.

Normalmente, las células que permanecen adheridas a la superficie sólida muestran el fenotipo deseado, aunque se ha de confirmar para que las células se puedan utilizar según la invención. Por lo tanto, la adhesión de células a la superficie sólida constituye un criterio para seleccionar las células adultas multipotentes de la invención. La confirmación del fenotipo de interés se puede llevar a cabo utilizando medios convencionales.

Los marcadores de superficie de las células se pueden identificar mediante cualquier técnica convencional adecuada, normalmente basada en una selección positiva/negativa, por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie de las células, cuya presencia/ausencia en las células ha de confirmarse. De esta manera, en una realización particular, se utilizan anticuerpos monoclonales contra CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105 con el fin de confirmar la ausencia de dichos marcadores en las células seleccionadas; y se utilizan anticuerpos monoclonales contra CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133 con el fin de confirmar la ausencia de dichos marcadores en las células seleccionadas. Dichos anticuerpos monoclonales son conocidos o pueden obtenerse por un experto en la materia mediante métodos convencionales.

La capacidad de las células seleccionadas para diferenciarse a distintos linajes celulares se puede someter a ensayo mediante métodos convencionales, como se dio a conocer anteriormente.

Si se desea, las poblaciones celulares proporcionadas por la presente invención se pueden expandir clónicamente utilizando un método adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población de células proliferada de se puede recoger físicamente y sembrar en una placa independiente (o el pocillo de una placa con múltiples pocillos). De forma alternativa, las células se pueden subclonar en una placa con múltiples pocillos en una proporción estadística para facilitar la ubicación de una única célula en cada pocillo (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 célula/pocillo o incluso aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,5 células/pocillo, tal como 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células se pueden clonar cultivándolas en placas a densidad baja (por ejemplo, placas de Petri u otro sustrato adecuado) y aislándolas de otras células utilizando dispositivos tales como un anillo de clonación. La producción de una población clónica se puede expandir en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas se pueden cultivar hasta un punto adecuado cuando su fenotipo de desarrollo se pueda evaluar.

Los ensayos adicionales llevados a cabo por los inventores muestran que la expansión *ex vivo* de las células comprendidas en la población celular de la invención sin inducir diferenciación se puede conseguir para periodos de tiempo extensos utilizando lotes especialmente cribados de suero adecuado (tal como suero bovino fetal o suero humano). Son conocidos en la materia los métodos para medir la viabilidad y rendimiento (por ejemplo, la exclusión con azul de tripano).

Si se desea, cualesquiera de las etapas y procedimientos para aislar las células de la población celular de la invención puede realizarse manualmente. De forma alternativa, los procedimientos para aislar dichas células se pueden facilitar a través de un dispositivo adecuado, muchos de los cuales se conocen en la materia.

En otro aspecto, se da a conocer un método para identificar una población de células adultas multipotentes, en el que dicha población comprende, o consiste en, células adultas multipotentes dadas a conocer en el presente documento, comprendiendo el método:

(a) incubación de las células con compuestos de unión específicos marcados para uno o más marcadores característicos para dicha población; y

(b) detección de la presencia o ausencia de unión por las células a estos con compuestos de unión específicos.

Este método se puede llevar a cabo como se mencionó anteriormente en relación con la caracterización inmunofenotípica de las células de la invención. En una realización preferente, dicho compuesto de unión específico es un anticuerpo.

5 En otro aspecto, se da a conocer un método para aislar una población de células adultas multipotentes dadas a conocer en el presente documento, que comprende:

- (a) recolección de un tejido mesenquimal no osteocondral;
- (b) obtención de una suspensión celular a partir del tejido mediante digestión enzimática;
- (c) incubación de la suspensión celular con un compuesto marcado que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie característicos para dicha población; y
- 10 (d) selección de aquellas células que tienen el perfil de expresión de los marcadores.

La presencia o ausencia de dichos marcadores de superficie caracteriza dichas células, de esta manera, son característicos para dicha población celular. Se seleccionan finalmente las células que tienen el perfil de expresión de marcadores característicos de las células adultas multipotentes dadas a conocer en el presente documento.

15 En una realización preferente, dicho método de aislamiento consiste en realizar una selección negativa, por lo que se excluyen las células que muestran unión a compuestos marcados que se unen específicamente a un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133, y una subsiguiente selección positiva, por lo que se seleccionan las células que se unen a compuestos marcados que se unen específicamente a un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105. Preferentemente, el
20 compuesto marcado de unión específica es un anticuerpo.

Este método se puede llevar a cabo como se menciona anteriormente en relación con el método de obtención de células adultas multipotentes dadas a conocer en el presente documento.

25 Se pueden encontrar en una composición celular las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención, o una población celular de células adultas multipotentes de la invención. De esta manera, en otros aspectos de la invención, se da a conocer una composición celular sustancialmente homogénea que comprende una población celular de células adultas multipotentes de la invención.

30 Las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención se pueden utilizar para reparar y regenerar tejidos. De esta manera, en otro aspecto, se da a conocer una célula adulta multipotente comprendida en la población celular de la invención o una población de células adultas multipotentes de la invención, para uso terapéutico, por ejemplo, para su uso como un medicamento. En una realización, se da a conocer una célula adulta multipotente comprendida en la población celular de la invención o una población de células adultas multipotentes de la invención para su uso en la reparación y regeneración de tejidos.

35 En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células adultas multipotentes de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferente, dicha composición farmacéutica es útil para la reparación y regeneración de tejidos.

Dentro del alcance de las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención se incluyen combinaciones de dos o más tipos de células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención.

40 La composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células adultas multipotentes de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora federal o del gobierno estatal o citada en la farmacopea de EE. UU., o en la farmacopea europea, o las farmacopeas generalmente establecidas para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra el agente terapéutico. Si se desea, la composición puede contener
45 cantidades pequeñas de agentes de tamponación de pH. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Dichas composiciones contienen una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una población celular de células adultas multipotentes de la invención, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración apropiada al sujeto. La formulación debería satisfacer el modo de administración. En una realización
50 preferente, las composiciones farmacéuticas son estériles y están en forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un sujeto animal, más preferentemente un sujeto mamífero, y lo más preferentemente un sujeto humano.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, forma de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como preparaciones liofilizadas, soluciones de líquidos o

suspensiones, soluciones inyectables o infusibles, etc. La forma preferida depende del modo de administración que se pretende y la aplicación terapéutica

5 La administración de la población celular de la invención, o la composición farmacéutica que comprende la misma, a un sujeto que la necesita se puede llevar a cabo por medios convencionales. En una realización particular, dicha población celular se administra al sujeto por un procedimiento que implica transferir directamente las células al tejido deseado, bien *in vitro* como *in vivo*, al tejido del animal. Las células se pueden transferir al tejido deseado mediante un método apropiado, que generalmente varía según el tipo de tejido. Por ejemplo, se pueden sembrar las células en la zona deseada dentro del tejido para establecer una población, etc. Se pueden transferir *in vivo* las células a zonas utilizando dispositivos, tales como catéteres, trócares, cánulas, sondas (que se pueden sembrar con las células). La composición farmacéutica de la invención se puede usar en una terapia combinada. En una realización específica, la terapia combinada se administra a un sujeto que la necesita, tal como un paciente que necesita reparación o regeneración de un tejido. En una realización, la terapia combinada se utiliza junto con otros tipos de tratamientos para reparar o regenerar tejidos. Según la realización anterior, las terapias combinadas de la invención se pueden usar antes de, de forma simultánea o subsiguiente a la administración de la población celular de la invención.

15 También, en otro aspecto, se da a conocer el uso de la célula adulta multipotente, o una población de células adultas multipotentes de la invención, para la preparación de una composición farmacéutica para la reparación y regeneración de tejidos.

20 Se da a conocer además, en otro aspecto, un método terapéutico que comprende administrar dicha composición farmacéutica a un paciente que la necesita. En una realización, dicho método terapéutico es para reparar y regenerar de tejidos.

Se da a conocer además un método para evaluar la respuesta celular *in vitro* o *in vivo* frente a un agente biológico o farmacológico, o frente a una colección combinatoria de dichos agentes, que comprende:

- (a) aislamiento de una población celular de células adultas multipotentes de la invención, en la que las células son prácticamente homogéneas,
- 25 (b) expansión de población celular por medio de cultivo;
- (c) aplicación de un agente biológico o agente farmacológico o una colección combinatoria de dichos agentes a dicha población celular y evaluar los efectos de dichos agentes en las células cultivadas.

30 En una realización, la población de células adultas multipotentes de la invención de la etapa (a) se aísla a partir de un individuo o a partir de una población estadísticamente significativa del mismo. En otra realización, antes de la etapa (c), se deja que las células se diferencien a tipos de células específicos.

35 Además, en otro aspecto, se da a conocer una célula que expresa al menos una característica de una célula especializada, en la que la célula deriva de una célula adulta multipotente de la invención. Estas células también son células adultas multipotentes que tienen una etapa de diferenciación más avanzada que la de las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención. En una realización, la invención se refiere a una célula que expresa al menos una característica de una célula especializada, en la que al menos una característica es que la célula seleccionada de grupo que consiste en célula epitelial, célula endotelial, adipocito, miocito, condrocito, osteocito, una neurona, un astrocito, oligodendrocito, hepatocito, cardiomiocito, y una célula pancreática. Además, se da a conocer una población aislada que comprende dichas células que expresa al menos una característica de una célula especializada, en la que las células derivan de las células adultas multipotentes comprendidas en la población celular de la invención.

40 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la invención, pero no la limitan en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de células madre procedentes de tejidos blandos y caracterización de marcadores de superficie

45 El aislamiento de células adulta multipotentes a partir de tejido blando, se realizó mediante selección de aquellas células con capacidad de proliferación y diferenciación, caracterizadas por presentar adhesión al recipiente de plástico de cultivo celular. A continuación, se procedió a su caracterización mediante la monitorización por citometría de flujo de la expresión de una serie de marcadores de superficie en las células recién aisladas y a lo largo del desarrollo del cultivo *in vitro*.

50 El aislamiento de las células adultas multipotentes se realizó a partir de tejido adiposo subdérmico, obtenido mediante liposucción de tres donantes sanos (donantes 1, 2 y 3). En primer lugar, se procedió al lavado de la muestra de tejido adiposo subdérmico con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para conseguir la destrucción de la matriz extracelular y el aislamiento de las células, se realizó una digestión enzimática con colagenasa tipo II en solución salina (5 mg/ml) a 37° durante 30 minutos. Se inactivó la colagenasa por adición de un volumen equivalente de medio

DMEM, con suero bovino fetal al 10%. Dicha suspensión celular se centrifugó a 250 g durante 10 minutos obteniéndose un depósito de células.

5 Se añadió NH₄Cl a una concentración final de 0,16M y la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para inducir la lisis de los eritrocitos presentes. La suspensión fue centrifugada a 250-400 g y se resuspendió en DMEM-10% FBS con ampicilina-estreptomomicina al 1%. Finalmente, se cultivaron en placas las células, inoculándose 20-30.000 células por cm².

Las células se mantuvieron en cultivo durante 20-24 horas a 37°C, en atmósfera con CO₂ al 5%. Transcurridas 24 h, el cultivo fue lavado con PBS para eliminar las células y los restos de tejido en suspensión. Las células seleccionadas mediante adhesión se mantuvieron en cultivo en medio DMEM + suero bovino fetal al 10% (FBS).

10 Tras el aislamiento, se procedió a la caracterización de las células adultas multipotentes aisladas de cada uno de los donantes, en función de la presencia/ausencia de una serie de marcadores de superficie. Para ello, se monitorizó mediante citometría de flujo la expresión de los siguientes marcadores de superficie:

-Integrinas: CD11b, CD18, CD29, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD61, CD104.

15 -Marcadores hematopoyéticos: CD3, CD9, CD10, CD13, CD14, CD16, CD19, CD28, CD34, CD38, CD45, CD90, CD133, y glicoforina.

-Receptores de factores de crecimiento: CD105, NGFR.

-Receptores de matriz extracelular: CD15, CD31, CD44, CD50, CD54, CD62E, CD62L, CD62P, CD102, CD106, CD166.

-Otros: CD36, CD55, CD56, CD58, CD59, CD95, HLA-I, HLA-II, β2-microglobulina.

20 La caracterización inmunofenotípica de las células se realizó sobre las células recién aisladas y también a día 7, a las 4 semanas y a los 3 meses en cultivo, de las muestras procedentes de los tres donantes sanos. Teniendo en cuenta que la selección se realiza por adhesión al recipiente de plástico de cultivo celular, se considera como "células recién aisladas", la fracción celular adherida tras menos de 24 h en cultivo desde el aislamiento.

25 Las células a caracterizar, fueron recogidas mediante digestión suave con tripsina, lavadas con PBS e incubadas durante 30 minutos a 4°C con anticuerpos marcados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), dirigidos frente a cada uno de los marcadores de superficie a analizar. Las células marcadas se lavaron y fueron inmediatamente analizadas usando un citómetro Epics-XL (Coulter). Como controles, se utilizaron células teñidas con anticuerpos inespecíficos de los correspondientes isotipos marcados con FITC o PE.

30 Las Figuras 1a-1d, 2a-2d y 3a-3d, muestran los histogramas agrupados por donante para una mejor observación de la evolución de los marcadores estudiados a lo largo del tiempo en cultivo, indicándose en cada caso, a qué momento del periodo en cultivo pertenecen las células analizadas.

35 El análisis de los marcadores de superficie a diferentes tiempos, permitió determinar la presencia/ausencia de los mismos, así como su comportamiento a lo largo del cultivo. Los resultados obtenidos, muestran que las poblaciones celulares aisladas procedentes de los distintos donantes sanos presentan un comportamiento homogéneo en su caracterización fenotípica.

