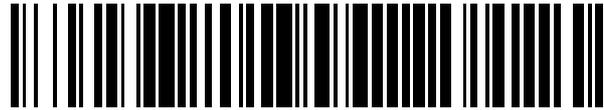


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 847**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03766432 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 1527161**

54 Título: **Células madre procedentes de tejido adiposo y células diferenciadas procedentes de estas células**

30 Prioridad:

**31.07.2002 FR 0209799**

**28.02.2003 FR 0302657**

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

**23.02.2016**

73 Titular/es:

**YVES SAINT-LAURENT PARFUMS (33.3%)**  
**28-34, boulevard du Parc**  
**92951 Neuilly-sur-Seine Cedex, FR;**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%) y**  
**UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS**  
**(33.3%)**

72 Inventor/es:

**DANI, CHRISTIAN;**  
**AILHAUD, GÉRARD y**  
**RODRIGUEZ, ANNE-MARIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 560 847 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

Células madre procedentes de tejido adiposo y células diferenciadas procedentes de estas células

5 La presente invención se refiere a células madre multipotentes humanas, susceptibles de ser aisladas a partir de tejidos adiposos humanos, así como a la utilización de estas células en terapia y en cosmetología. La invención se refiere también a un método que permite aislar estas células madre a partir de tejido adiposo adulto humano, así como a un método para diferenciarlas en células de origen endodérmico o ectodérmico o mesodérmico. Finalmente, la invención se refiere a métodos de cribado que permiten identificar unos agentes susceptibles de ejercer un efecto, o bien en la diferenciación de las células, o bien en el funcionamiento de las células diferenciadas.

15 La presencia de células "madre" multipotentes adultas se ha puesto en evidencia en un gran número de tejidos, por ejemplo la médula ósea, la sangre, el hígado, el músculo, el sistema nervioso, el tejido adiposo. Las células "madre" adultas, en teoría capaces de auto-renovación por tiempo indefinido, poseen una gran plasticidad celular, es decir la aptitud para diferenciarse de otros tejidos distintos de aquellos a los que se pensaba que estaban destinadas. Las propiedades de estas células, similares a las de las células "madre" embrionarias (ES), abren unas perspectivas terapéuticas considerables, especialmente en lo que su uso no plantea los problemas de compatibilidad y de ética encontrados con las células ES.

20 Desafortunadamente, en la actualidad, su aplicación médica (trasplante) sigue estando muy limitada, esencialmente por dos razones:

- en primer lugar, es muy difícil aislar estas células. En efecto, las células "madre" son muy raras en el organismo y en la actualidad se dispone de pocos conocimientos sobre éstas, en particular en términos moleculares, lo que hace imposible su purificación directa. Por ejemplo, existe un método de enriquecimiento de células multipotentes (población denominada "SP" por "Side Population") basada en la capacidad para excluir un colorante vital (Goodell MA *et al.* (1996), J Exp Med, vol 83, 1797-1806; Zhou S *et al.* (2001) Nature Medicine, vol 7, 1028-1034). Otros métodos implican una selección positiva o negativa, basada en la presencia o en la ausencia de marcadores celulares. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 01/11011 describe la depleción de células de médula ósea en células CD45+ glucoforina A+, seguida por el cultivo de las células CD45- / GlyA- en presencia de factores de crecimiento. Un método similar es descrito por Reyes *et al.* (Blood, noviembre de 2001, vol. 98, n° 9, 2615-2625).

- en segundo lugar, la amplificación previa de estas células en el estado indiferenciado *in vitro* presenta un problema importante.

35 Aunque numerosos investigadores han podido poner en evidencia con éxito la presencia de células humanas multipotentes en un gran número de tejidos, ninguno de ellos ha podido conservar estas células *in vitro* en el estado indiferenciado, más allá de 50 a 80 duplicaciones de la población. Ahora bien, la capacidad de auto-renovación es un indicador doblemente importante: por un lado, debido al número muy limitado de células madre presentes de forma natural en los tejidos adultos, se puede obtener una cantidad de células madre suficiente para una utilización terapéutica sólo si se pueden multiplicar *in vitro* conservando al mismo tiempo sus características de origen. Por otro lado, la capacidad de auto-renovación está en relación estrecha con la definición misma de la célula madre verdadera (que es inmortal) y por lo tanto puede estar directamente correlacionada con una plasticidad celular extendida. Por lo tanto, es muy deseable aislar unas células multipotentes que tienen una capacidad de auto-renovación que se conserva más allá de 100 duplicaciones de la población.

50 La solicitud de patente internacional WO 01/11011 (a nombre de Furcht, Verfaillie y Reyes) describe unas células humanas multipotentes aisladas a partir de la médula ósea. Estas células tienen un cariotipo normal, un fenotipo HLA Clase I negativo, y pueden ser mantenidas en cultivo *in vitro* hasta 40 duplicaciones de la población. Sin embargo, algunas células raras pueden alcanzar 70 duplicaciones de la población. Los autores indican que estas células pueden diferenciarse en células del linaje mesodérmico, por ejemplo en osteoblastos, en condroblastos, en adipocitos y en miocitos, y también en células del linaje ectodérmico y del linaje endodérmico. Estas células son, no obstante, capaces de un número de divisiones limitado, los autores sugieren por lo tanto, para permitir la producción de cantidad importante de células, introducir un gen heterólogo que codifica la telomerasa. Este gen heterólogo debe ser escindido antes de cualquier utilización en trasplante. Esta técnica de inmortalización reversible sigue siendo no obstante fuertemente controvertida. En efecto, subsiste un riesgo de transformación maligna de las células en el caso en el que se introduce una actividad telomerasa exógena a un nivel de expresión no fisiológico y no controlado por la célula (Wong Jing *et al.*, Nature, 405, junio de 2000, 755-756). Se han descrito también unos trabajos similares por Reyes *et al.* (Blood, noviembre de 2001, vol. 98, n° 9, 2615-2625).

60 Jiang *et al.* (Nature, Advance Online Publication 20 junio de 2002, doi:10.1098/nature00870) describen la producción de células multipotentes de ratones y de ratas que pueden ser mantenidas en cultivo *in vitro* más allá de 100 duplicaciones de la población. Los autores se refieren también a una población multipotente humana que se podría haber conservado *in vitro* más allá de 80 duplicaciones de la población. Dicho esto, no se da ninguna información complementaria a propósito de estas células humanas.

Qu-Petersen *et al.* (J. Cell Biol. 157, 5, 2002, 851-864) se refiere a la obtención de células multipotentes murinas a partir de tejido muscular. Estas células, denominadas "MDSC" ("Muscle Derived Stem Cells") tienen un cariotipo normal y presentan una capacidad de auto-renovación conservando al mismo tiempo su multipotencialidad durante aproximadamente 30 duplicaciones de la población. Se pueden diferenciar en células que pertenecen a diferentes linajes. Dicho esto, el carácter multipotente desaparece más allá de 40 duplicaciones de la población, fase en la que las células se vuelven senescentes y mueren. Estos trabajos sugieren en gran medida que estas células multipotentes tienen un comportamiento inmunológico privilegiado. En efecto, la inyección de estas células en unos músculos de ratones distróficos, inmunológicamente diferentes de aquellas de las cuales proceden las células MDSC, conduce a una regeneración importante del músculo, en ausencia de sustancias inmunosupresoras de tipo ciclosporina. De manera sorprendente, los autores constatan que el trasplante no provoca ninguna infiltración del tejido por unos linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> del ratón injertado. Esta tolerancia se explica, al menos en parte, por el fenotipo MHC Clase I negativo de las células MDSC. Este trabajo muestra por lo tanto que las células MDSC no están reconocidas por los linfocitos T del receptor, que es sin embargo incompatible inmunológicamente, y sugieren así una utilización adaptada de estas células en alo-trasplante. Este estudio no se ha ampliado a células humanas.

Dos hipótesis pueden ser propuestas para explicar la capacidad limitada de auto-renovación presentada por las diferentes células multipotentes aisladas hasta ahora:

- por un lado se puede suponer que estos diversos estudios no se han llevado a cabo sobre unas células "madre" verdaderas, sino más bien sobre unos precursores intermedios. Esta hipótesis está aún más fundada por que las células "madre" pueden ser fácilmente confundidas con los precursores en términos de plasticidad. Además, la contaminación del cultivo por los precursores se ve facilitada por la abundancia de éstos, comparado con las células "madre", pero su vida útil es, por el contrario, limitada;

- por otro lado, se puede también considerar que las células "madre" no se han podido mantener *in vitro* en el estado indiferenciado por que las condiciones de cultivo estaban inadecuadas.

Se debe también señalar que, hoy en día, un gran número de los métodos utilizados para obtener unas células multipotentes emplea como fuente celular la médula ósea. Ahora bien, la extracción de células de médula ósea es una operación delicada, que implica unos riesgos para el paciente, y que representa una fuente de células madre poco abundante. Se trata por lo tanto de una técnica poco apropiada para una producción de células madre a gran escala.

Varios equipos de investigadores han intentado por lo tanto desarrollar unos métodos que permitan aislar unas células multipotentes a partir de otros tejidos más abundantes, y que están desprovistos de grandes riesgos para los pacientes. Desde este punto de vista, el tejido adiposo constituye *a priori* una fuente prometedora. Dicho esto, hasta ahora, a pesar de que la presencia de células multipotentes haya sido demostrada en el tejido adiposo humano, los resultados son relativamente decepcionantes. En efecto, las poblaciones celulares así obtenidas son frecuentemente heterogéneas y no pueden ser mantenidas en cultivo *in vitro* más allá de dos o tres duplicaciones de la población. Además, hoy en día, ningún investigador ha informado de la producción, a partir de tejido adiposo humano, de células multipotentes que tengan un fenotipo HLA Clase I negativo. Esta característica, no requerida para una utilización en autoinjerto, se vuelve absolutamente indispensable si estas células se destinan a una utilización terapéutica más extendida, en particular en alo-trasplante.