A partir del análisis del perfil de expresión de marcadores de superficie (Figuras 1a-1d, 2a-2d y 3a-3d), se utilizaron 3 criterios para determinar cuáles son aquellos marcadores que definen la población celular y permiten identificarla y diferenciarla frente a otros tipos celulares. Dichos criterios son:

1. Descartar aquellos marcadores que varían entre muestras o con el tiempo de cultivo.
- 40 2. Verificar que los que son positivos, lo son también a tiempo cero (células recién aisladas).
3. Seleccionar en función de su relevancia biológica, descartando aquellos marcadores característicos de tipos celulares concretos (por ejemplo, CD3 que es un marcador exclusivo de linfocito).

45 Aplicando dichos criterios, las células adultas multipotente aisladas, procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral proporcionadas en el presente documento se caracterizan por ser positivas a CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105; y por carecer de la expresión de CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133.

Ejemplo 2

Diferenciación *in vitro* de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral humano a células de fenotipo óseo

En el ensayo de diferenciación, se utilizaron células adultas multipotentes humanas aisladas caracterizadas dadas a conocer en el presente documento. Las células se aislaron a partir de tres muestras de lipoaspirado analizadas, correspondientes cada una a un donante sano (Ejemplo 1). Las células adultas multipotentes se aislaron y caracterizaron tal como se menciona en el Ejemplo 1. Se utilizó una muestra de células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea humana como control positivo.

Las células aisladas se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² en placas de 6 pocillos (una placa por muestra), y se incubaron en medio de cultivo estándar (DMEM, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y antibiótico). Tras dos días de cultivo, se reemplaza el medio de cultivo de uno de los pocillos (control) por medio fresco, y el de los restantes pocillos por medio inductor de osteogénesis, que contiene el medio de cultivo estándar al que se ha añadido:

-Dexametasona 100 nM

-Ácido ascórbico 50 µM

-β-Glicerofosfato 10 mM

Las células se mantienen en cultivo durante 3 semanas en las condiciones habituales, cambiando el medio cada 2-3 días. A las tres semanas, se puede observar la presencia de depósitos mineralizados de fosfato cálcico, lo que indica la presencia de nódulos óseos. Tales nódulos se detectan mediante una tinción con Rojo Alizarin (Standford et al., 1995). Específicamente se eliminó el medio, las células se lavan dos veces con PBS y se fijan con etanol al 70% frío durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavan con PBS los pocillos fijados y se tiñen con Rojo Alizarin (40 mM, pH 4,1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células teñidas se lavan abundantemente con agua, y se visualizan al microscopio los precipitados de fosfato cálcico, que aparecen fuertemente teñidos de rojo.

Las figuras 4a-4d muestran microfotografías de las células osteoinducidas teñidas con Rojo Alizarin. Aunque la formación de fosfato cálcico es más rápida en la muestra correspondiente a MSC de médula ósea que actúa como control positivo (figura 4a), en las tres muestras procedentes de tejido adiposo se aprecia la formación de grandes cantidades de matriz ósea, si bien con diferente intensidad en cada una de las muestras. Todos aquellos pocillos en los que fue inducida la osteogénesis exhibieron el mismo comportamiento y en los pocillos control (no sometidos a estímulos osteoinductores) no se detectó formación de matriz ósea. No se observó relación alguna entre la cantidad de matriz ósea formada y el tiempo que cada muestra llevaba en cultivo tras su aislamiento del tejido (entre 3 y 9 semanas).

Ejemplo 3

Diferenciación *in vitro* de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral humano a células de fenotipo muscular

En el ensayo de diferenciación, se utilizaron células adultas multipotentes humanas caracterizadas dadas a conocer en el presente documento. Las células se aislaron a partir de las tres muestras de lipoaspirado analizadas, correspondientes cada una a un donante sano (Ejemplo 1). Las células adultas multipotentes se aislaron y caracterizaron como se menciona en el Ejemplo 1. Una muestra de MSC de médula ósea humana fue utilizada como control positivo.

Las células aisladas se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² en medio de cultivo estándar (DMEM, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y antibiótico). Tras dos días de cultivo, se reemplaza el medio de cultivo de uno de los pocillos (control) por medio fresco, y el de los restantes pocillos por medio inductor de miogénesis (Wakitani et al., 1995), que contiene el medio de cultivo estándar al que se ha añadido:

-Ascorbato-2-fosfato 0,1 mM

-Dexametasona 0,01 µM

-ITS+1 (Sigma-Aldrich)

-5-Azacitidina 3 µM

Tras 24 horas, se reemplaza el medio por medio de cultivo estándar. y se mantienen las células en cultivo durante 2-3 semanas, cambiando el medio cada 2-3 días. Tras ese tiempo, las células adquieren un fenotipo alargado, forman estructuras fibrilares y pueden observarse algunas fusiones celulares. Para detectar el fenotipo de mioblasto, las células obtenidas se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4% y se incuban con un anticuerpo frente a la cadena pesada de la miosina, que es un antígeno específico de músculo. Los resultados confirman la diferenciación de las células adultas multipotentes dadas a conocer en el presente documento a células de fenotipo muscular.

Ejemplo 4

Diferenciación *in vitro* de células adultas multipotentes procedentes de tejido mesenquimal no osteocondral humano a células de fenotipo neuronal

- En el ensayo de diferenciación, se utilizaron células adultas multipotentes humanas caracterizadas dadas a conocer en el presente documento. Las células se aislaron a partir de las tres muestras de lipoaspirado analizadas, correspondientes cada una a un donante sano (Ejemplo1). Las células adultas multipotentes se aislaron y caracterizaron como se menciona en el Ejemplo 1. Una muestra de MSC de médula ósea humana fue utilizada como control positivo.
- Las células aisladas se sembraron a baja densidad, 3×10^3 células/cm² en medio de cultivo estándar (DMEM, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y antibiótico), complementado con 10 ng/ml de bFGF e incubado durante 24-36 horas de modo que se produce un gran número de células. A continuación se lavaron los pocillos y se añadió medio neuroinductor (Black y Woodbury, 2001), que comprende:
- 5 -αMEM
 - BHA 200 μM
 - Penicilina/estreptomicina
 - L-glutamina 2 mM
 - Forskolina 10 μM
 - 15 -DMSO al 2%
 - Hidrocortisona 1 μM
 - Insulina 5 μg/ml
 - CIK 25 mM
 - Ácido Valproico 2 mM
 - 20 A las pocas horas de la inducción se puede observar un cambio morfológico, las células adquieren un cuerpo celular redondeado y muy refringente, y unas prolongaciones que se asemejan a los axones y las dendritas de las células nerviosas. Tras 3 días, las células obtenidas se fijan con PFA al 4% y se incuban con anticuerpos frente a los antígenos específicos de neuronas NF-200 y TuJ1. Los resultados confirman la diferenciación de las células adultas multipotentes dadas a conocer en el presente documento a células de fenotipo muscular.
 - 25 **Bibliografía**
- Osawa M., Hanada K., Hanada H. y Nakauchi H. (1996) *Science* 273, 242-245.
- Morrison S.J., Uchida N. y Weissman I.L. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35-71.
- Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J. A., Moore K.A., Lemischka I.R. (2002) *Science* 298, 601-604.
- Phillips RL. (2000) *Curr Top Microbiol Immunol.* 251, 13-19.
- 30 Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) *Science* 298, 597-600.
 - Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, *Exp Hematol.* 1976 Sep; 4(5):267-74.
 - Caplan AI *J Orthop Res.* 1991 Sep; 9(5):641-50
 - Pittenger, M.F. et al. (1999) *Science* 284: 143-147
 - Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME, *J Cell Sci.* 1992 Jun; 102 (Pt 2):341-51
 - 35 Yoo JU, Johnstone B, *Clin Orthop.* 1998 Oct; (355 Suppl):S73-81
 - Wakitani S. et al. (1995) *Muscle Nerve* 18: 1417-1426.
 - Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI, *Bone.* 1992; 13(1):81-8.
 - Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR, *Exp Neurol.* 2000 Aug; 164(2):247-56.
 - 40 Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr, *Am Surg.* 1995 Mar; 61(3):231-6.
 - Zuk, P.A. et al. (2001) *Tissue Eng* 7: 211-228.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM, Exp Hematol. 2002 Aug; 30(8):896-904. Caplan AT, Bruder SP, Trends Mol Med. 2001 Jun; 7(6):259-64. 5 Stanford, C.M. et al. (1995) J Biol Chem 270: 9420-9428.

Young HE, Ceballos EM, Smith JC, Mancini ML, Wright RP, Ragan BL, Bushell I, Lucas PA. *In vitro* Cell Dev Biol Anim. 1993 Sep; 29 A(9):723-36.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una población celular aislada sustancialmente homogénea pasada de forma consecutiva que comprende células adultas multipotentes, que (a) se han aislado a partir de tejido adiposo, (b) expresa CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105; y (c) carece de la expresión de CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133.
- 10 2. Una población de células adultas multipotentes según la reivindicación 1, que se aísla mediante un método que comprende:
 - (a) recolección del tejido adiposo;
 - (b) obtención de una suspensión celular mediante digestión enzimática;
 - (c) sedimentación de las células y resuspensión en un medio de cultivo; y
 - (d) cultivo de las células en una superficie sólida y eliminación de las células que no muestran adhesión a dicha superficie sólida
 - (e) expansión mediante el paso de forma consecutiva de las células.
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende una población celular, según las reivindicaciones 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Una población celular aislada según las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en terapia.

Figura 1

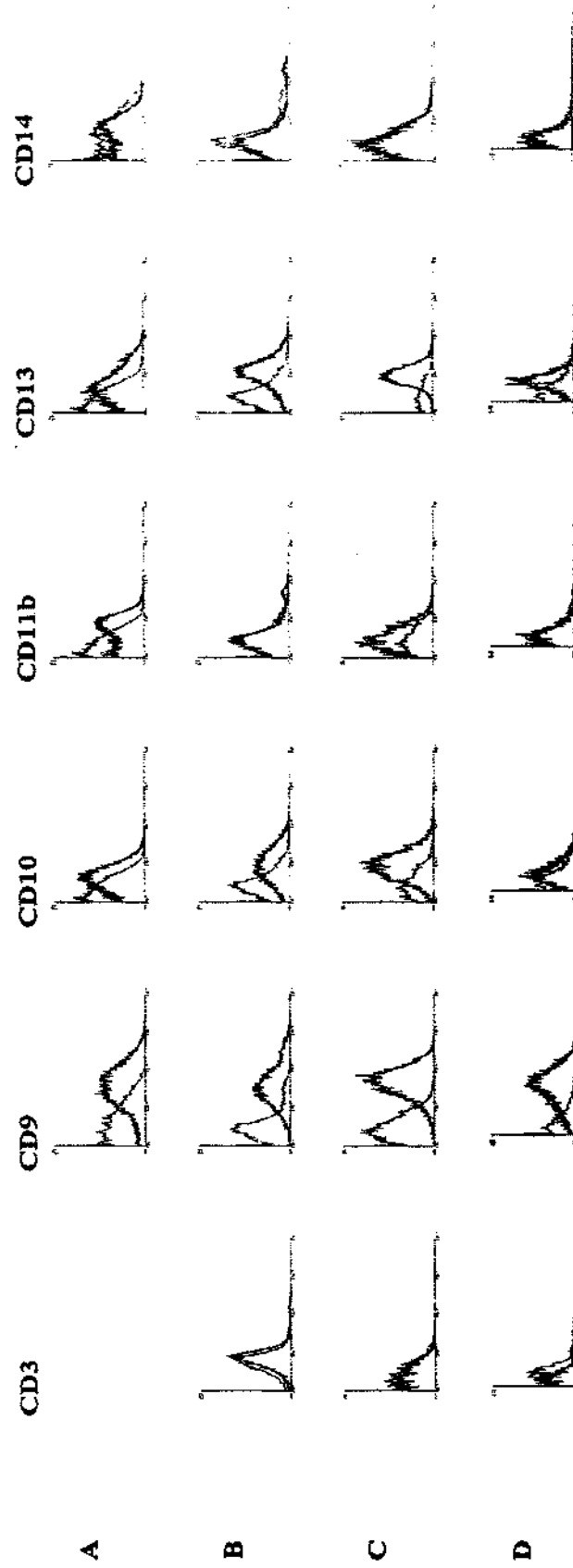


Figura 1(cont.)

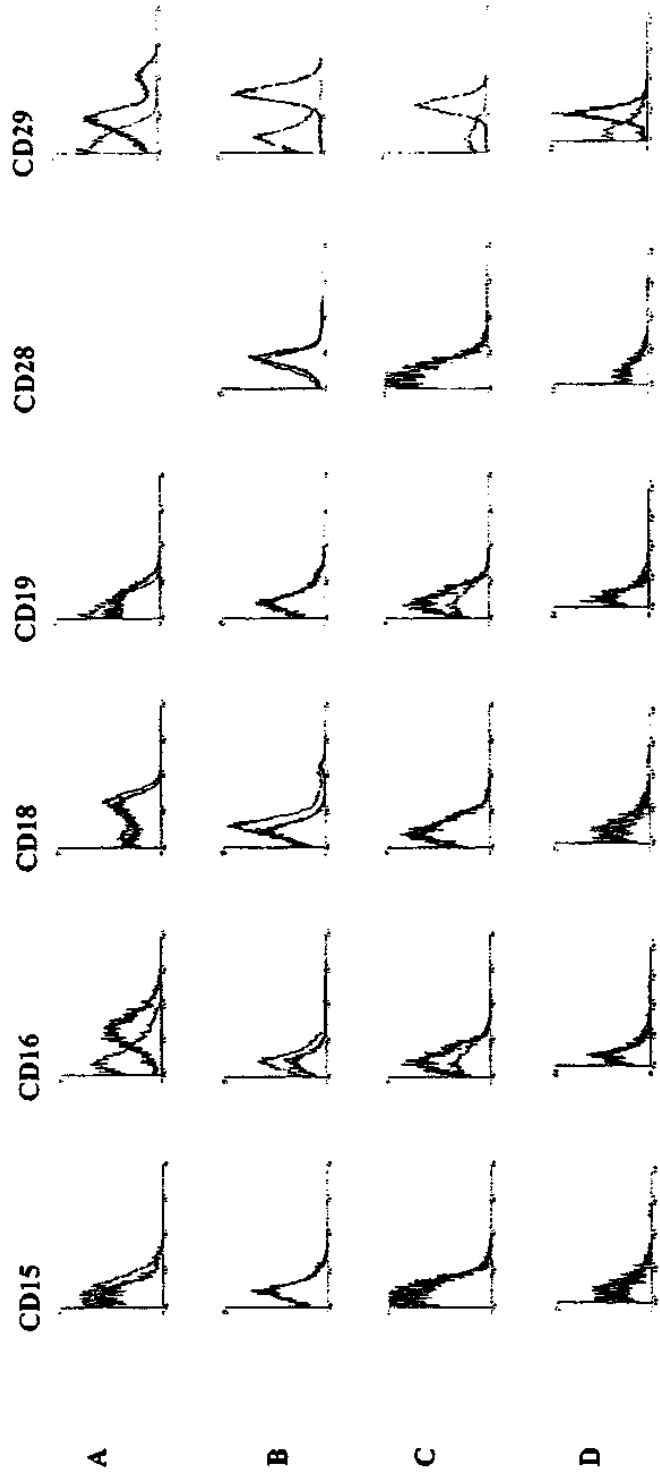


Figura 1(cont.)

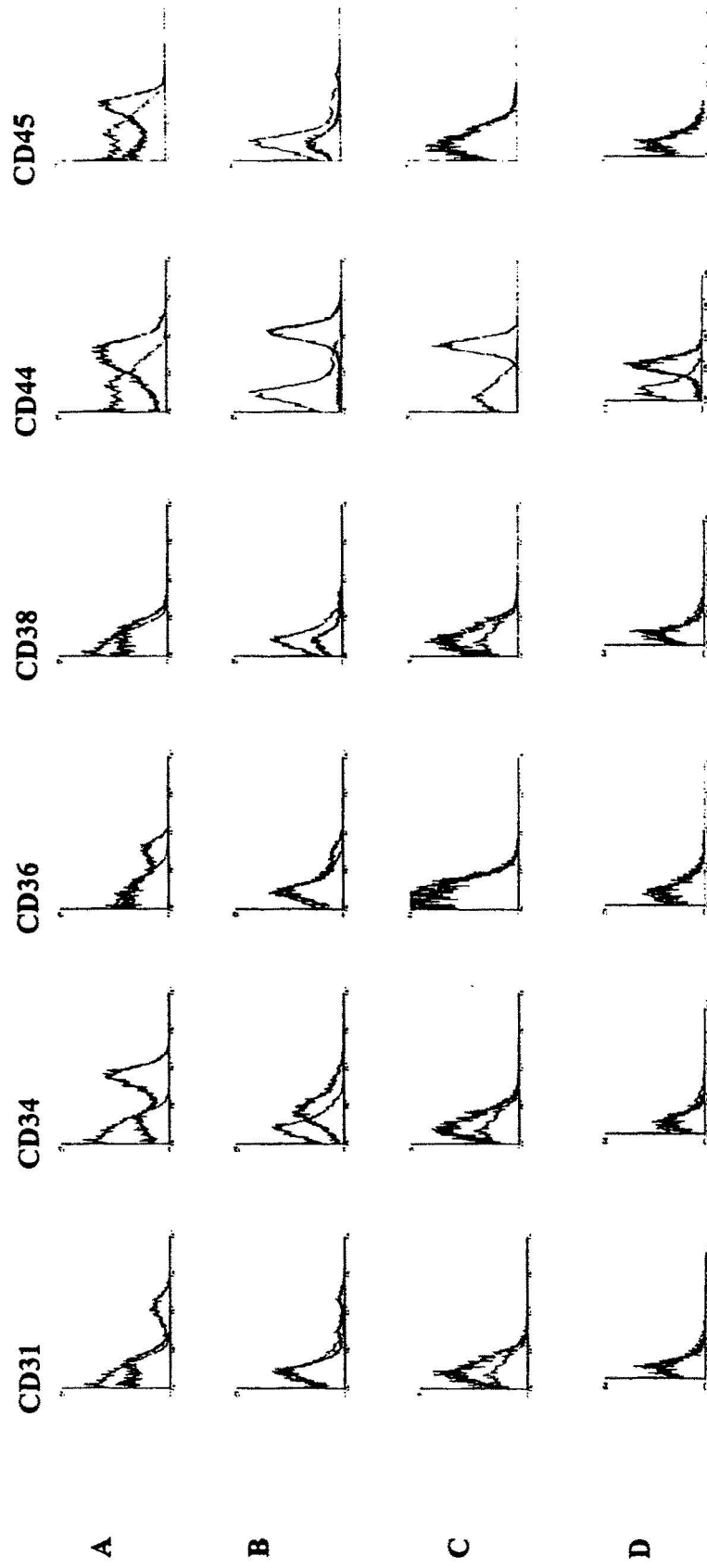


Figura 1(cont.)

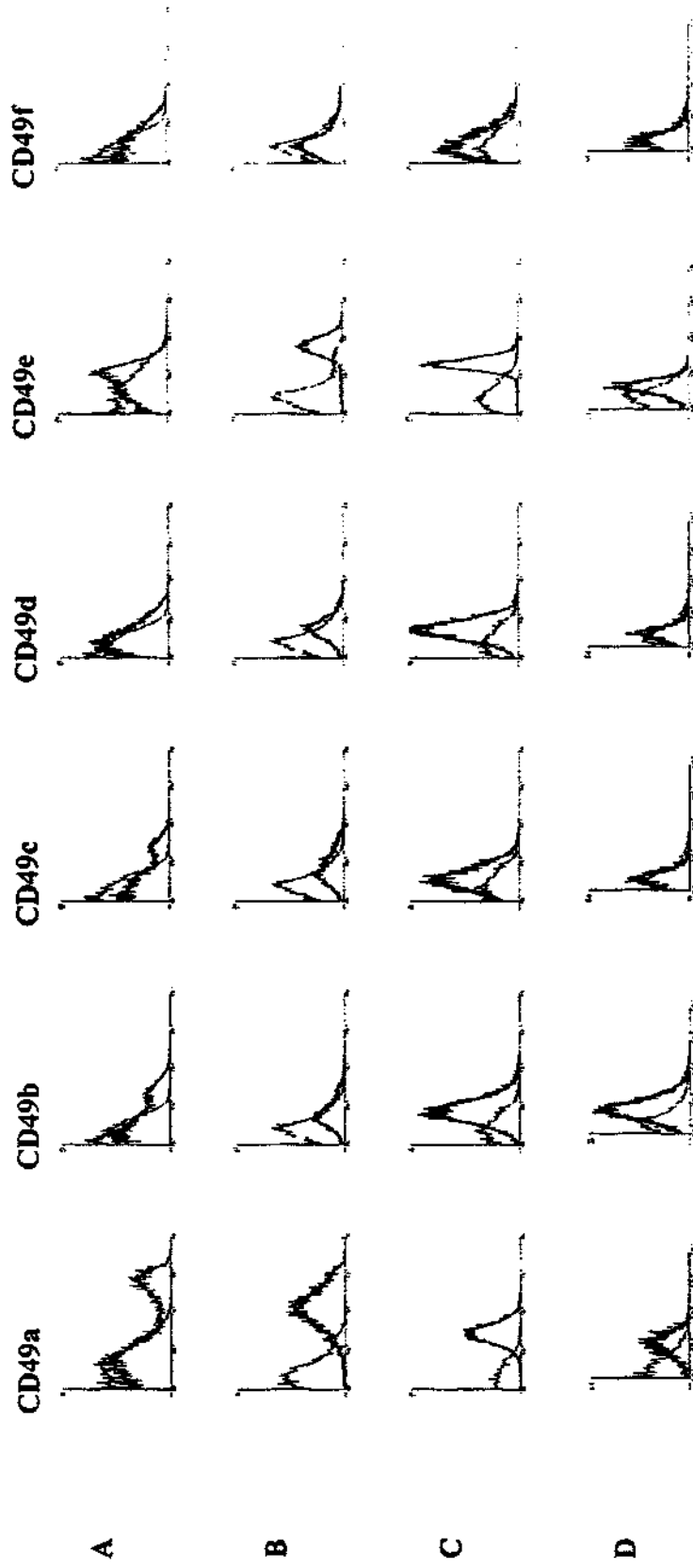


Figura 1(cont.)

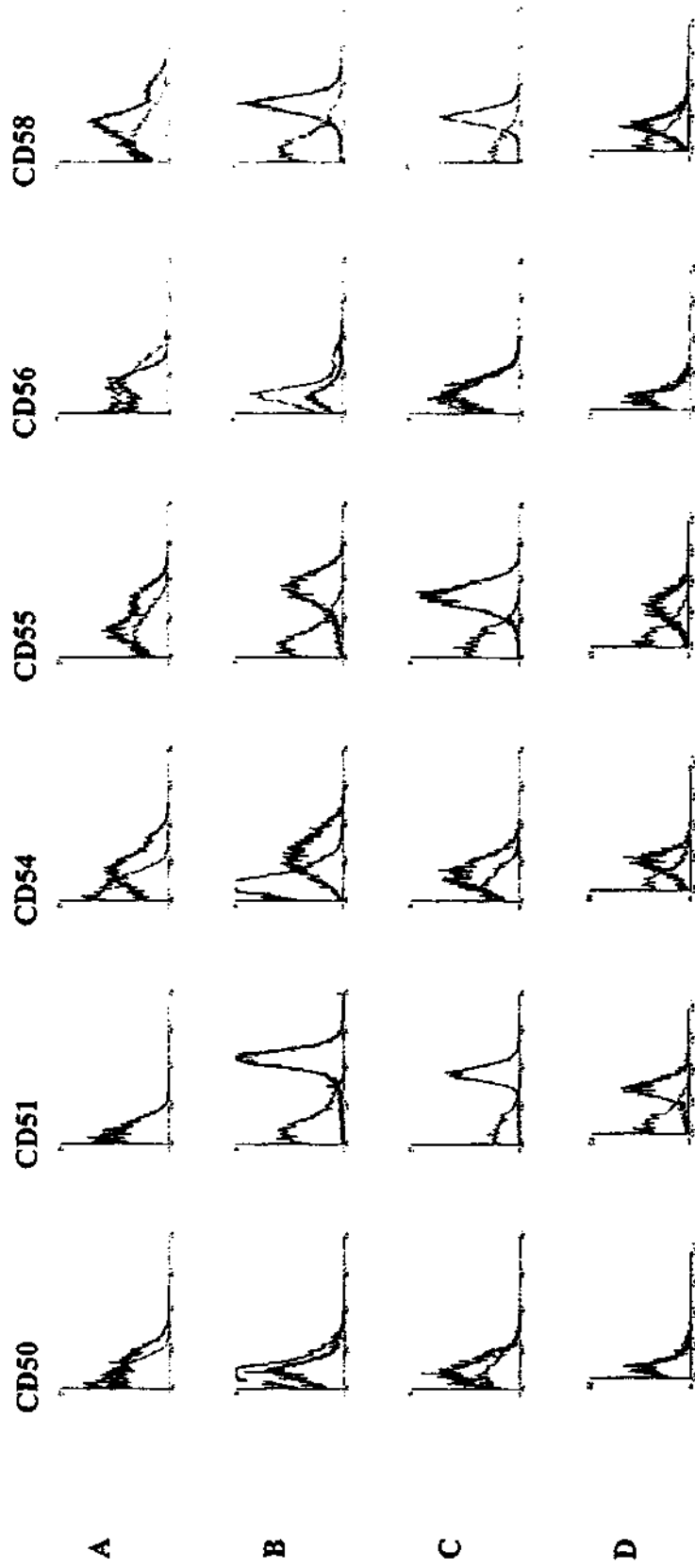


Figura 1(cont.)