Por ejemplo, las solicitudes de patente WO 01/62901 (a nombre de Artecél Sciences Inc) y EP 1 077 254 (a nombre de Zen Bio Inc) describen la obtención, a partir de tejido adiposo, de poblaciones de células estromales, de carácter multipotente. Estas poblaciones son heterogéneas y contienen, entre otros, unos pericitos, unas células endoteliales y unas células de músculo liso (véase Erickson *et al.*, Biochem. and Biophys. Res. Com. 290, 763-769, (2002)). Su capacidad de auto-renovación es extremadamente limitada, y un análisis de la expresión de los marcadores de superficie confirma que son HLA Clase I positiva. Las características de estas poblaciones celulares son por lo tanto difícilmente compatibles con una utilización en terapia.

La solicitud de patente americana US 2002/0076400 (Katz *et al.*) y la solicitud de patente internacional WO 00/53795 (a nombre de la "University of Pittsburgh" y de los "Regents of the University of California") describen también la obtención de poblaciones celulares multipotentes a partir de tejidos adiposos humanos. Estas poblaciones de células pueden ser diferenciadas en adipocitos, en osteoblastos, en condrocitos y en miocitos. Según los autores, pueden ser mantenidas en cultivo *in vivo* durante al menos 15 transferencias celulares sin perder su carácter multipotente. No se da ningún dato sobre la duplicación de la población correspondiente. Antes de someter las células a transferencias sucesivas, se detecta una actividad telomerasa en esta población, sin embargo heterogénea. Esta actividad no se ha medido después de transferencias sucesivas. No se ha efectuado ningún análisis de marcadores de superficie. Por lo tanto, la expresión de antígenos HLA Clase I no se ha determinado.

Zuk *et al.*, Tissue Engineering, 7(2) 211-228, (2001) describen un procedimiento de obtención de células multipotentes a partir de una extracción de tejido adiposo obtenido por liposucción (processed lipoaspirate, PLA). Estas células presentan no obstante un porcentaje de senescencia en el 15% al decimoquinto paso.

La presente invención permite remediar los inconvenientes de las técnicas anteriormente descritas.

En efecto, los presentes inventores han desarrollado un método que permite aislar, de manera reproducible, unas células "madre" multipotentes a partir de tejidos adiposos de niños pequeños y multiplicarlos, en el estado indiferenciado, en grandes cantidades *in vitro* durante más de 200 duplicaciones de la población. Su utilización terapéutica se hace entonces posible. La invención tiene por objeto principal, el procedimiento de producción de células madre a partir de tejidos adiposos, así como la utilización de las células madre obtenidas.

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos significan:

10	Auto-renovación:	la capacidad de dividirse sin alterar las características iniciales de la células.
15	Célula madre:	célula multipotente que tiene una capacidad de auto-renovación elevada, que tiene una actividad telomerasa, y que es capaz de entrar en quiescencia.
15	célula madre adulta:	célula madre diferente de una célula madre embrionaria, que proviene por ejemplo de un recién nacido, de un niño o de un adulto.
20	Multipotente o multipotencial:	capaz de diferenciarse en al menos dos tipos celulares
20	Quiescente:	capacidad de una célula para permanecer en un estado de no-proliferación y de no-senescencia.

Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de células madre humanas multipotentes a partir de tejido adiposo adulto. Este procedimiento comprende, como primera etapa, la puesta en cultivo de células que provienen de una extracción de tejido adiposo humano. Otros tipos de tejido que pueden ser utilizados, sin estar incluidos en el procedimiento según la invención, incluyen los músculos, la médula ósea, el hígado, el sistema nervioso. Después de 12 horas de cultivo, las células son separadas en dos subpoblaciones en función de su velocidad de adhesión, una primera población celular denominada "CA" que se adhiere en menos de 12h, y una segunda población celular denominada "CS" que se adhiere más lentamente y que se encuentra después de 12 horas de cultivo, en suspensión en el medio de cultivo. La población "CA" es después enriquecida hasta la obtención de una población de células capaces de entrar en un estado de quiescencia. A partir de esta fase, se puede entonces inducir una proliferación intensiva de las células madre de la población "CA".

Según una variante preferida de la invención, el procedimiento de obtención de células madre humanas multipotentes, comprende las etapas siguientes:

- a) digestión enzimática de una extracción de tejido adiposo,
- b) recuperación de una fracción celular desprovista de adipocitos, que contiene todos los tipos celulares presentes en la preparación obtenida según (a) con la excepción de los adipocitos,
- c) cultivo *in vitro* durante al menos 12 horas, de la fracción celular obtenida según la etapa (b),
- d) selección de dos subpoblaciones celulares, denominadas población "CA" y población "CS", presentando la población CA una velocidad de adhesión inferior a 12 horas, y presentando la población "CS" una velocidad de adhesión superior a 12 horas,
- e) enriquecimiento de la población "CA" hasta la obtención de una población de células capaces de entrar en un estado de quiescencia,
- f) eventualmente, inducción de una proliferación incrementada de las células madre de la población "CA", por ejemplo por adición de un factor de crecimiento.

La figura 19 presenta un esquema de una variante preferida del procedimiento de la invención.

Etapas (a): digestión enzimática de una extracción de tejido adiposo:

La etapa de digestión enzimática está preferentemente efectuada por puesta en contacto de la muestra de tejido adiposo con una preparación enzimática tal como la colagenasa durante un tiempo corto, es decir máximo 10 minutos, y más preferiblemente de 5 a 10 minutos, o también de 5 a 8 minutos. Esto permite una disociación completa del tejido evitando al mismo tiempo dañar algunos tipos celulares, y conduce por lo tanto a una mejor viabilidad de todos los tipos celulares.

En lo que concierne a la naturaleza del tejido adiposo, proviene preferentemente de un individuo sano, preferiblemente de un niño pequeño sano, edad preferentemente de menos de 10 años, por ejemplo de un recién

nacido o de un niño con edad de 2 o 3 meses hasta 8 años. Puede tratarse de niños de sexo masculino o femenino.

La edad del donante parece ser un punto importante. En efecto, un cierto número de datos obtenidos a partir de células "madre" hematopoyéticas sugiere en gran medida que las células "madre" no sólo disminuyen en número con la edad del individuo, sino que sufren también un proceso de envejecimiento que se traduce en una pérdida de funcionalidad (Geiger H y Van Zant (2002), Nature, vol. 3, n° 4, 329-333).

Si se extrapolan estos datos, el tejido adiposo de niños pequeños parece constituir una fuente de células "madre" más abundantes y más funcionales que el tejido adiposo de individuos adultos.

La extracción de tejido puede provenir de cualquier sitio anatómico, pero es preferiblemente una extracción de tejido de origen extramedular, que proviene más particularmente de la región umbilical o de la región púbica o de la región inguinal o de la región perineal o de la región abdominal o de la región subcutánea. Las regiones púbicas, pre-púbicas, inguinal y umbilical son particularmente más preferidas.

Etapa (b): recuperación de una fracción celular desprovista de adipocitos:

El tejido adiposo que ha sufrido una digestión enzimática se trata después para retirar los adipocitos. Se recupera entonces una fracción celular desprovista de adipocitos, que contiene todos los tipos celulares presentes en el tejido adiposo (por ejemplo preadipocitos, células madre, células endoteliales, pericitos, mastocitos, etc.), con la excepción de los adipocitos.

La eliminación de los adipocitos se puede efectuar mediante cualquier medio apropiado. La centrifugación es particularmente eficaz, ya que todas las células de interés se encuentran en el residuo de centrifugación, mientras que los adipocitos flotan en el sobrenadante.

Es importante señalar que esta etapa del procedimiento se efectúa sin filtración, lo que permite así conservar en cultivo todos los tipos celulares diferentes de los adipocitos. En efecto, en las técnicas clásicamente descritas de preparación celular a partir de tejidos adiposos, se procede generalmente a unas etapas de filtraciones sucesivas o no, según los autores, y esto antes o después de la centrifugación, a fin de eliminar los desechos. Esta etapa sin embargo tiene el riesgo de conllevar la pérdida de algunos tipos celulares.

Etapa (c): cultivo *in vitro*:

La fracción celular obtenida durante la etapa (b) se cultiva después durante al menos 12 horas, y preferentemente durante 12 a 80 horas, por ejemplo 12 a 72 horas.

Para esta etapa del procedimiento, la inoculación de las células se efectúa a una densidad comprendida entre 1000 y 5000 células/cm<sup>2</sup>, por ejemplo 1000 a 3500 células/cm<sup>2</sup>. En efecto, las células multipotentes están poco representadas en comparación con otros tipos celulares, y una inoculación a alta densidad permite por lo tanto asegurarse que cada caja contenga este tipo de célula.

El medio de cultivo utilizado para esta etapa del procedimiento es normalmente un medio de cultivo de tipo DMEM, adicionado de suero fetal sin adición de otros factores de crecimiento. Por ejemplo, un medio particularmente apropiado es el siguiente: DMEM + 10% de suero fetal de ternera descomplementado + antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina).

El rendimiento celular en esta etapa es variable según las muestras: de 1000 a 5000 células por mg de tejido.

Etapa (d): selección de dos sub-poblaciones celulares:

La etapa de enriquecimiento de células madre multipotentes empieza por la separación, al comienzo del cultivo, según la etapa (c) de dos subpoblaciones celulares en función de su velocidad de adhesión:

- una población celular denominada CA que se adhiere en menos de 12h
- una población celular denominada CS que se adhiere más lentamente (de 48 a 72h).

La población CS se encuentra después de 12 horas de cultivo, en suspensión en el medio de cultivo, mientras que la población CA se adhiere a las cajas.

Las células "madre" se encuentran únicamente en la subpoblación CA mientras que la segunda subpoblación contiene unos precursores multipotentes que mueren después de aproximadamente 60 duplicaciones de la población. Aunque la población CS no pueda ser, por lo tanto, utilizada para la producción de células madre, se pueden no obstante utilizar para otras aplicaciones. En efecto, la población CS presenta las características siguientes:

i) es multipotente,

ii) tiene un fenotipo HLA Clase I negativo,

iii) tiene un cariotipo normal,

iv) presenta una capacidad de auto-renovación conservada durante aproximadamente 40 a 60 duplicaciones de población

v) su velocidad de proliferación no está afectada por el "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF).