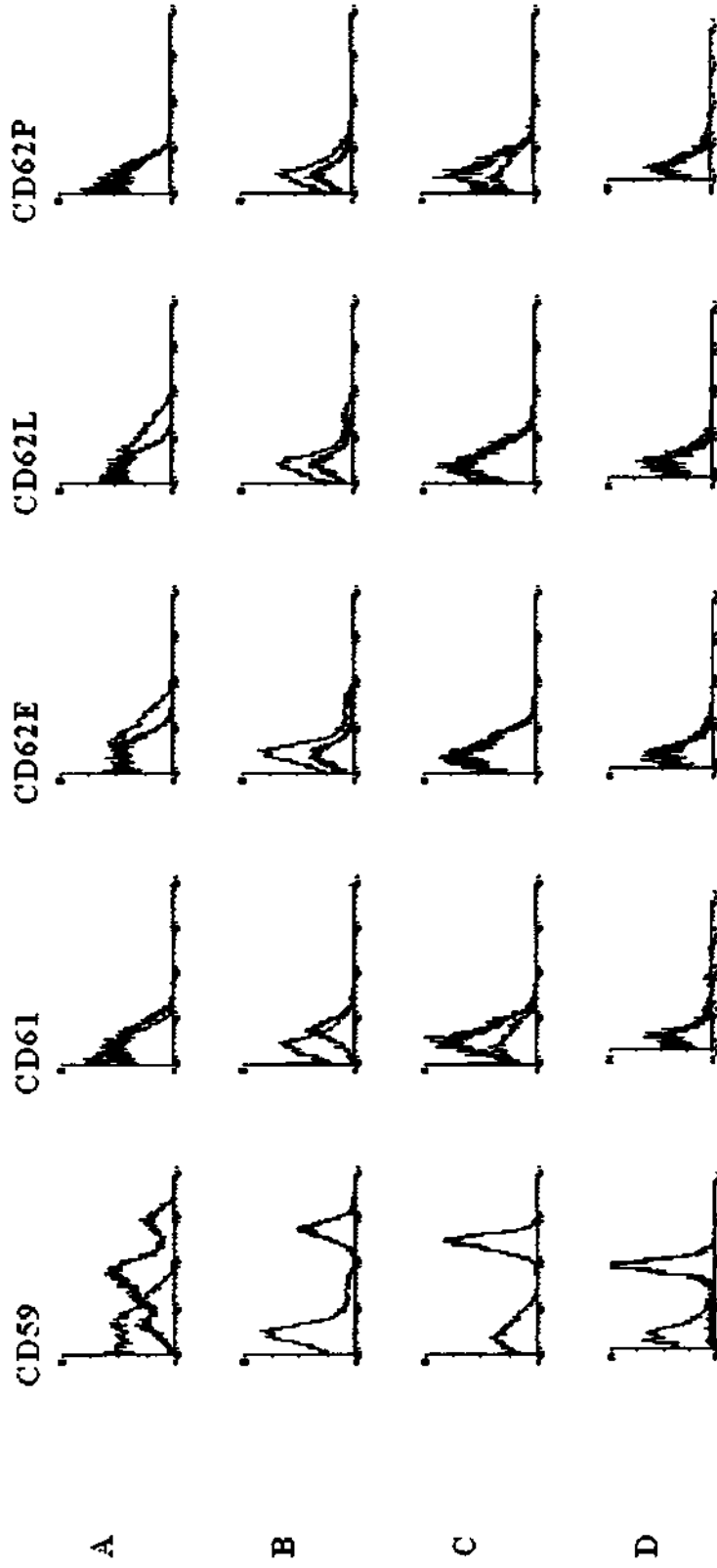


Figura 1(cont.)

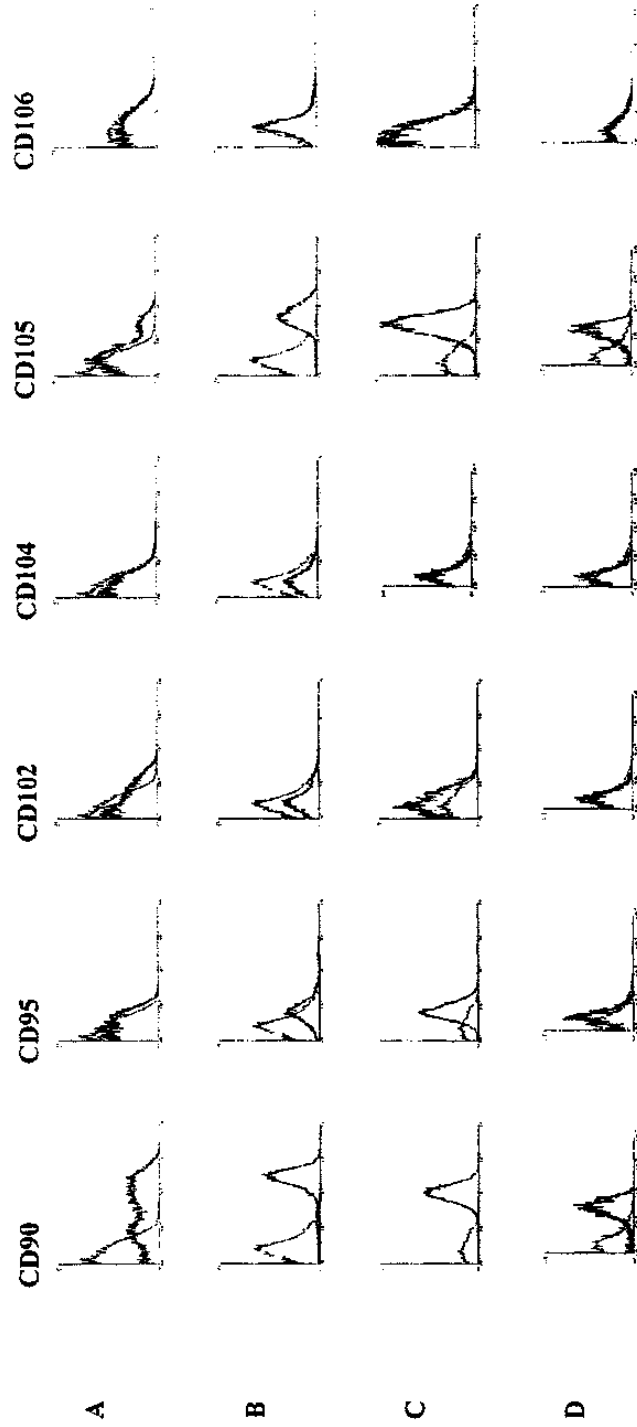


Figura 1(cont.)

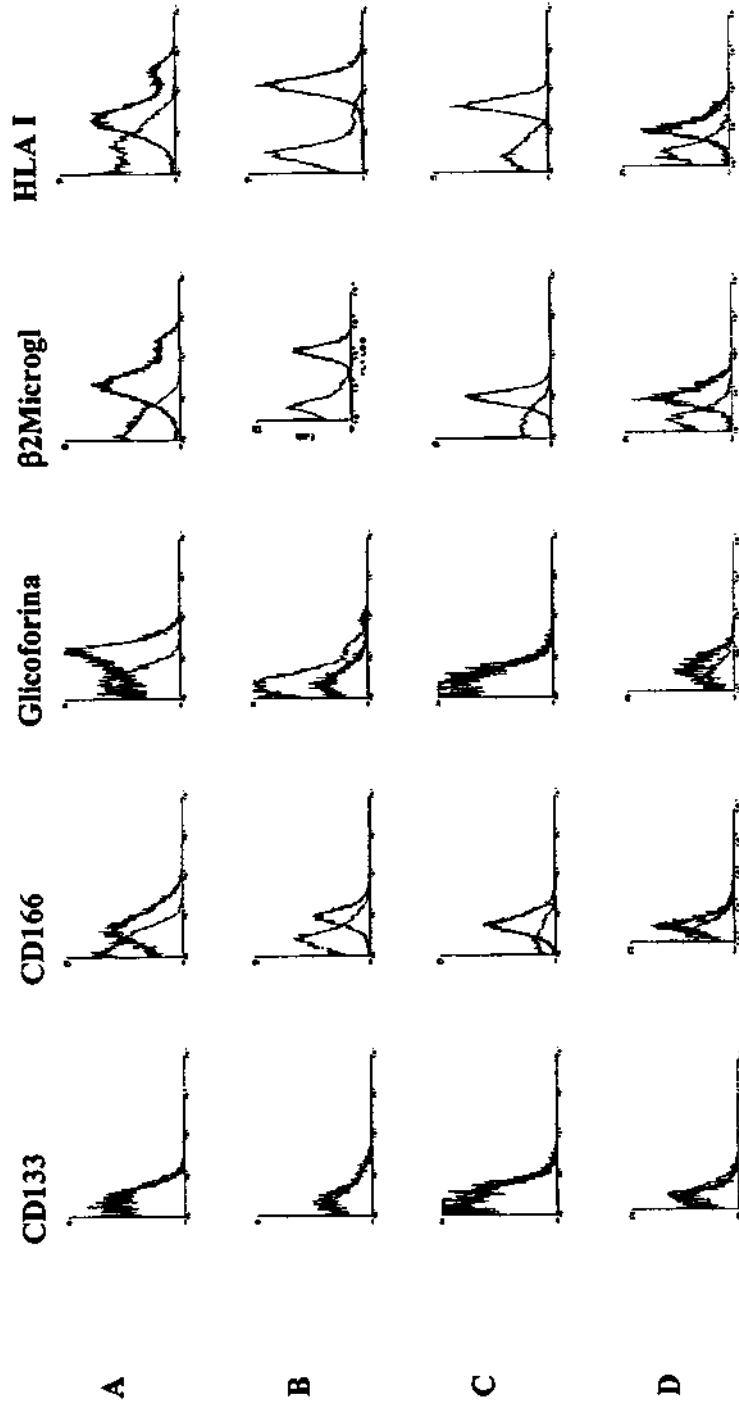


Figura 1(cont.)

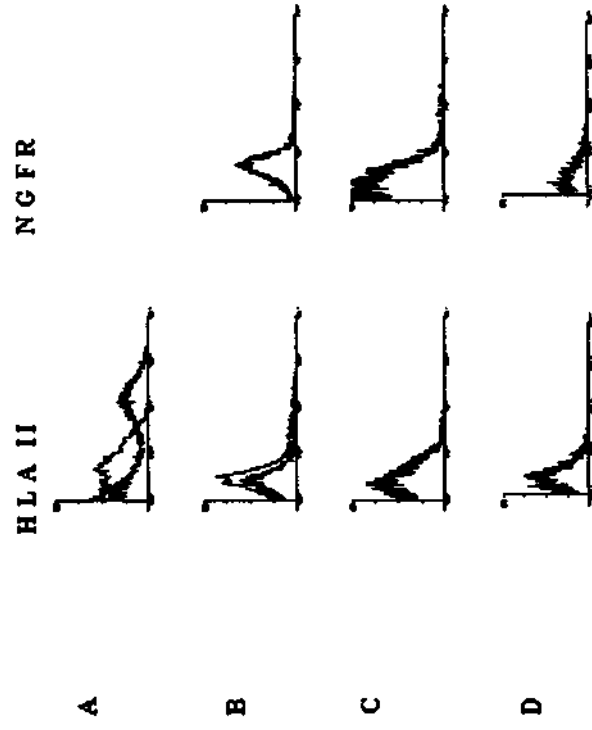


Figura 2

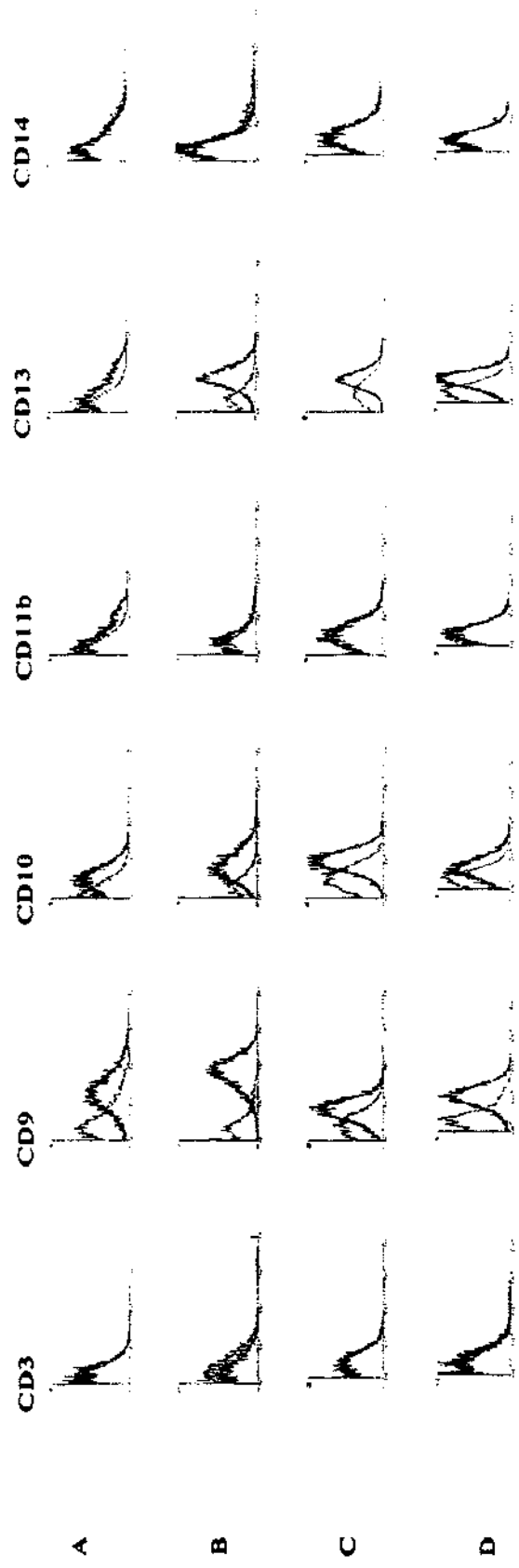


Figura 2(cont.)

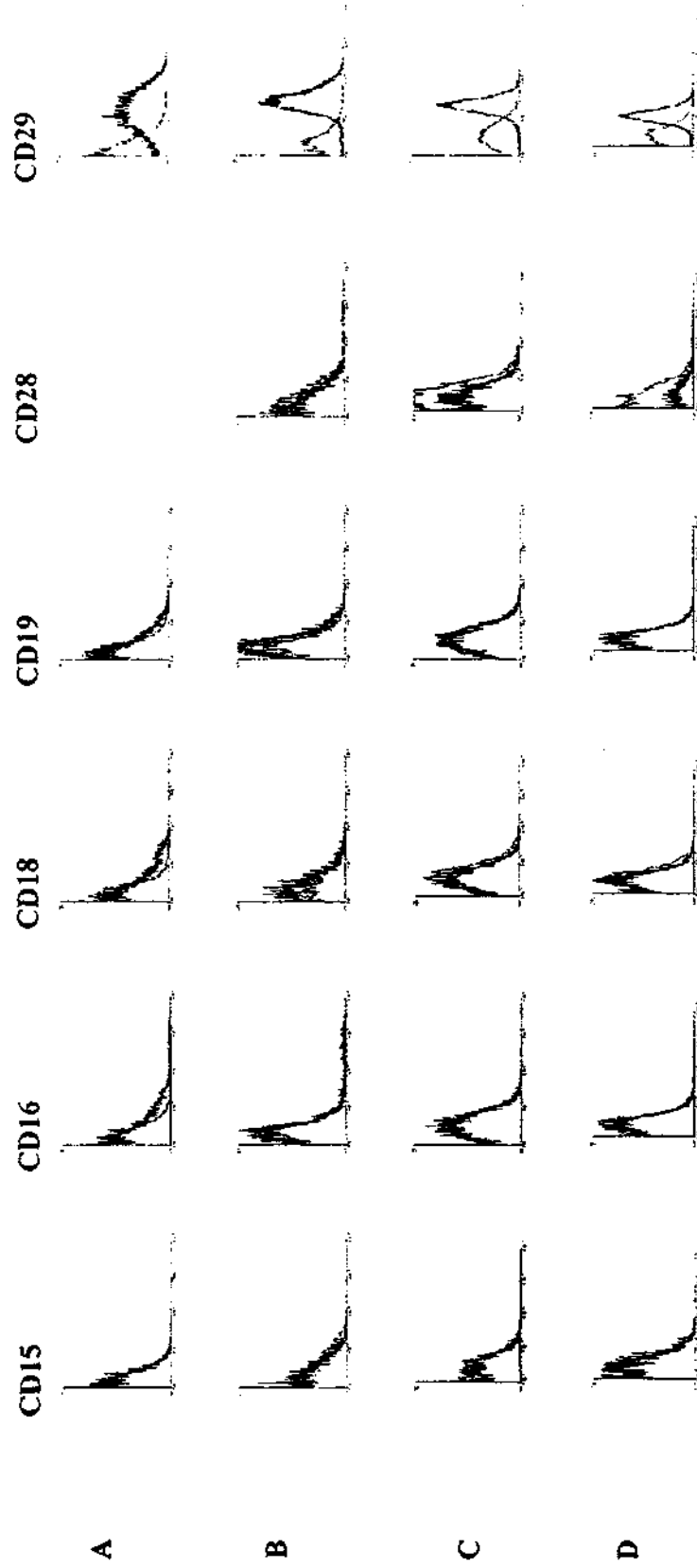


Figura 2(cont.)

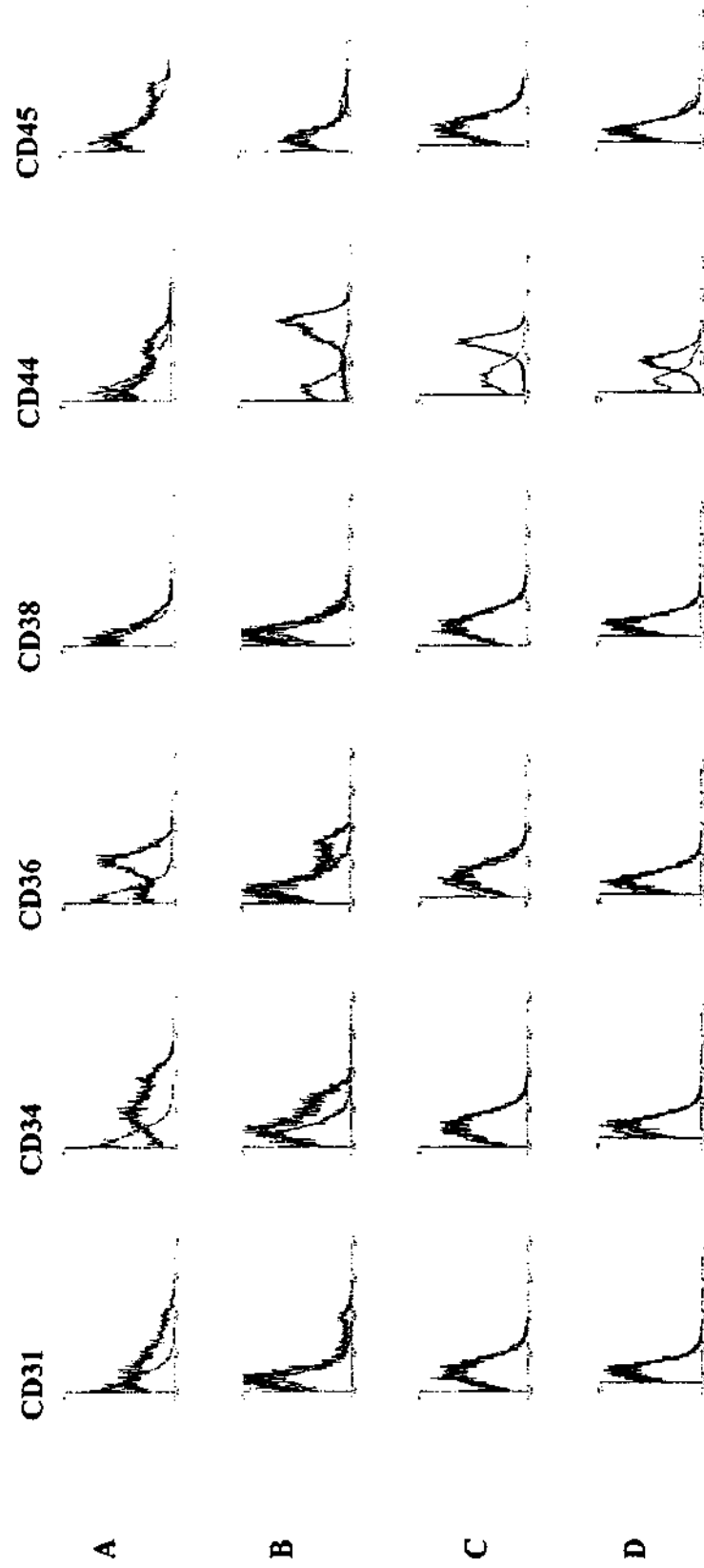


Figura 2(cont.)

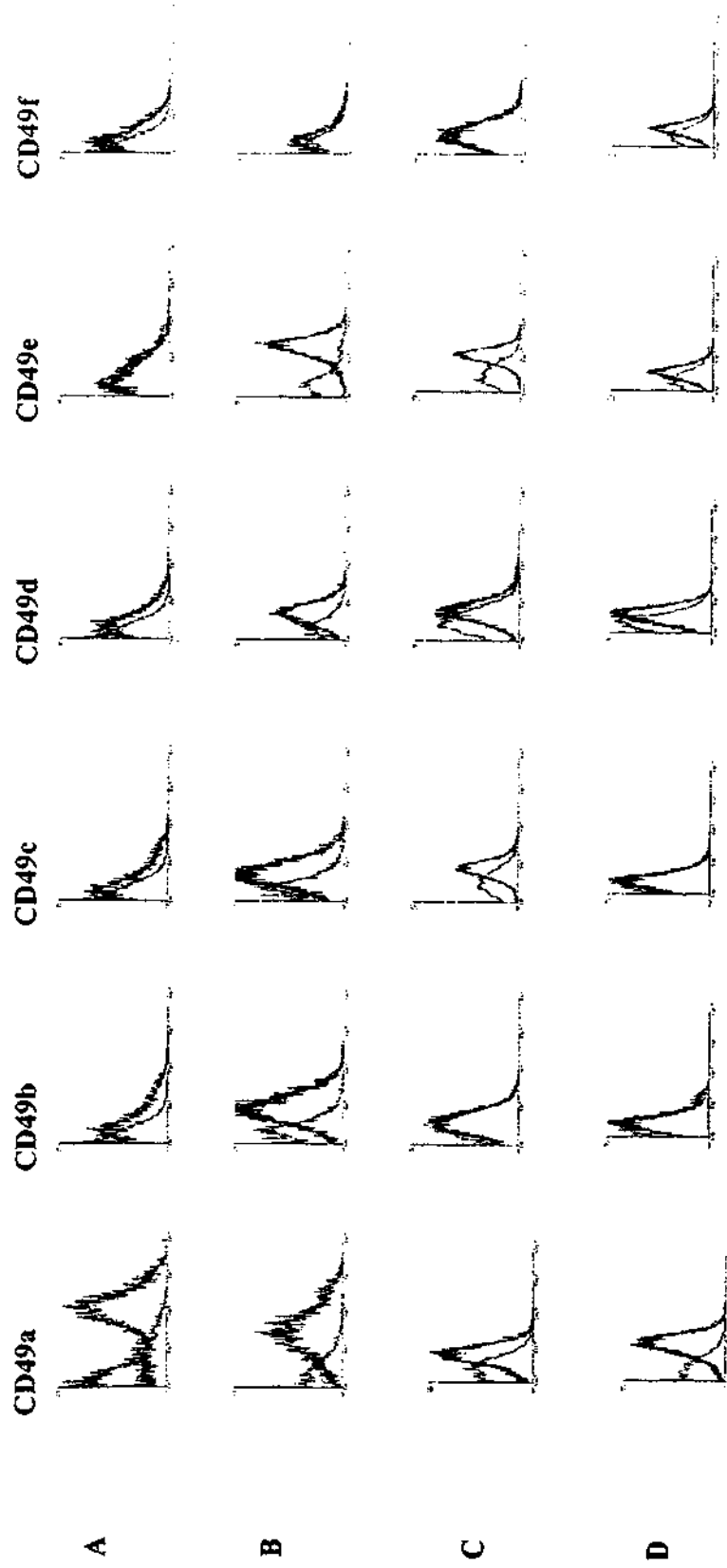


Figura 2(cont.)

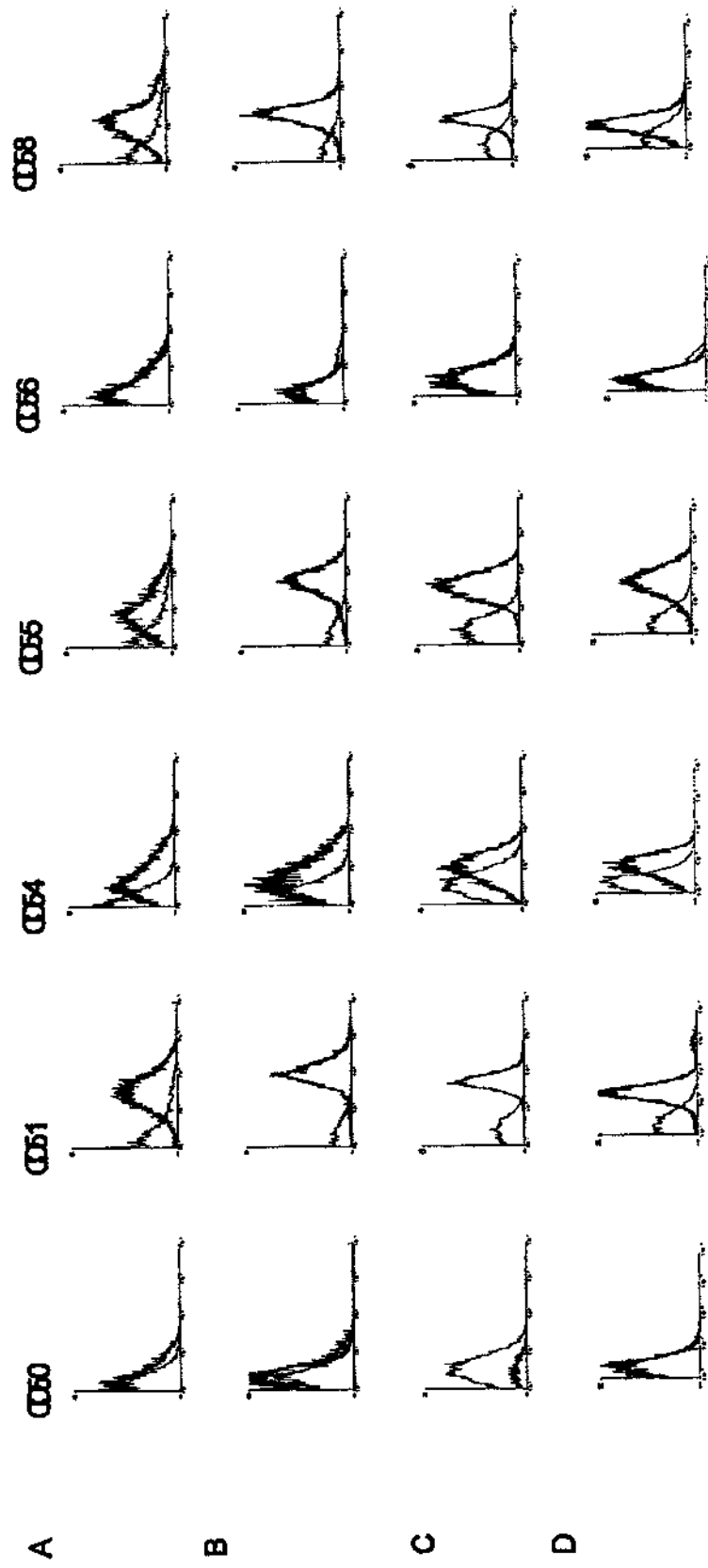


Figura 2(cont.)