Esta población celular se presta por lo tanto a utilizaciones terapéuticas y cosméticas comparables a las habitualmente conocidas para unas células multipotentes de la técnica anterior.

La etapa de selección de la población que se adhiere rápidamente (población CA) es importante ya que permite, a partir de la puesta en cultivo, diluir menos las células "madre" con respecto a la masa de las diferentes células precursoras, haciendo una primera selección.

Etapa (e): enriquecimiento en células madre:

Las poblaciones CA y CS son después puestas en cultivo en condiciones idénticas. Para la población CA, este cultivo permite obtener un enriquecimiento importante en células madre. Esta etapa de enriquecimiento se basa en el hecho de que los precursores tienen una vida útil limitada con respecto a las células madre (en teoría inmortales). Durante las primeras duplicaciones de la población, los precursores se multiplicarán mucho más rápidamente que las células madre, después estos empezarán a morir, hasta la fase de 50 a 80 duplicaciones de la población. En esta fase, la población está fuertemente enriquecida en células madre.

Durante esta etapa, cada transferencia celular se efectúa cuando las células llegan al 80% de confluencia y la inoculación se efectúa a alta densidad, es decir a una densidad comprendida entre 1000 y 5000 células/cm<sup>2</sup>, preferentemente entre 1000 y 35000 células/cm<sup>2</sup>, y más particularmente entre 2000 y 2500 células/cm<sup>2</sup>.

En cada transferencia celular, las células son diluidas por 2 o por 3 como máximo, durante aproximadamente 50-80 duplicaciones de la población (fase en la que la población CA está fuertemente enriquecida en células "madre" y en la que la población CS muere, lo que corresponde a la muestra de los precursores). Esta etapa es indispensable si se emite la hipótesis de que la verdadera célula "madre", que es una célula quiescente en estado normal, se divide más lentamente que un precursor. Una dilución superior de las células durante unas etapas de tripsinización podría conllevar el riesgo de perder estas células multipotentes en ciertas cajas de cultivo.

Después de aproximadamente 50 a 80 duplicaciones de la población (por ejemplo 60 duplicaciones de la población), la población CS presenta las características de una población senescente (pérdida del potencial proliferativo y pérdida de la multipotencialidad) y muere. Por el contrario, la población CA en esta misma fase prolifera más lentamente comparado con las primeras duplicaciones de la población (tiempo de duplicaciones de la población de aproximadamente 72 horas, comparado con un tiempo medio de duplicaciones de aproximadamente 36 horas inicialmente), y es capaz de entrar en quiescencia.

La población CA se puede considerar como que ha alcanzado la quiescencia cuando presenta las características siguientes:

\* parada espontánea de la proliferación al 70% de confluencia aproximadamente;

\* la confluencia puede ser alcanzada en esta fase en presencia de bFGF u otros factores de crecimiento. Una disminución del tiempo de duplicaciones de la población de 72 horas aproximadamente a 35 horas aproximadamente puede ser observada;

\* el efecto del bFGF u otros factores de crecimiento en el tiempo de duplicaciones es reversible.

Además, la medición de la actividad X-gal endógena determinada a pH6 en la población CA es negativa (inferior al 0,05%), lo que confirma que esta población está en estado quiescente y no senescente.

El medio de cultivo empleado para esta etapa de enriquecimiento es típicamente un medio sin factores de crecimiento añadido, por ejemplo el medio de cultivo DMEM+10% de suero fetal de ternera descomplementado + antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina).

Etapa (f): inducción de proliferación de las células madre en el estado indiferenciado:

Después de alcanzar la quiescencia, la proliferación de las células de la población CA está inducida por tripsinización y dilución de las células en nuevas cajas. Preferentemente, las células se someten a un tratamiento con tripsina al 80% de confluencia y se diluyen de 2 a 10 veces, preferentemente de 5 a 10 veces, en nuevas cajas de cultivo idénticas.

5 La adición de un factor de crecimiento en esta fase, por ejemplo el factor de crecimiento fibroblástico básico /bFGF(, PDGF, EGF, NGF o SCF permite la proliferación intensiva de las células "madre" de la población CA. La adición de bFGF humano en esta fase es particularmente preferida.

10 La adición de factores de crecimiento tales como el bFGF, incorporado por ejemplo a una concentración de aproximadamente 3 a 20 ng/ml de medio, particularmente 5 a 10 ng/ml, permite no sólo reducir a la mitad el tiempo de duplicaciones de la población (por ejemplo el tiempo de duplicaciones de la población sin bFGF es de aproximadamente 72 horas, mientras que con el bFGF es de aproximadamente 36 horas, pero permite también a la población alcanzar la confluencia. En efecto, sin factores de crecimiento, la proliferación de una población quiescente de células madre de la invención puede ser provocada por tripsinización y dilución, pero la proliferación se detiene espontáneamente al 70% de confluencia aproximadamente. En la medida en la que la confluencia es un estado indispensable *in vitro* para iniciar la diferenciación de numerosos tipos celulares, la utilización de factores de crecimiento tales como el bFGF debe ser prevista para la producción *in vitro* de este tipo de célula diferenciada.

20 Esta etapa del procedimiento se distingue claramente de los procedimientos de la técnica anterior. En efecto, según el procedimiento de la invención, los factores de crecimiento tales como el bFGF se utilizan sólo después de obtener una población capaz de entrar en quiescencia. Por contraste, el bFGF es generalmente utilizado a partir de la puesta en cultivo de las células recientemente aisladas (Tsutsumi S *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications 288,413-419 (2001)). Esta utilización muy precoz del bFGF tiene un efecto perverso ya que estimula no sólo la proliferación de las células "madre" verdaderas sino también todos los precursores. Esto tiene como consecuencia incrementar más la relación precursores/células "madre", que se traduce en la pérdida por dilución de este tipo celular raro. Según la invención, el punto innovador es utilizar el bFGF cuando la masa de los precursores ha desaparecido y la población, fuertemente enriquecida en células "madre", se vuelve quiescente.

30 La inducción de la proliferación de las células madre permite producir unas cantidades importantes de estas células multipotentes. Las células así producidas pueden ser recuperadas de los medios de cultivo utilizando unos métodos clásicos.

35 En resumen, el procedimiento de la invención comprende varios elementos innovadores que permiten optimizar la producción de células madre:

- una digestión rápida por una preparación enzimática tal como la colagenasa (etapa (a)) que permite una disociación completa del tejido y que evita al mismo tiempo dañar algunos tipos celulares,

40 - la ausencia de etapas de filtración en la etapa (b), para evitar perder en los filtros algunos tipos de células,

- la inoculación de las células de alta densidad durante unas etapas de cultivo (d) y (e). En efecto, las células multipotentes están poco representadas en comparación con otros tipos celulares,

45 - el aislamiento de 2 subpoblaciones "CA" y "CS" en función de su velocidad de adhesión,

- la utilización tardía de un factor de crecimiento tal como el bFGF, después de que las células se hayan vuelto quiescentes (etapa f).

50 Realizando el procedimiento de la invención, los presentes inventores han establecido varias líneas multipotentes humanas a partir de tejidos adiposos de niños pequeños. La técnica de la invención se validó sobre varias extracciones de tejidos adiposos, por ejemplo las indicadas en la Tabla I (véanse los ejemplos siguientes).

55 Las células de la invención presentan numerosas características de las células madre, por ejemplo: capacidad para entrar en quiescencia; salida de la quiescencia inducida por el bFGF u otros factores de crecimiento, lo que se traduce en una recogida intensa de la proliferación (efecto reversible de estos factores de crecimiento, segregados *in vivo* en el organismo durante daños corporales); mantenimiento de la multipotencialidad durante un número elevado de duplicaciones de la población; una actividad telomerasa significativa; un cariotipo normal.

60 Más particularmente, la invención se refiere a una célula adulta humana y multipotente aislada, caracterizada por que presenta:

i) una capacidad de auto-renovación conservada durante al menos 130 duplicaciones de la población,

65 ii) una actividad telomerasa endógena de al menos un 20% de la actividad telomerasa de la línea humana transformada HEK293T,

iii) un fenotipo HLA Clase I negativo, incluso en presencia del 10% de suero fetal de ternera,

iv) un cariotipo normal,

v) una capacidad a entrar en quiescencia después de 50 a 80 duplicaciones de la población,

vi) un porcentaje de senescencia inferior al 0,05% en la fase de 60 duplicaciones de la población.

La capacidad de auto-renovación de las células de la invención se conserva durante al menos 130 duplicaciones de población, y más particularmente durante al menos 200 duplicaciones de la población. Esto significa que las células de la invención son capaces de sufrir al menos 130 o 200 duplicaciones de la población sin perder sus características de origen. En otras palabras, la multipotencialidad, la actividad telomerasa, el fenotipo HLA Clase I negativo, el cariotipo normal y la capacidad para entrar en quiescencia son conservadas durante todas estas duplicaciones de la población.

La actividad telomerasa de las células de la invención, medibles utilizando unas técnicas convencionales, es particularmente importante. En efecto, en conformidad con la definición de la célula "madre" de Watt y Hogan (Science, vol 287, febrero de 2000), la actividad telomerasa significa normalmente que las células obtenidas serían capaces de auto-renovación por tiempo indefinido. La actividad telomerasa está únicamente presente en las células embrionarias y, en el adulto, en las células tumorales y las células "madre". Esta actividad confirma por lo tanto que se trata de hecho de células madre.