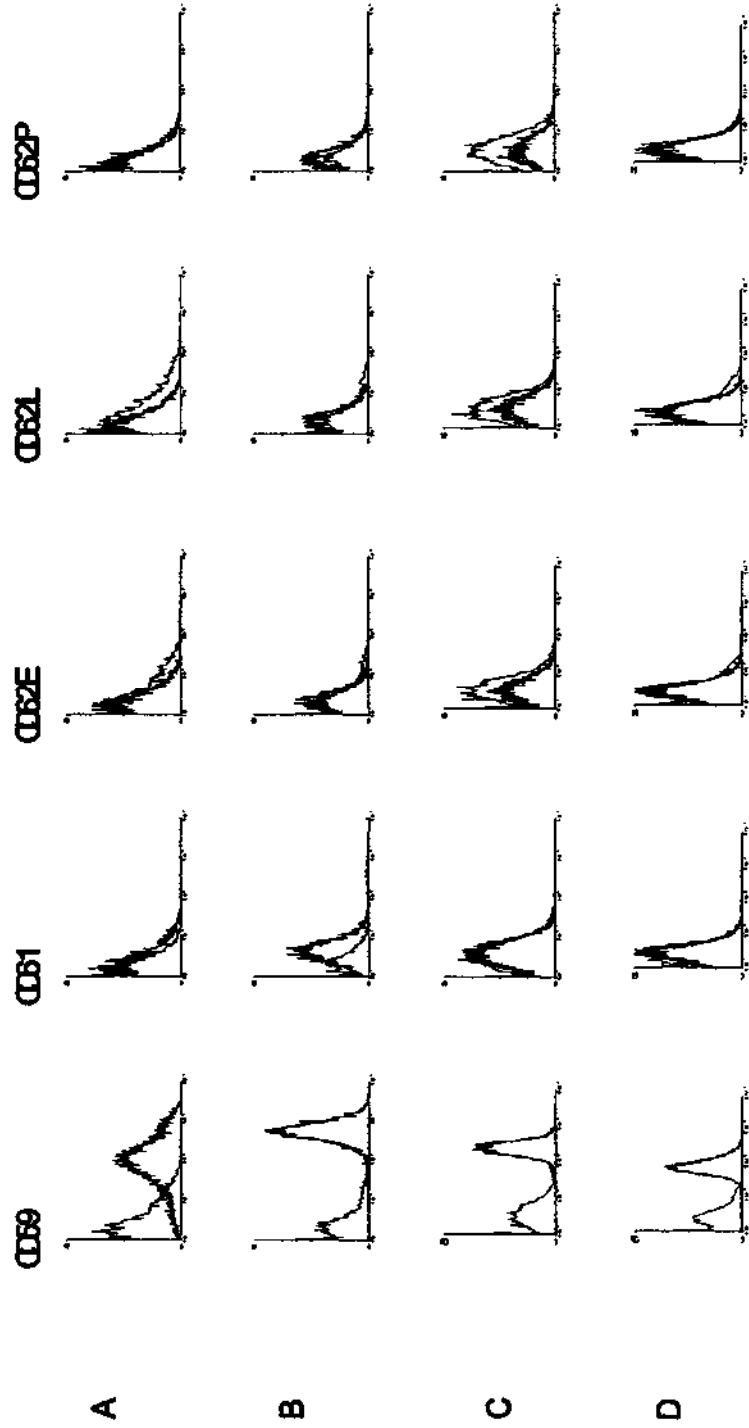


Figura 2(cont.)

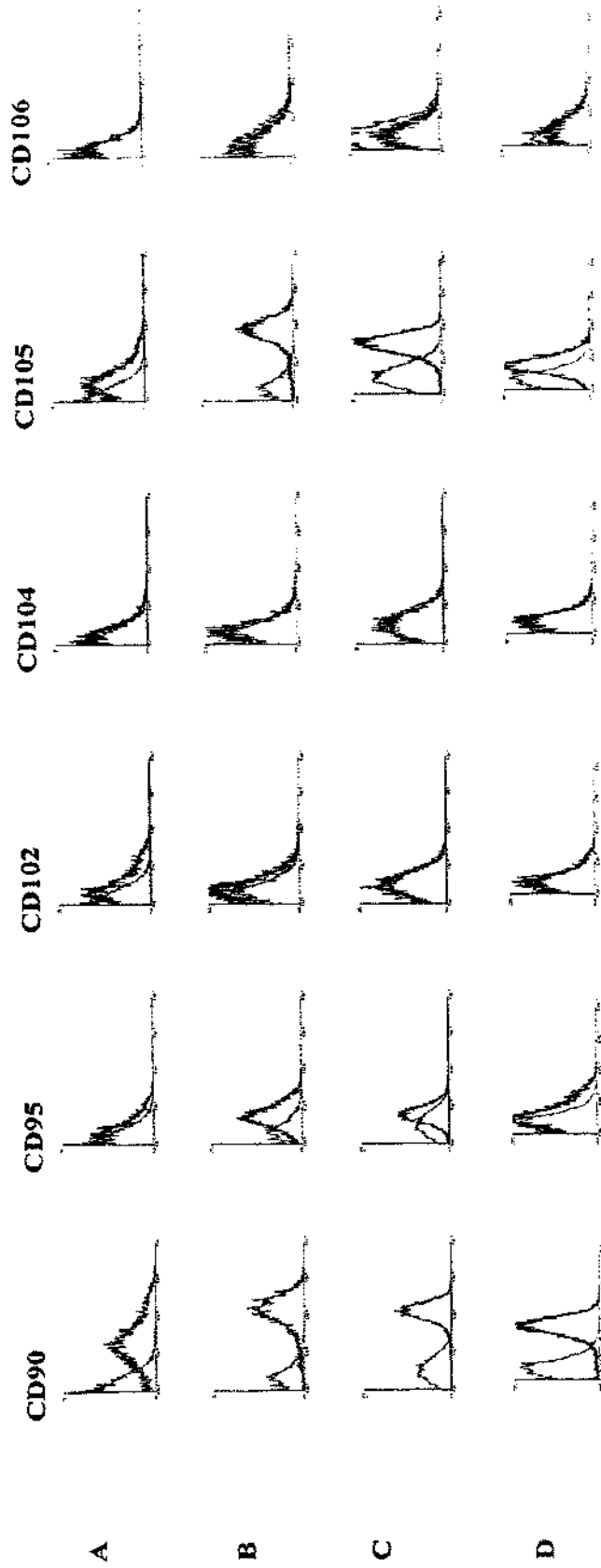


Figura 2(cont.)

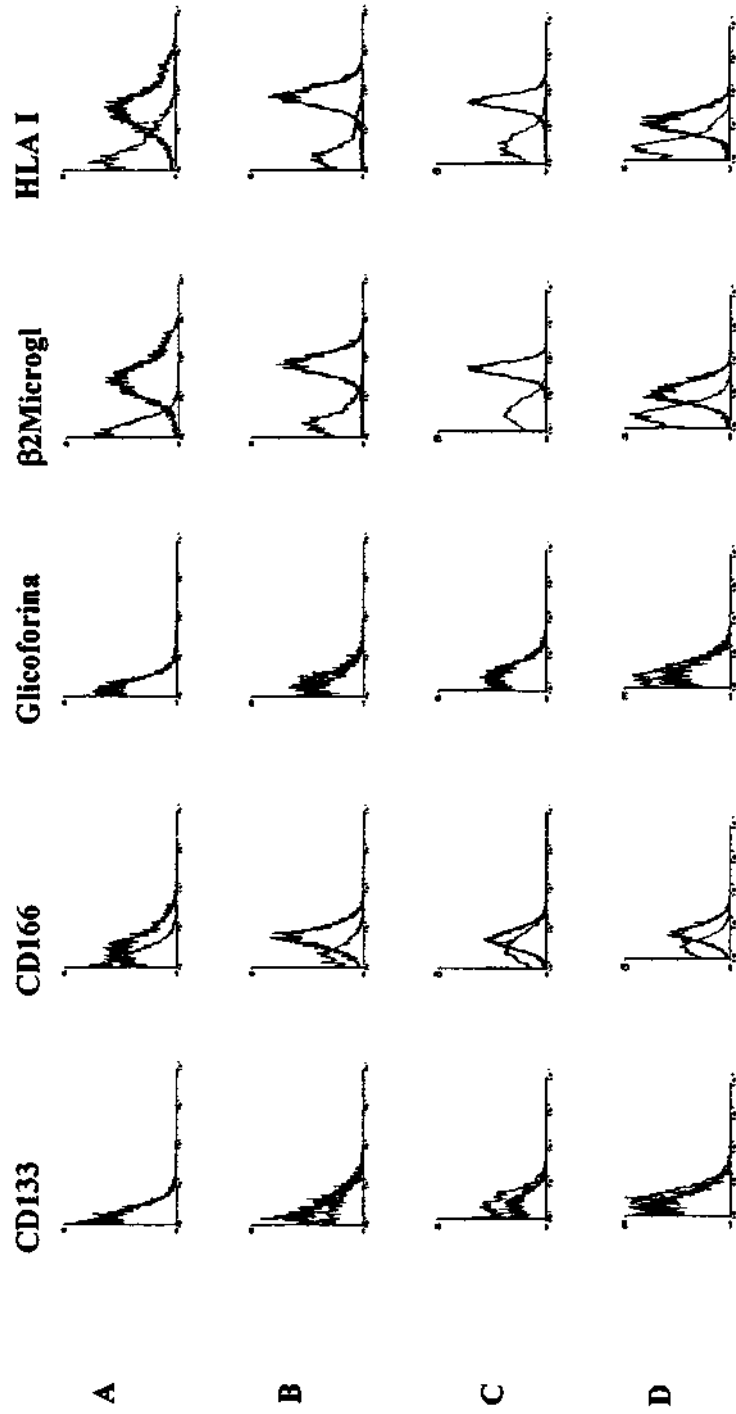


Figura 2(cont.)

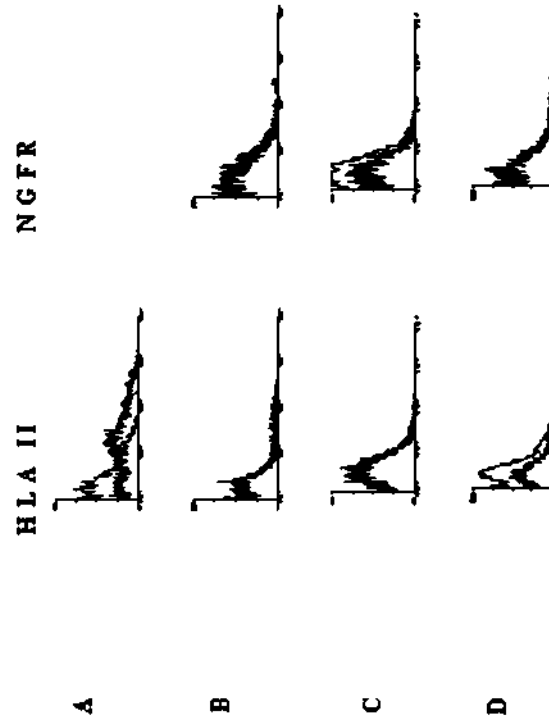


Figura 3

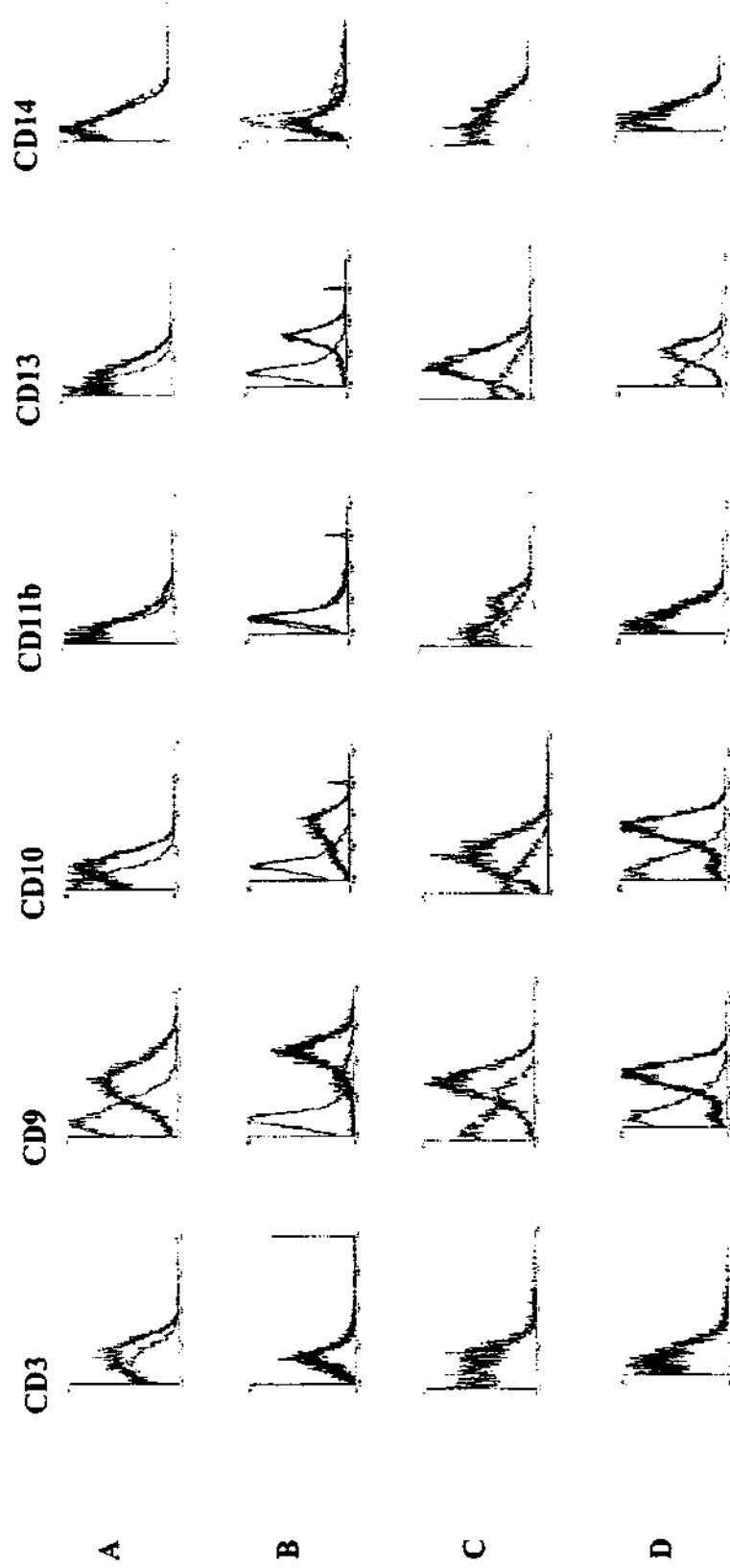


Figura 3(cont.)

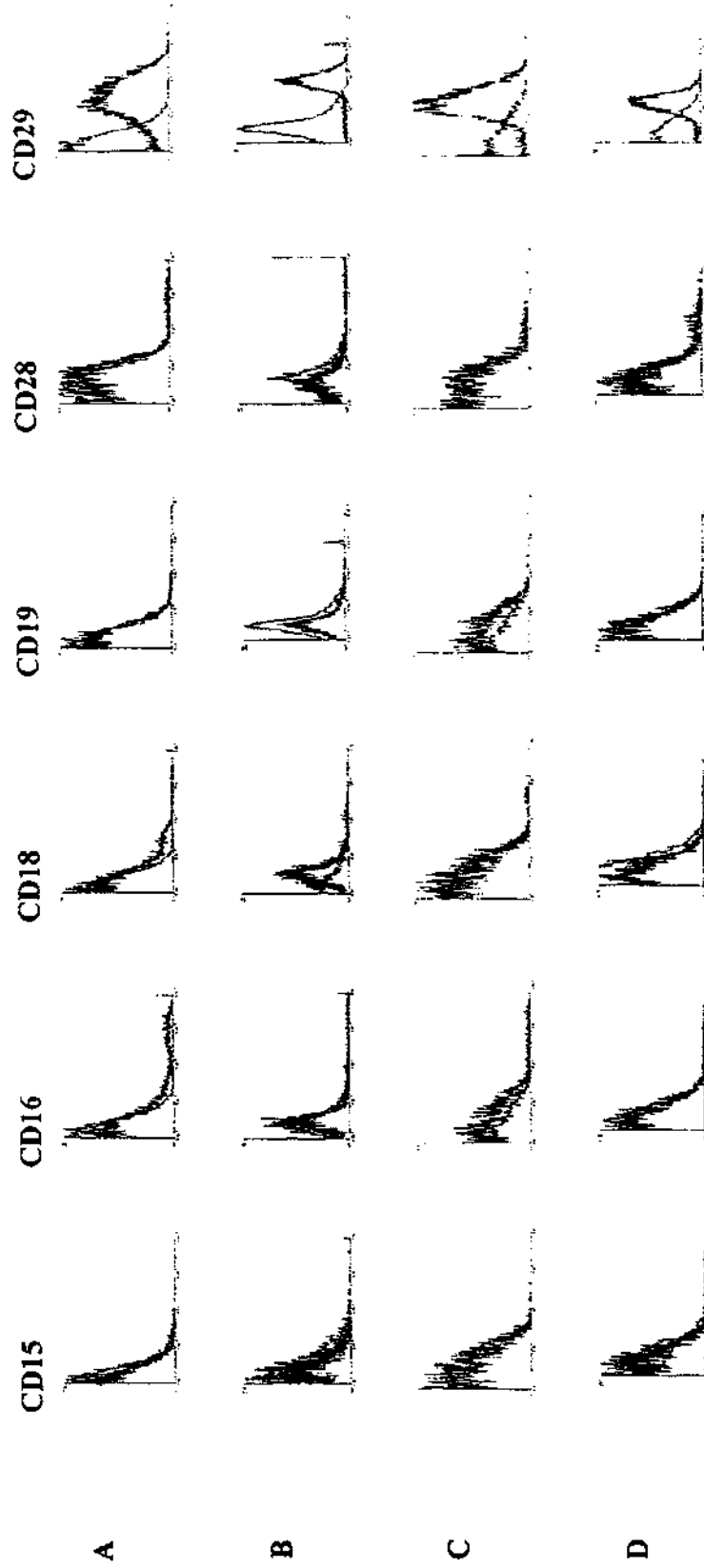


Figura 3(cont.)

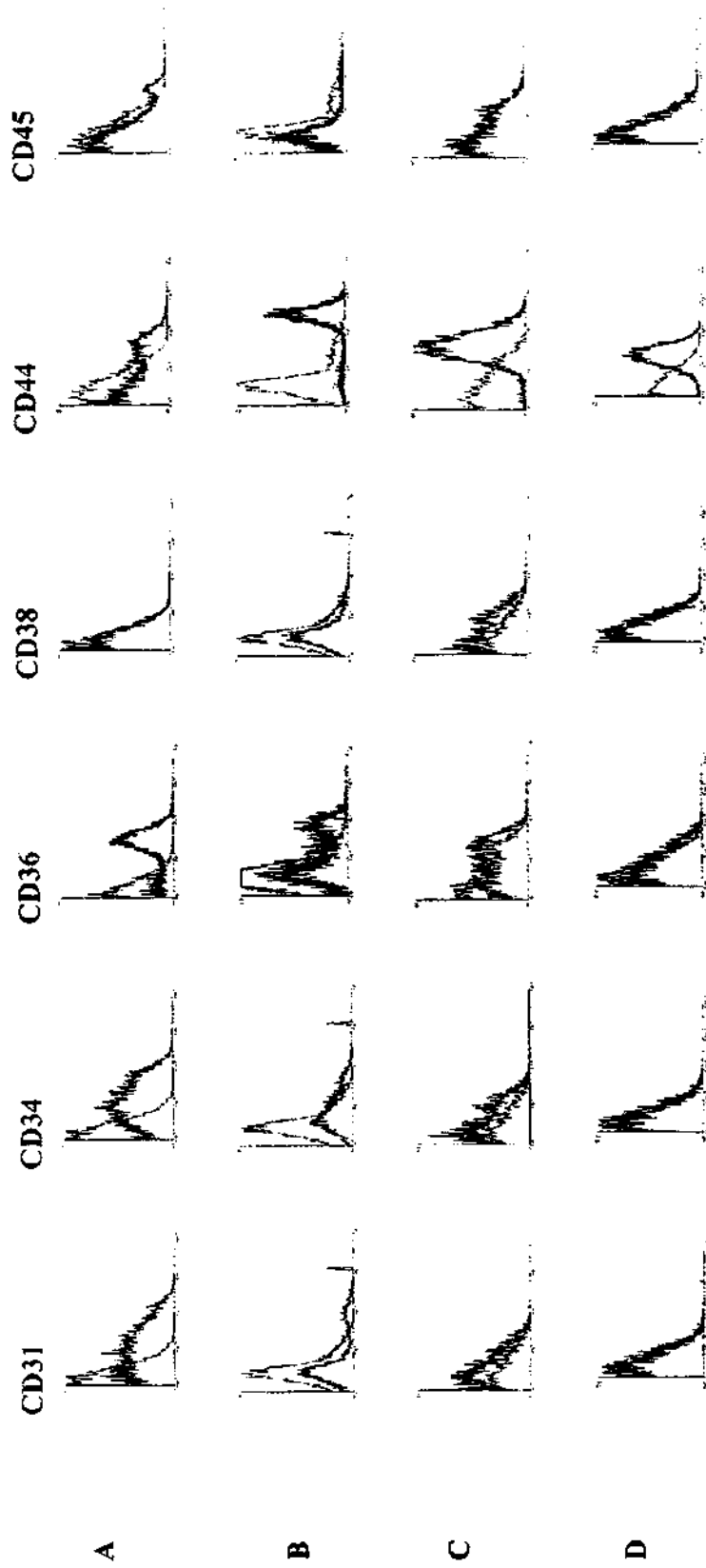


Figura 3(cont.)

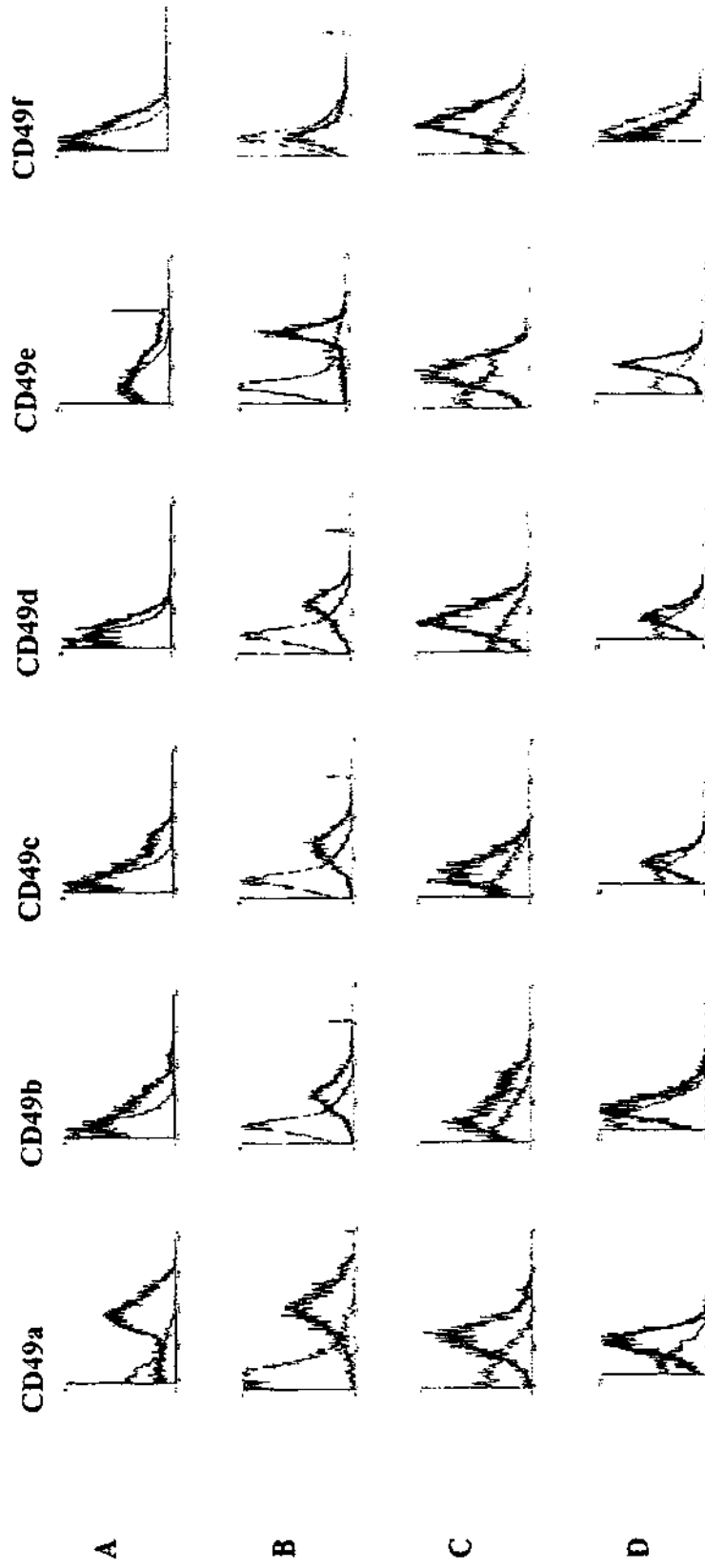


Figura 3(cont.)

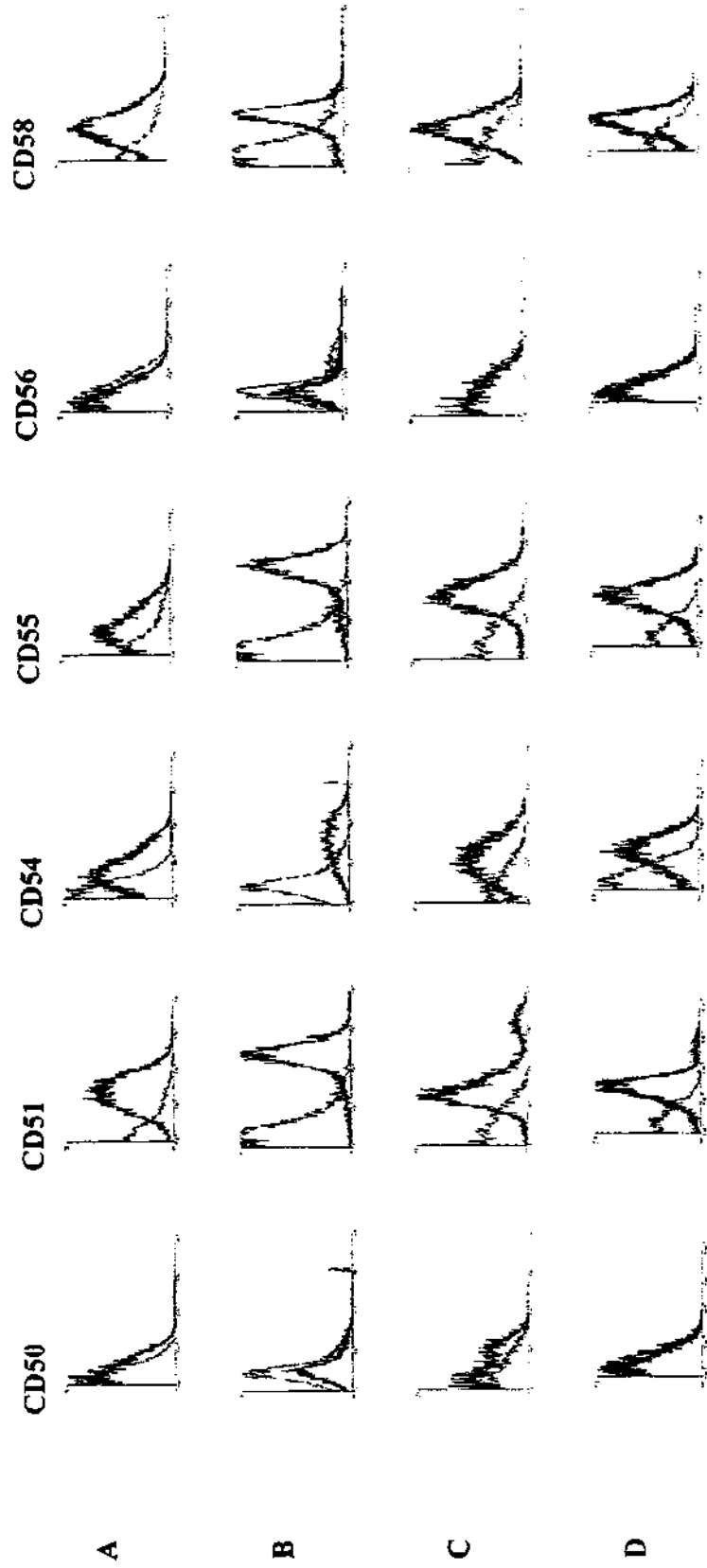


Figura 3(cont.)