El nivel de actividad telomerasa endógena de las células de la invención corresponde a al menos el 20%, por ejemplo del 20 al 50% de la actividad telomerasa de una línea celular de referencia, más particularmente del 22 al 50%. La línea de referencia es la línea humana transformada HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 inmortalizada por Ag T), una línea transformada que tiene una actividad telomerasa endógena. Esta actividad se puede medir en cualquier fase. Se puede medir preferentemente más allá de 30 o 40 duplicaciones de la población, por ejemplo en la fase de la quiescencia después de aproximadamente 60 duplicaciones de la población.

En lo que se refiere a las características inmunológicas de las células de la invención, son diferentes de una célula somática clásica. En efecto, estas células no expresan las moléculas del sistema HLA de Clase I en su superficie (confirmado por unos análisis de citometría de flujo), ni de HLA Clase II en su superficie. Las moléculas del sistema HLA de Clase I presentan los péptidos antigénicos propios y no propios de los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, por lo tanto su papel crítico en las reacciones de rechazos de injertos. La ausencia de superficie de las moléculas HLA de Clase I sugiere la "universalidad" de las células madre de la invención en trasplante. Estas células podrían ser utilizadas en alo-trasplante sin ningún riesgo de rechazo por parte del hospedante, independientemente de su genotipo.

El fenotipo HLA Clase I y/o Clase II negativo se puede analizar mediante cualquier técnica convencional. Preferentemente, se mide más allá de 30 o 40 duplicaciones de la población, por ejemplo en la fase de la quiescencia alrededor de 60 duplicaciones de la población o en una fase tardía, es decir más allá de la quiescencia, por ejemplo a 100 o 120 duplicaciones de la población. En efecto, durante las primeras duplicaciones de la población, la expresión de superficie de las moléculas HLA de Clase I es baja pero significativa, después desaparece en fases tardías (por ejemplo más allá de la quiescencia entre 50 y 80 duplicaciones de la población), lo que corresponde a la fase de la desaparición de los precursores precoces.

En el contexto de la invención, la expresión "HLA negativo" significa que las células madre de la invención presentan un nivel de expresión de superficie de moléculas HLA de Clase I no detectable por citometría de flujo por simple marcado (utilización de un fluoróromo). Preferentemente, las células "HLA negativo" de la invención presentan también un nivel de expresión de superficie de moléculas HLA de Clase II no detectables por citometría de flujo por simple marcado.

Además, gracias a un fenómeno de comportamiento inmunitario recomendado, las células de la invención, en el estado diferenciado, no inducen aparentemente ninguna reacción de rechazo en un hospedante, independientemente de su genotipo.

Las células de la invención presentan un cariotipo normal, lo que confirma que no están transformadas.

En el estado normal, las células de la invención son quiescentes (Blau HM *et al.*, Cell, 105, 829-841, 29 de junio, (2001)) y vuelven a proliferar en presencia de bFGF. La quiescencia es una característica propia a las células madre. En efecto, más allá de un cierto número de duplicaciones de la población, las células "no madre" llegan a la senescencia. El estado de quiescencia puede, en teoría, ser mantenido indefinidamente. Para las células de la invención, los inventores han mantenido este estado durante periodos que van hasta un año. La proliferación puede ser inducida después por tripsinación y dilución, eventualmente acompañada de la adición de un factor de crecimiento. En quiescencia, las células de la invención dejan de proliferar espontáneamente, antes de alcanzar la

confluencia, por ejemplo entre un 50% y un 90% de confluencia, más particularmente entre un 60% y un 70% de confluencia.

5 Una característica importante de las células de la invención es su multipotencialidad. En efecto, son capaces de diferenciarse en al menos dos tipos celulares. Más particularmente, son capaces de diferenciarse en células de origen endodérmico (por ejemplo el hígado) o ectodérmico (células nerviosas: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) o también mesodérmico. Como ejemplos de células del linaje mesodérmico, se pueden citar los adipocitos, los osteoblastos, los miocitos, las células endoteliales y los condrocitos.

10 En particular, se ha demostrado que las células de la invención, incluso en fases tardías, son capaces de diferenciarse en adipocitos funcionales (demostrado por lipólisis, actividad GPDH, marcadores adipocitarios), en osteoblastos funcionales (demostrado por la presencia de marcadores osteoblásticos y calcificación de la matriz extracelular), en miocitos funcionales, y en células endoteliales. Esta diferenciación puede tener lugar *in vitro* e *in vivo*.

15 Se ha demostrado en particular que las células "CA" de la invención tienen, a nivel clonal, la capacidad de diferenciarse en adipocitos, en osteoblastos, en miocitos, y en células endoteliales, es decir cada célula CA de la invención es capaz de diferenciarse en estos cuatro tipos celulares. Contrariamente a las células adipocitarias, osteoblásticas y miocitarias que pertenecen al "Limb bud mesoderm", las células endoteliales derivan del mesodermo visceral. Las células de la invención no están, por lo tanto, limitadas a una diferenciación en células del linaje mesenquimal, pero pueden diferenciarse más generalmente en células del linaje mesodérmico.

20 Los inventores han investigado la presencia de marcadores sobre las células madre de la invención. Estos han constatado que expresan los factores de transcripción Oct-4 y Rex-1, y el antígeno de superficie ABCG2 (portador ABC responsable del fenotipo "SP": Zhou S *et al.*, Nature Medicine, 7, n° 9, septiembre de 2001, 1028-1034). Los factores de transcripción Oct-4 y Rex-1 son expresados específicamente en las células madre embrionarias de ratones y humanos. El Oct-4 es indispensable para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células embrionarias de ratones. Se ha mostrado asimismo que el Oct-4 está expresado por las células madre embrionarias humanas.

30 Se ha podido también observar que las células madre de la invención no reaccionan al "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF), a concentraciones de aproximadamente 10 ng/ml. El LIF no produce ningún cambio de morfología o de proliferación de las células. Conforme a los resultados obtenidos por otros investigadores con unas células madre humanas, en particular unas células madre embrionarias, se puede concluir por lo tanto que las células de la invención no expresan aparentemente el receptor para el LIF ("LIF-R") y por lo tanto son LIF-R negativo.

35 Preferentemente, las células de la invención, después de alcanzar la quiescencia, presentan de manera estable el fenotipo siguiente *in vitro*:

40 HLA Clase I negativo,

HLA Clase II negativo,

45 CD3 negativo,

CD13 positivo,

Oct-4 positivo,

50 Rex-1 positivo,

ABCG2 positivo.

55 Estas características fenotípicas se asocian a un cariotipo normal y a una actividad telomerasa significativa. Preferentemente, las células son también LIF-R negativas. Este fenotipo se conserva *in vitro* de manera estable, es decir en ausencia o en presencia de FGF-2, y a concentraciones de suero fetal de ternera que pueden superar el 10%. El fenotipo se conserva también a densidades de inoculación elevadas, y más allá de 140 duplicaciones de la población.

60 El tiempo de duplicaciones de la población celulares de la invención varía en función de la proporción de células madre presentes. Por ejemplo, antes de alcanzar la quiescencia, el tiempo de duplicación es de aproximadamente de 36 a 40 horas, lo que refleja la presencia de precursores en la población CA. A medida que la proporción de células madre aumenta, el tiempo de duplicación aumenta también, para alcanzar aproximadamente de 70 a 80 horas en quiescencia. En efecto, las células madre se dividen mucho más lentamente que los precursores. Después de la quiescencia, la adición de factores de crecimiento tales como el bFGF permite reducir de manera significativa el tiempo de duplicación, por ejemplo hasta 36 horas aproximadamente, lo que permite una producción intensiva y

rápida de células madre.

Las células de la invención pueden ser modificadas genéticamente y después seleccionadas para introducir o hacer expresar una característica nueva, por ejemplo por ablación o modificación de un endógeno o para la expresión de un transgén tal como un gen reportador o un gen cuyo producto de expresión presenta unas propiedades terapéuticas, bajo el control de un promotor apropiado, por ejemplo ubicuo o tejido-específico.

La expresión de un transgén o de un ADN o de un ARN puede ser constitutiva, o bien inductible de manera reversible o irreversible. El ADN o el ARN heterólogo de interés puede ser portado por cualquier vector de expresión, por ejemplo vector viral (incluyendo vectores retrovirales), vectores inertes, vectores plasmídicos o también vector episomal.

La introducción de los vectores en las células puede llevarse a cabo por transfección, por ejemplo por utilización de agentes químicos tales como el fosfato de calcio, por lipofección o también por utilización de agente físico, por ejemplo la electroporación, la microinyección, etc. El mantenimiento de este vector en la célula puede ser o bien en forma episomal, o bien en forma integrada en el genoma, al azar o de manera determinada.

Tales células genéticamente modificadas pueden ser utilizadas en terapia génica para permitir aportar un producto de expresión de un gen heterólogo a un individuo. Gracias al carácter multipotente y HLA Clase I negativo, las células madre de la invención son particularmente apropiadas para este tipo de aplicación.

Cuando las células de la invención son transducidas o transfectadas por un gen informador, pueden ser utilizadas para efectuar numerosos estudios. Por ejemplo, la plasticidad de las células madre multipotentes del tejido adiposo puede ser investigada con la ayuda de células madre, transfectadas con el gen lacZ que codifica la  $\beta$ -galactosidasa (azul después de la coloración Xgal). Estas células marcadas pueden ser utilizadas para unos experimentos *in vitro* o *in vivo*.

Por ejemplo, *in vitro*, la plasticidad de estas células se puede estudiar mediante unos experimentos de co-cultivo. En particular, se puede analizar la capacidad de estas células (de origen mesodérmico) para diferenciarse en células de origen endodérmico (por ejemplo el hígado) y en células de origen ectodérmico (células nerviosas: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas).

*In vivo*, estas células marcadas pueden también ser trasplantadas en el ratón atímico (desnudo), que tiene un sistema inmunitario deficiente y que no puede por lo tanto rechazar estas células. Las células trasplantadas no dan tumores. El poder de regeneración de estas células es visible sólo si se efectúa, previamente, unas lesiones adecuadas en el ratón a trasplantar.

Las células madre de la invención no expresan ninguna molécula HLA de Clase I en su superficie, contrariamente a la mayoría de las células somáticas. La ausencia de estas proteínas cuya función inmunitaria es crucial, deja suponer que estas células madre pueden ser trasplantadas universalmente sin reacción de rechazo.

En efecto, los inventores han demostrado que las células de la invención pueden ser trasplantadas en ratones inmunocompetentes sin reacción de rechazo 6 meses después del trasplante.

Las células CA de la invención están por lo tanto caracterizadas por que presentan *in vivo* un comportamiento inmunoprivilegiado, es decir, no da lugar a una reacción de rechazo cuando se trasplantan en un mamífero inmunocompetente (tal como un ratón), y esto después de más de 10 días después del trasplante, preferentemente después de 80 días, y más preferiblemente después de 6 meses. El trasplante puede ser alogénico o xenógeno. La ausencia de reacción de rechazo se puede evaluar con la ayuda de técnicas que permiten poner en evidencia la ausencia de infiltración linfocitaria, por ejemplo con unos anticuerpos anti-CD3, o con una coloración con hematoxilina.

De manera sorprendente, se ha demostrado también que, *in vivo*, las células de la invención tienen una capacidad para migrar al estado no diferenciado. En efecto, 50 días después del trasplante de células CA de la invención en el tibial anterior de un ratón inmunocompetente, la presencia de estas células se ha constatado en unos tejidos lesionados adyacentes al sitio de inyección. Este comportamiento sugiere que las células de la invención pueden contribuir por lo tanto, por reclutamiento, a la restauración de un fenotipo normal en sitios anatómicos diferentes del sitio de inyección.

La presente solicitud describe también unas poblaciones enriquecidas en células multipotentes, caracterizadas por que comprenden unas células madre de la invención, y por que están desprovistas de adipocitos, de fibroblastos, de pre-adipocitos, de células endoteliales, de pericitos, de mastocitos y de células de músculo liso.

La invención se refiere también a una población de células madre susceptible de ser obtenida mediante la realización del procedimiento según la invención.

Las poblaciones de la invención son de manera preferida totalmente homogéneas, es decir que comprenden sólo unas células madre. Más particularmente, las poblaciones son clonales.

5 La invención se refiere también a la producción de células diferenciadas a partir de las células madre de la invención.

10 Por ejemplo, la invención se refiere a la producción de células diferenciadas del linaje mesodérmico, caracterizada por que se cultivan unas células madre de la invención a partir de la confluencia, en presencia de un medio de diferenciación apropiado.

Como medio que permite la diferenciación en adipocitos, se puede citar el medio siguiente:

15 - medio DMEM/Ham's F12 (vol/vol, 1:1 suplementado de antibióticos por ejemplo 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina,

5 µg de insulina humana (Sigma),

10 µg de transferrina humana (Sigma),

20 Activador PPAR $\gamma$ , por ejemplo 1 µM de BRL49653, o 2 µM de ciglitazona (Biomol),

100 a 250 µM de isobutil-metilxantina (IBMX)

25 1µM de dexametasona 0,2 nM de triyodotironina (T3 Sigma).

Cuarenta y ocho a setenta y dos horas después, este medio se sustituye por el mismo medio pero sin contener ya IBMX y dexametasona.

30 Como medio que permite la diferenciación en osteoblastos, se puede citar el medio siguiente:

- DMEM, suplementado de antibióticos, por ejemplo 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina,

10% de suero fetal de ternera descomplementado,

35 0,1 µM de dexametasona (SIGMA),

10 mM de β-glicerofosfato (SIGMA),

40 50 µg/ml de ácido ascórbico (SIGMA).

El medio se sustituye cada 2-3 días, y esto durante un periodo comprendido entre 15 y 20 días.

Como medio que permite la diferenciación en miocitos, se pueden citar los medios siguientes:

45 El medio comercializado bajo el nombre de PromoCell, o

medio DMEM

2% de suero fetal de ternera descomplementado,

50 antibióticos (por ejemplo 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina)

El medio se sustituye cada 2-3 días, y esto durante 4 a 6 semanas.

55 Como medio que permite la diferenciación en células endoteliales, se puede citar el medio siguiente:

Medio DMEM suplementado de antibióticos,

60 10 ng/ml VEGF<sub>121</sub> humano (SIGMA).

Para las diferenciaciones en adipocitos, en osteoblastos y en miocitos, las células madre son normalmente inoculadas a una densidad de aproximadamente 10000 a 25000 células/cm<sup>2</sup>.

65 Antes de la etapa de diferenciación, las células son inoculadas normalmente a una densidad de 25000 células/cm<sup>2</sup> en un medio de proliferación (DMEM suplementado con el 10% de FCS y 2,5 ng/ml de FGF-2). Dos días después, el

medio de cultivo se cambia en ausencia de FGF-2 durante 48 horas. Después, las células se mantienen en un medio de diferenciación durante 10 días.

5 Las células madre y poblaciones de células madre de la invención son particularmente aptas para una utilización en terapia y en cosmetología.

Las utilizaciones terapéuticas de las células madre y poblaciones de células madre de la invención comprenden, entre otro, unas utilizaciones en trasplante y en terapia génica.

10 Por ejemplo, para una utilización en trasplante, las células de la invención se multiplican en el estado indiferenciado *in vitro*, seguido de la introducción de las células en un individuo. Las células pueden ser o bien inyectadas en la circulación, o bien implantadas en un sitio anatómico. Las células se diferencian entonces *in vivo* en función del sitio anatómico lesionado. Por ejemplo, el trasplante intramuscular de células madre de la invención en un individuo que presenta lesiones musculares, dará lugar a una diferenciación y regeneración del músculo. Asimismo, la  
15 regeneración de tejido adiposo se puede considerar por diferenciación *in vivo* de las células en adipocitos.

El trasplante de las células de la invención se puede por lo tanto utilizar para la regeneración de tejido *in vivo*, por ejemplo un tejido óseo, un tejido adiposo, o un tejido muscular.

20 Llegado el caso, el trasplante se puede acompañar de la implantación de una matriz susceptible de mejorar la regeneración del tejido, por ejemplo proporcionando un soporte físico para la proliferación de las células o proporcionando unas sustancias tales como unos factores de crecimiento, etc. La matriz puede ser biodegradable.

25 Según la invención, el trasplante puede ser autólogo o alogénico. Las células de la invención son particularmente adaptadas a los alo-trasplantes debido a su carácter HLA Clase I negativo. Las células pueden por lo tanto ser utilizadas en cualquier individuo independientemente de su genotipo, sin riesgo de rechazo.

30 Según otra variante, las células madre de la invención se pueden utilizar en el estado diferenciado, por ejemplo en adipocitos, en condrocitos, en osteoblastos, en miocitos, etc. Según esta variante de la invención, las células madre se someten a una diferenciación *in vitro*, seguida por la introducción de las células diferenciadas en un individuo.

35 Para las aplicaciones terapéuticas de la invención, las células madre pueden ser genéticamente modificadas o no. Cuando las células son genéticamente modificadas, pueden ser utilizadas en terapia génica para aportar un producto de expresión en un paciente, por ejemplo una proteína heteróloga. Las células modificadas pueden ser cultivadas *in vitro* en el estado indiferenciado, después ser introducidas en el recipiente. Alternativamente, las células pueden ser multiplicadas *in vivo* en el estado diferenciado y después ser introducidas en el recipiente.

40 La invención se refiere también a la realización de métodos quirúrgicos y terapéuticos que emplean las células madre de la invención. Se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre de la invención o a una población de células madre según la invención en asociación con un excipiente fisiológicamente aceptable.

45 Las células madre de la invención pueden también ser utilizadas para la producción *in vitro* de proteínas, recombinantes o no, particularmente de proteínas terapéuticas. En efecto, las células de la invención pueden ser cultivadas *in vitro* durante al menos 100, por ejemplo al menos 200 duplicaciones de la población, y constituyen por lo tanto una fuente casi inagotable de productos de expresión. Las proteínas en cuestión pueden ser unos productos de expresión de genes endógenos a las células madre, o alternativamente, pueden ser unos productos de expresión de genes heterólogos.

50 Las células o poblaciones de células de la invención pueden también ser utilizadas en sistemas de cribado para identificar unos agentes activos, por ejemplo unos productos de genes, unos extractos séricos, unos medios acondicionados, unos productos de origen animal o vegetal, unos bancos de agentes farmacológicos, etc.

55 Por ejemplo, la invención comprende un procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de modular la diferenciación de células en células del linaje mesodérmico, caracterizado por:

a) el cultivo de células madre o de una población de células madre según la invención en condiciones que permiten su diferenciación en células del linaje mesodérmico (por ejemplo en adipocitos, en osteoblastos o en miocitos) en presencia de un agente candidato,  
60

b) la comparación de la diferenciación de las células en presencia del agente candidato con la diferenciación en ausencia del agente candidato.

65 El agente en ensayo puede ser un agente susceptible de aumentar la diferenciación, o un agente susceptible de impedir o ralentizar o disminuir la diferenciación (sustancia anti-diferenciadora) o también una sustancia susceptible de modificar la vía de diferenciación.

La invención comprende también un procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de presentar una actividad lipolítica, caracterizado por:

- 5 a) la puesta en cultivo de células madre o de una población de células madre según la invención en condiciones que permiten su diferenciación en adipocitos,  
 b) la puesta en contacto de los adipocitos así obtenidos con un agente candidato, y la evaluación de la actividad lipolítica del agente candidato.

10 La invención comprende también un procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de presentar una actividad anti-lipolítica, caracterizado por:

- 15 a) la puesta en cultivo de células madre o de una población de células madre según la invención en condiciones que permiten u diferenciación en adipocitos,  
 b) la puesta en contacto de los adipocitos así obtenidos con un agente candidato, en presencia de un agente lipolítico,  
 20 c) la evaluación de la actividad antilipolítica del agente candidato.