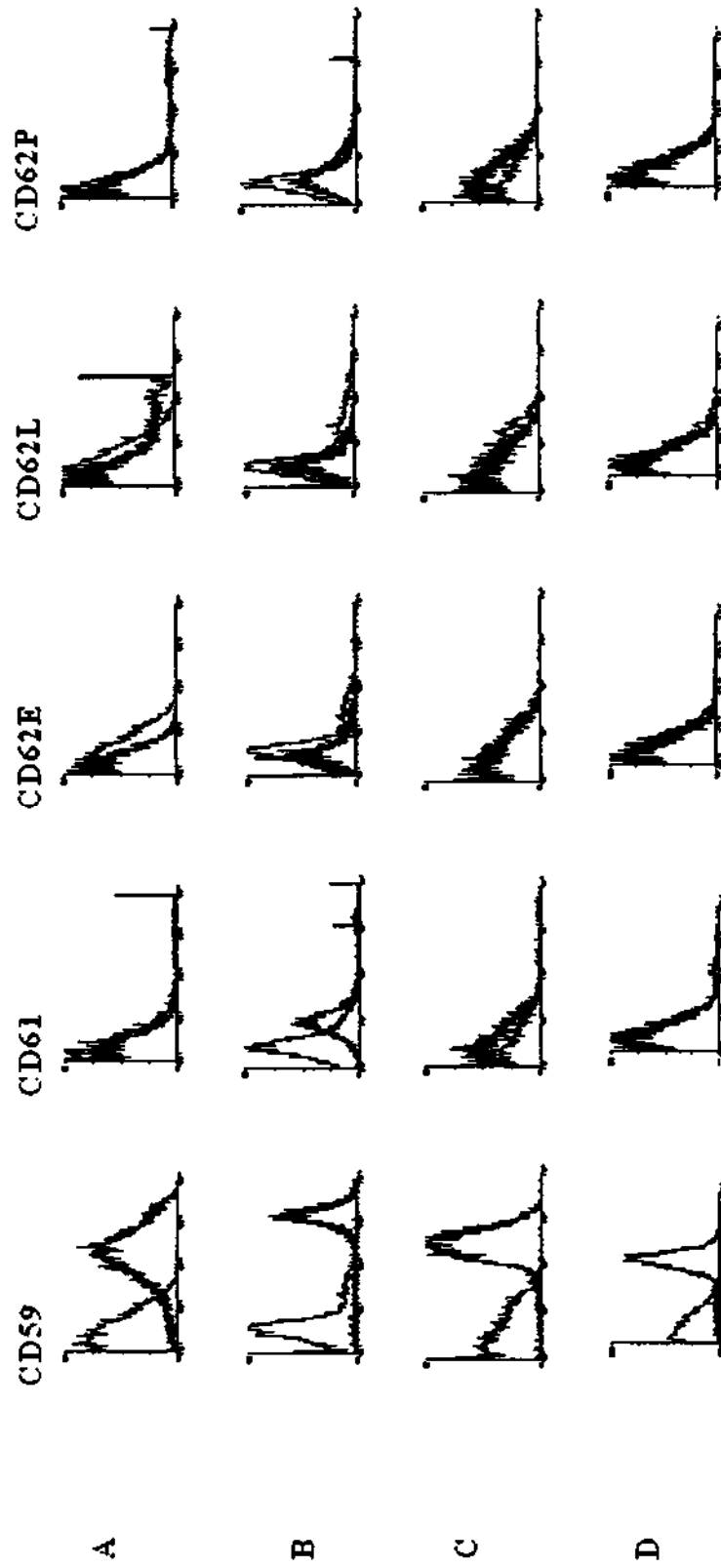


Figura 3(cont.)

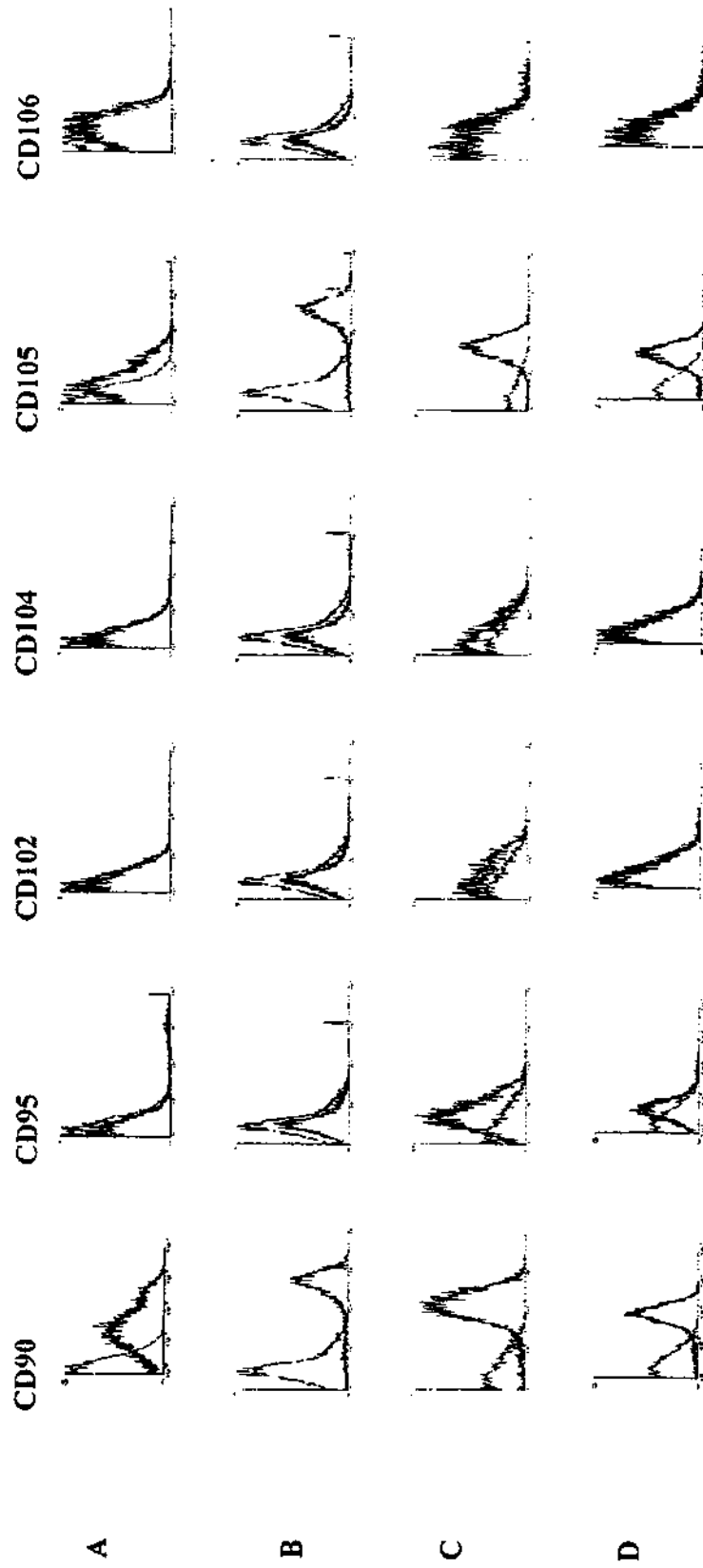


Figura 3(cont.)

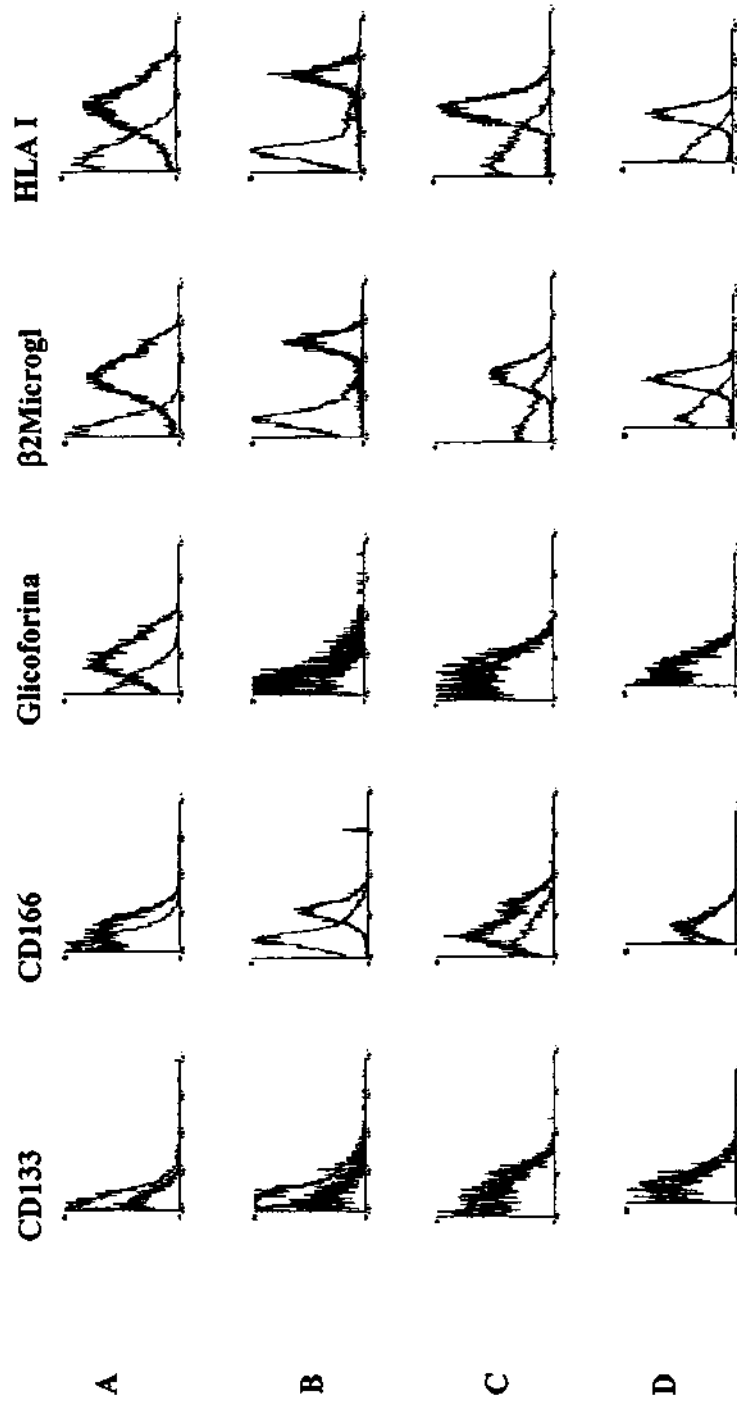
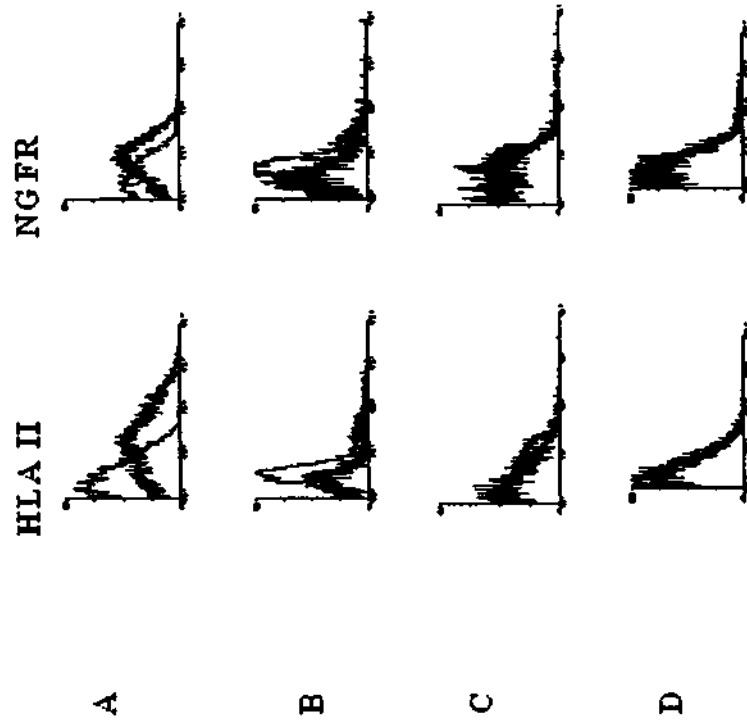


Figura 3(cont.)



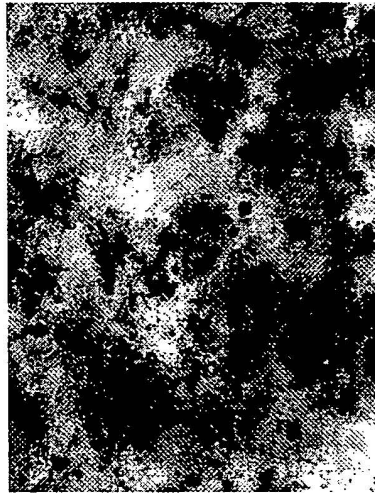


B



D

FIGURA 4



A



C