La invención comprende también un procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de presentar una actividad insulino-sensibilizante, caracterizado por:

- 25 a) la puesta en cultivo de células madre o de una población de células madre según la invención en condiciones que permiten su diferenciación en adipocitos,  
 b) la puesta en contacto de los adipocitos así obtenidos con un agente candidato,  
 30 c) la evaluación de la actividad insulino-sensibilizante del agente candidato, comparado con adipocitos no tratados.

La invención se refiere también a la utilización de las células madre o de una población de células madre según la invención en la cosmética.

35 En la medida en la que las células madre de la invención pueden diferenciarse en adipocitos, estas pueden ser utilizadas en cirugía estética o reparadora, por ejemplo para reducir el aspecto arrugado de la piel, para difuminar las cicatrices o marcas cutáneas diversas, para efectuar un relleno tisular. La invención se refiere por lo tanto a la realización de estos métodos quirúrgicos que emplean las células de la invención.

40 Las células madre o poblaciones de células madre según la invención pueden también ser incluidas en unas composiciones cosméticas que comprenden unos excipientes, vehículos, disolventes, colorantes, perfumes, antibióticos u otros productos y aditivos habitualmente utilizados en los productos cosméticos. La inclusión de las células en cremas, pomadas, ungüentos, geles, fluidos diversos, etc. permite su aplicación directamente sobre la piel u otros tejidos o faneras. La invención se refiere por lo tanto también a las composiciones cosméticas que contienen las células madre de la invención en el estado no diferenciado, o que contienen unas células diferenciadas derivadas de las células madre.

Leyendas de las figuras

50 En la figuras, se ilustran diferentes aspectos de la invención:

Figura 1: actividad  $\beta$ -galactosidasa endógena de las células CA y CS detectada a pH 6.

55 Una coloración Xgal, que revela la actividad  $\beta$ -galactosidasa endógena (que traduce la senescencia de las células), efectuada en la fase de 60 duplicaciones de la población, que corresponde a la transferencia celular 20 ("T20") revela que la población CS es senescente (porcentaje de senescencia  $0,415 \pm 0,025\%$ ), mientras que la población CA es simplemente quiescente (porcentaje de senescencia  $0,045 \pm 0,01\%$ ).

60 Figura 2: efecto del bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) a la concentración de 5 ng/ml de medio) en las poblaciones CA y CS, en fases tardías, es decir después de 50 duplicaciones de la población.

65 La figura 2 muestra la proliferación de CA  $\pm$  bFGF y CS  $\pm$  bFGF (abscisas: días después del esparcimiento de 12000 células/caja de 35 mm de diámetro; ordenadas: número de células (x 1000)/caja). Sólo las células de la población CA responden de manera eficaz a bFGF. Después de 50 duplicaciones de la población, el bFGF no tiene ningún efecto significativo sobre la población CS. Estas observaciones confirman el estado de quiescencia de la población CA y el estado de senescencia de la población CS.

Figura 3: morfología de las células CA en fases tardías (después de 50 duplicaciones de la población) en ausencia de bFGF y en presencia de bFGF.

5 "W/O fgf" = en ausencia de bFGF

"+FGF" = en presencia de bFGF (5 ng/ml)

"FCS" = suero fetal de ternero ("Foetal Calf Sérum")

10 El bFGF conlleva un cambio de la morfología de las células. Quiescentes, estas son aplanadas y ensanchadas. En presencia de bFGF, y por lo tanto en fase proliferativa, toman una forma fibroblástica.

15 El efecto de bFGF es reversible.

Figura 4: cariotipo de las células de la Primo 2 CA

20 El cariotipo de las células de la primo 2 se realizó bajo 2 poblaciones CA y CS, en presencia o no de bFGF y en diferentes pasos. Para las células de la Primo 2CA, los cariotipos se realizaron en las siguientes fases: T21 = 80 duplicaciones de la población; T23 = 90 duplicaciones de la población; T34 = 130 duplicaciones de la población. En todos los casos, los cariotipos son normales. La Figura 4 muestra un ejemplo de cariotipo de las células de la Primo 2CA.

Figura 5: Diferenciación *in vitro* de las células de la Primo 2 CA y de la Primo 2 CS en adipocitos en pasos precoces:

25

CST1: población CS en el paso 1 (que corresponde a 3 duplicaciones de la población);

CST7: población CS en el paso 7 (que corresponde a 21 duplicaciones de la población);

30 CAT5: población CA en el paso 5 (que corresponde a 15 duplicaciones de la población). Coloración Oil Red O.

Figura 6: Expresión transcripcional de marcadores adipogénicos durante la diferenciación de células Primo 2. Análisis por transferencia Northern.

35 D0, D7, D12 = 0,7 y 12 días, respectivamente, después de la inducción de la diferenciación,

CA T14: población Primo 2 CA en el paso 14 (que corresponde a 42 duplicaciones de la población);

40 CS T16: población Primo 2 CS en el paso 16 (que corresponde a 48 duplicaciones de la población);

Figura 7: Diferenciación *in vitro* en osteoblastos de células CA y CS en pasos precoces.

CST1: población CS en el paso 1 (que corresponde a 3 duplicaciones de la población);

45 CST7: población CS en el paso 7 (que corresponde a 21 duplicaciones de la población);

CAT5: población CA en el paso 5 (que corresponde a 15 duplicaciones de la población). Coloración Alizarin Red.

50 Figura 8: Capacidad de diferenciación de las células CA en pasos tardíos.

A: Diferenciación adipocitaria de células de la Primo 2CA. La inducción de la diferenciación adipocitaria se efectúa cuando las células están en la fase T30 (aproximadamente 130 duplicaciones de la población). Coloración Oil Red O.

55 B: Diferenciación osteoblástica de células de la Primo 2CA. La inducción de la diferenciación osteoblástica se efectúa cuando las células están en la fase T30 (aproximadamente 130 duplicaciones de la población). Coloración Alizarin Red.

60 Figura 9: Funcionalidad de los adipocitos y de los osteoblastos: Expresión transcripcional de marcadores específicos o bien de la diferenciación adipocitaria, o bien de la diferenciación osteoblástica.

65 La expresión transcripcional de los marcadores hPPAR $\gamma$ -2, haP2 y hOc se determina por RT-PCR. Las células utilizadas son i) unos adipocitos (lado izquierdo de la figura), procedentes de Primo 2CA, teniendo lugar la inducción adipocitaria en la fase T32 (aproximadamente 140 duplicaciones de la población), y ii) unos osteoblastos (lado derecho de la figura), procedentes de Primo 2CA, teniendo lugar la inducción osteoblástica en la fase T32

(aproximadamente 140 duplicaciones de la población).

hPPAR $\gamma$ -2: receptor  $\gamma$  humano activado por los proliferadores de peroxisoma ("human peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ "): marcador adipocitario.

5

haP2: proteína de unión de los ácidos grasos humanos ("human fatty acid binding protein"): marcador adipocitario,

hOC: osteocalcina humana (marcador osteoblástico).

10 Figura 10: funcionalidad de los adipocitos: capacidad de lipólisis de las células de la Primo 2CA.

Se han realizado unas lipólisis sobre unos adipocitos obtenidos a partir de células Primo 2CA T32 (aproximadamente 140 duplicaciones de la población), con unos agonistas específicos de diferentes receptores  $\beta$ -adrenérgicos. La figura 10 muestra las velocidades de lipólisis obtenidas, y confirman la ausencia de receptor  $\beta$ 3 adrenérgicos.

15

Figura 11: funcionalidad de los osteoblastos: detección de calcio asociado a la matriz extracelular.

20

La matriz extracelular presente en las cajas de cultivo después de la lisis de la alfombra celular se seca y después se incuba con la solución de "SIGMA calcium detection kit". La cantidad de calcio segregada por los osteoblastos se cuantifica por lectura de esta solución en el espectrofotómetro (DO 575). Se confirma la funcionalidad de los osteoblastos.

25

La cantidad de calcio segregada por los osteoblastos varía en función del lote de suero (211707, 210407, 210811, 210812, 3903, clásico). Estos pueden contener unas citoquinas, hormonas o factores de crecimiento no caracterizados y presentes en proporciones variables.

Los adipocitos no segregan una cantidad significativa de calcio.

30

Figura 12: morfología de las células de la Primo2CA en función del número de duplicaciones de la población

A: 40 duplicaciones de la población

B: 100 duplicaciones de la población: quiescentes

35

C: 150 duplicaciones de la población: quiescentes

D: 150 duplicaciones de la población + bFGF: en fase proliferativa.

40

El bFGF conlleva un cambio de la morfología de las células. Quiescentes, estas son aplanadas y ensanchadas. En presencia de bFGF, y por lo tanto en fase proliferativa, toman una forma fibroblástica (véase también la Figura 3).

Figura 13: Capacidad de diferenciación adipocitaria de las Primo 1CA, Primo 3CA y Primo 6CA: adipocitos después de 8 días de diferenciación.

45

A: Primo 1: diferenciación inducida a 50 duplicaciones de la población

B: Primo 3: diferenciación inducida a 40 duplicaciones de la población

50

C: Primo 6: diferenciación inducida a 40 duplicaciones de la población

Figura 14: Capacidad de diferenciación adipocitaria de las Primo 1CA, Primo 3CA y Primo 6CA: coloración Oil red O

A: Primo 1: diferenciación inducida a 40 duplicaciones de la población

55

B: Primo 3: diferenciación inducida a 25 duplicaciones de la población

C: Primo 6: diferenciación inducida a 25 duplicaciones de la población

60

Figura 15: marcado celular y análisis en citometría de flujo.

Demostración del carácter HLA Clase I negativo de las células madre Primo 2CA.

Marcado simple: FITC

65

1. HELA: células humanas tumorales. HLA Clase I positivo

2. SVF: tejido adiposo adulto, ninguna duplicación de la población. HLA Clase I positivo

3. Primo 2CA: 120 duplicaciones de la población

5 4. Primo 2CS: 45 duplicaciones de la población

Curva negra: IgG de ratones: control anticuerpo negativo

Curva gris: W6/32 anticuerpo anti-HLA Clase I

10 Figura 16: obtención de clones multipotentes a partir de células CA.

15 Los clones CA1 y CA3 se colocaron en un medio de cultivo, lo que permite la diferenciación en adipocitos y en osteoblastos. Los adipocitos se revelaron mediante el colorante con aceite rojo y los osteoblastos mediante el rojo Alizarin.

Figura 17: expresión de un transgén en las células madre CA.

20 Las células madre CA son transducidas por un retrovirus que expresa un gen de resistencia a un antibiótico, la puomicina y el gen informador LacZ. Después, se seleccionan en presencia de puomicina. Las células seleccionadas expresan todas el gen LacZ revelado *in situ* por la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

Figura 18: expresión de Oct-4, de Rex-1 y de ABCG2 en las células madre CA:

25 Fotos de la izquierda: expresión del ARN Oct-4 y ABCG2 en las células CA y el clon CA1

Los ARN son extraídos a partir de las células CA y CA1 y la expresión de Oct-4 y ABCG2 está:

- 30
- amplificada por RT-PCR
  - y después detectada por hibridación.

35 Fotos de la derecha: expresión del factor de transcripción Rex-1 por unas células primo 2CA después de 80 y 160 duplicaciones de la población. El factor de transcripción Rex-1 está implicado en el mantenimiento en el estado no diferenciado de células madre embrionarias. Las cifras "1", "2" y "3" significan "-RT (control negativo)", "células CA", y "células CA1", respectivamente.

Las condiciones de PCR son:

- 40
- para Oct-4: 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 1 min durante 45 ciclos.  
Cebadores: 5'-GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA-3' y  
5'-TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA-3',  
cebador interno 5'-CACTCGGTTCTCGATACTGG-3' para un fragmento de 220-pb.
  - 45 - para ABCG2: 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min durante 31 ciclos,  
Cebadores: 5'-GGCCTCAGGAAGACTTATGT-3' y  
5'-AAGGAGGTGGTGTAGCTGAT-3'
  - 50 - para Rex-1: 94°C, 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, número de ciclos 31; 72° 5 min, 1 ciclo  
Cebador: 5'-CTCTCCAGTATGAACCAGG-3' y  
5'-GAAAGGATCAGAACAACAGC-3',  
cebador interno, 5'-GGCATTGACCTATCAGATCC-3' para un fragmento de 400-pb.

55 Figura 19: representación gráfica de una variante preferida del procedimiento para la producción de células madre adultas a partir de tejido adiposo humano.

Figura 20: características de las células primo2 CA en términos de marcadores de superficie.

60 Se han marcado unas células primo2 CA en las fases 80, 120 y 160 duplicaciones de la población con unos anticuerpos anti-HLA I, anti-HLA-DR anti-CD3, anti-CD13 acoplados previamente con FITC o ficoeritrina. Control = IgG, los anticuerpos utilizados son los siguientes: HLA de clase I conjugado con la fluoresceína (FITC); HLA-DR (HLA clase II) conjugado con ficoeritrina (PE); CD3 (marcador de los linfocitos T) conjugado con PE; CD13 (marcadores de las células estromales de la médula ósea, células endoteliales, progenitores precoces de los granulocitos/monocitos y de sus descendencias) conjugado con FITC.

65 Línea delgada: IgG control

Línea gruesa: anticuerpo de interés

Figura 21: diferenciación miocitaria *in vitro* después de 4 días.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Detección por inmuno-histoquímica de la miogenina, factor precoz de la diferenciación miocitaria. La figura 21 ilustra unos micrográficos de células primo2 CA a 150 duplicaciones de la población, después de 4 días en presencia de un medio de diferenciación en miocitos. Las células se fijan con el 4% de paraformaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se permeabilizan en presencia de PBS/0,1% tritón X100 durante 10 minutos; se procede después al bloqueo de la actividad peroxidasa endógena incubando las células con el 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5 minutos. Las células son después incubadas con el anticuerpo primario: anticuerpo anti-miogenina (espuma anti-humano IgG) (1:100) entre 30 minutos y una hora a temperatura ambiente, después con el anticuerpo secundario (antiespuma IgG acoplado con peroxidasa).

Figura 22: diferenciación miocitaria *in vitro* después de 21 días.

Después de 21 días en presencia de medio de diferenciación en miocitos, detección de la miosina de las fibras musculares rápidas ("fast twitch myosin" o "FT myosin"), marcador tardío de la diferenciación miocitaria (marcador intra-celular). Detección por FACS: después del despegue de las células primo2 CA (150 duplicaciones de la población) estas se fijan en presencia de PBS/1% de formaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se permeabilizan con una solución de digitonina (10 µg/ml de PBS) durante 7 a 8 minutos a temperatura ambiente. Después, se procede al marcado del anticuerpo siguiendo el protocolo descrito para la expresión de los marcadores de superficie (figura 20). El anticuerpo utilizado es un anticuerpo de ratón conjugado directamente con ficoeritrina y que reconoce la FT-miosina humana.

Línea delgada: IgG control

Línea gruesa: FT-miosina

Figura 23: diferenciación en células endoteliales *in vitro*

Detección por inmuno-histoquímica del "factor von willebrandt" (vWF), marcador específico de las células endoteliales. La figura 23 ilustra la expresión del vWF por las células primo2 CA con 150 duplicaciones de la población, después de 21 días en presencia de medio angiogénico. Las células se fijan con un 4% de paraformaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizan en presencia de PBS/0,1% tritón X100 durante 10 minutos; se procede después al bloqueo de la actividad peroxidasa endógena incubando las células con un 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5 minutos. Las células se incuban después con el anticuerpo primario: anti-vWF (Goat IgG que reconoce al mismo tiempo el vWF humano, de rata y de ratón) entre 30 minutos y 1 hora a temperatura ambiente y después con el anticuerpo secundario, anti-goat-IgG acoplado con peroxidasa (1:100). Después de 21 días de mantenimiento en un medio compuesto de DMEM y de hVEGF121 (10ng/ml), las células de primo 2CA expresan el vWF.

Figuras 24 a 27: poder de regeneración muscular *in vivo* de las células de la primo 2 CA después de 10 días, 50 días, 80 días y 6 meses de trasplante en el ratón mdx sin inmunosupresor: las Figuras 24, 25, 26 y 27 ilustran la co-localización, después de 10 días (Fig 24), 50 días (Fig. 25), 80 días (Fig. 26) y 6 meses (Fig. 27) de trasplante de células Primo 2CA en el Tibial Anterior, de huesos humanos con las fibras musculares que reexpresan la distrofina. Esta co-localización se efectuó por doble marcado de la distrofina por inmunofluorescencia y de los huesos humanos por FISH. Las células trasplantadas son unas células Primo 2CA a 160 duplicaciones de la población, en número de 150000.

La etapa de detección de la distrofina por inmunofluorescencia se efectuó antes de proceder al marcado de los huesos humanos por FISH:

- detección de la distrofina por inmunofluorescencia: las muestras de músculos se incuban durante una hora con un anticuerpo que reconoce la distrofina humana, previamente acoplado con la fluoresceína. Los anticuerpos utilizados son:

o bien un anticuerpo específico de la distrofina humana y de ratón (mouse anti-human IgG1: NCL-DYS2 de Novocastra, dirigido contra el extremo C-terminal de la distrofina humana y de ratón),

o bien un anticuerpo específico de la distrofina humana (mouse anti-human IgG2a: NCL-DYS3 de Novocastra, dirigida contra el extremo N-terminal de la distrofina humana)

- detección de los huesos humanos por FISH: la sonda utilizada para detectar los huesos humanos es una sonda específica de todos los centrómeros humanos ( $\alpha$ -satélites) acoplada con digoxigenina (CP5095-DG.5, Appligene Oncor). La etapa de detección consiste en la aplicación sobre las láminas de un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado con rodamina. Antes del análisis de las muestras, se procede a la coloración de la totalidad de los huesos

utilizando una solución de DAPI (coloración azul). Después, las láminas se observan con microscopio de fluorescencia (Axiophot Zeiss) con una lámpara de 100 vatios y un sistema de filtros (Perceptive Scientific International).

En verde: Distrofina;  
En rojo: Centrómeros humanos  
En azul: Huesos (humanos y murinos)  
TA: Tibial Anterior  
G: Gastrocnemio

- 5  
Figura 24 (10 días): anticuerpo anti-distrofina: NCL-DYS2
- fotos de la izquierda: Tibial Anterior no tratado (control);
- 10  
fotos del centro: Tibial Anterior de un ratón mdx tratado con ciclosporina, 10 días después del trasplante;
- fotos de la derecha: Tibial Anterior de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 10 días después del trasplante;
- 15  
Figura 25 (50 días): anticuerpo anti-distrofina: NCL-DYS2
- fotos de la izquierda: Tibial Anterior no tratado (control);
- 20  
fotos del centro: Tibial Anterior de un ratón mdx inmunocompetente, 50 días después del trasplante;
- fotos de la derecha: Gastrocnemio de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 50 días después del trasplante, en el TA adyacente.
- 25  
Figura 26 (80 días): anticuerpo anti-distrofina: NCL-DYS2
- foto de la izquierda: Tibial Anterior de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 80 días después del trasplante;
- 30  
foto de la derecha: Gastrocnemio de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 80 días después del trasplante, en el TA adyacente.
- 35  
Figura 27 (6 meses): anticuerpo anti-distrofina: NCL-DYS3
- fotos de la izquierda: Tibial Anterior de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 6 meses después del trasplante;
- fotos de la derecha: Tibial Anterior de un ratón no tratado (control).
- 40  
Figura 28: puesta en evidencia, por inmunodetección comparativa, del origen humano de la distrofina expresada en las miofibras del músculo trasplantado: el análisis de la presencia de miofibras que expresan la distrofina, y la localización subcelular en el tibial anterior 10 días después del trasplante, se efectuó utilizando los anticuerpos siguientes:
- 45  
(a): un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la distrofina humana y de ratón (mouse anti-human IgG1: NCL-DYS2 de Novocastra,),
- 50  
(b) y (c): un anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal de la distrofina humana (mouse anti-human IgG2a: NCL-DYS3 de Novocastra,),
- (d) y (e): un anticuerpo específico del colágeno III de ratón.
- 55  
La barra que indica la escala corresponde a 15  $\mu$ m en las Figuras 28(a) y 28(b), y a 1  $\mu$ m en las Figuras 28(c) a (e). La estrella \* indica una sección de una misma miofibras.
- La similitud entre las Figuras 28(a) y (b) indica el origen humano de la distrofina expresada. La distrofina humana está localizada debajo del sarcolema. Por el contrario, el colágeno III de ratón está presente en el espacio extracelular entre las miofibras (figuras 28(c) a (e)).
- 60

Figura 29: ausencia de reacciones inmunitarias celulares y humorales 10 días después del trasplante de células madre de la invención: la existencia de una eventual infiltración linfocitaria tras el trasplante de células Primo 2CA en un ratón mdx inmunocompetente se ha estudiado con la ayuda de la hematoxilina (Figuras 29(a), (b) y (c)), o de anticuerpo anti-CD3 de ratón (figuras 29(a'), (b') y (c')).

5 Figura 29(a) y (a'): Tibial anterior de ratón mdx inmunocompetente no tratado (control);  
 Figura 29(b) y (b'): Tibial anterior de ratón, 10 días después del trasplante de células Primo 2CA, en número de 150000;

10 Figura 29(c) y (c'): Tibial anterior de ratón, 10 días después del trasplante de células estomales-vasculares humanas no purificadas, aisladas a partir de tejido adiposo;

15 La barra que indica la escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$  en las figuras 29(a) a (c), y a 20  $\mu\text{m}$  en las figuras 20(a') a (c'). Después de 10 días del trasplante de las células Primo 2CA, no se observa ninguna infiltración linfocitaria (CD3<sup>+</sup>) (véanse las figuras 29(b) y (b')), comparadas con las figuras 20(a) y (a')). Sin embargo, el trasplante de células estromales-vasculares no purificadas, aisladas a partir de tejido adiposo humano, induce una reacción inmunitaria citotóxica y humoral (figuras 29(c) y (c')).

20 Figura 30: ausencia de reacción inmunitaria celular y humoral 6 meses después del trasplante de células de Primo 2CA: la existencia de una eventual reacción inmunitaria 6 meses después del trasplante de células Primo 2CA en un ratón mdx inmunocompetente se ha estudiado aplicando las mismas técnicas que las descritas para la figura 29.

25 Fotos de la izquierda: Tibial anterior de ratón mdx inmunocompetente, 6 meses después del trasplante de células Primo 2CA, marcado con la ayuda de la hematoxilina;

Fotos de la derecha: Tibial anterior de ratón mdx inmunocompetente, no tratado (control), marcado con la ayuda de la hematoxilina.

30 La ausencia de infiltración por los linfocitos T CD3<sup>+</sup> se constata en el músculo trasplantado por las células Primo 2CA, lo que significa la ausencia de reacción de rechazo 6 meses después del trasplante.

35 Figura 31: poder de regeneración muscular *in vivo* de las células de primo 1CA y de Primo 3CA después de 10 días de trasplante sin inmunosupresor en el ratón mdx: la capacidad de regeneración muscular *in vivo* se evalúa por co-localización de los huesos humanos con las fibras musculares que reexpresan la distrofina. La técnica de co-localización es idéntica a la descrita para las células Primo 2CA (véanse las leyendas de las figuras 24 a 27), pero las células trasplantadas son unas células de la Primo 1CA o de la Primo 3CA.

40 - foto PRIMO1: Tibial anterior de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 10 días después del trasplante de células Primo 1CA a 50 y a 120 duplicaciones de la población, en número de 150000.

El anticuerpo utilizado para la detección de la distrofina es un anticuerpo específico de la distrofina humana (mouse anti-human IgG2a: NCL-DYS3 de Novocastra, dirigido contra el extremo N-terminal de la distrofina humana)

45 fotos PRIMO3: Tibial anterior de un ratón mdx inmunocompetente (sin ciclosporina), 10 días después del trasplante de células Primo 3CA a 45, 80 y 110 duplicaciones de la población, en número de 150000.

El anticuerpo utilizado para la detección de la distrofina es también el anticuerpo NCL-DYS3 de Novocastra.

50 Después de 10 días de trasplante, se puede observar un potencial de regeneración muscular, al mismo tiempo para las células de Primo 1 CA y para las células de Primo 3CA.

Figura 32: ausencia de reacciones inmunitarias celulares y humorales 10 días después del trasplante de células de la Primo 3CA:

55 La existencia de una eventual reacción inmunitaria 10 días después del trasplante de células Primo 3CA en un ratón mdx inmunocompetente se ha estudiado aplicando las mismas técnicas que las descritas para las células de la Primo 2CA (véanse las leyendas de las figuras 29 y 30).

60 foto Primo 3: Tibial anterior de ratón mdx inmunocompetente, 10 días después del trasplante de células de la Primo 3CA (110 duplicaciones de la poblaciones, en número de 150000), marcado con la ayuda de la hematoxilina.

Se observa una ausencia de infiltración linfocitaria con las células de la Primo 3CA, lo que sugiere un comportamiento idéntico al de las células de la Primo 2CA.

65 EJEMPLOS

1. Método de obtención y de expansión *in vitro* de las células madre multipotentes del tejido adiposo

1.1. Descripción de las muestras de tejidos adiposos obtenidos

Se obtuvieron seis muestras de tejidos adiposos de niños pequeños, de 1 mes a 7 años de edad, de sexo y localización anatómica variables.

La tabla I resume el origen de cada muestra, el peso de ésta, así como el número de células obtenidas utilizando la técnica que se detallará más adelante.

Tabla I: muestras de tejidos adiposos humanos utilizadas para la producción de células madre multipotentes

Denominación de la muestra	Sexo	Edad	Localización anatómica	Peso de la muestra	Número de células obtenidas
Primo 1	M	De 2 años 7 meses	Región umbilical	300 mg	400 000
Primo 2	V	5 años	Región púbica	400mg	500 000
Primo 3	V	4 meses	Región prepúbica	210 mg	400 000
Primo 4	M	7 años	Región inguinal	2,1 g	2 000 000
Primo 5	V	1 meses	Desconocida	200 mg	1 000 000
Primo 6	V	18 meses	Desconocida	200 mg	350 000

Los ejemplos anteriores describen la obtención de células madre multipotentes a partir de las muestras Primo 1 a 6. Estas células madre se obtuvieron mediante la realización de las etapas siguientes:

- \* aislamiento de células multipotentes a partir de la muestra
- \* enriquecimiento *in vitro* del cultivo en células multipotentes
- \* obtención de una población de células madre quiescentes
- \* inducción de una proliferación intensiva de células madre
- \* medición de la actividad telomerasa
- \* realización de cariotipos en diferentes pasos
- \* estudios de la plasticidad celular (diferenciación en diferentes tipos celulares)
- \* determinación de la presencia o de la ausencia de marcadores celulares
- \* clonación de las células madre

El metodología y los resultados se describen en detalle a continuación.

1.2. Método de aislamiento de las células multipotentes a partir de tejido adiposo de niños pequeños

Después del acto quirúrgico, la muestra se conserva en un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + 10% de suero fetal de ternera, a temperatura ambiente. El tejido se aclara en PBS (Phosphate Buffer Saline) a 37°C y después se escurre y se pesa. La muestra se corta en rodajas muy finas para optimizar la etapa de digestión enzimática.

El medio de digestión está compuesto del medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que contiene unos antibióticos (100 U/ml de Penicilina y 100µg /ml Estreptomicina), 2 mg/ ml de colagenasa (Boehringer referencia 103586) y 20 mg/ml de albúmina de suero bovino fracción 5 (Sigma A referencia 2153). Estando el volumen de digestión en función del peso de tejido, se utiliza generalmente 1 ml de medio de digestión por 100 a 200 mg de tejido. La digestión se efectúa a 37°C bajo agitación lenta. Contrariamente a las técnicas clásicamente descritas en la preparación de preadipocitos humanos, la duración de la digestión es muy rápida, de 5 a 10 minutos, duración que corresponde a la disociación completa del tejido por la colagenasa. La actividad colagenasa se inhibe después mediante la adición de suero fetal de ternera (200 µl/ml de medio de digestión).

5 Se procede entonces a la centrifugación de la preparación celular durante 5 minutos a 1000 rpm, etapa que permitirá separar los adipocitos (que flotan) de los otros tipos celulares contenidos en el tejido adiposo (preadipocitos, células madre, células endoteliales, pericitos, mastocitos, etc.). Es importante señalar que esta etapa del procedimiento se efectúa sin filtración, lo que permite conservar todos los tipos celulares contenidos en el tejido adiposo (con la excepción de los adipocitos).

10 El residuo celular obtenido después de la centrifugación se resuspende en el medio de cultivo: DMEM+ 10 % de suero fetal de ternera descomplementado + antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomina). Se cuenta el número de células obtenidas. El rendimiento celular varía según las muestras: de 1000 a 5000 células por mg de tejido. Las células son inoculadas a alta densidad, de 1000 a 3000 células por cm<sup>2</sup>, en cajas de plástico (poliestireno cristal, Greiner).

15 En el momento del cultivo, se aíslan dos subpoblaciones celulares a partir de su velocidad de adhesión. La primera sub-población, designada bajo el término de "CA", está constituida de células que se adhieren muy rápidamente (menos de 12h). La segunda sub-población, denominada CS, está constituida de células que se adhieren mucho más lentamente (de 48 a 72h).

20 Prácticamente, 12h después del cultivo, algunas células se han adherido al plástico. Estas células constituyen la población CA. Las células que constituyen la población CS, se encuentran al mismo tiempo en suspensión en el medio de cultivo. Este medio de cultivo es extraído y depositado en una nueva caja de cultivo. Después de 72h, las células CS están adheridas.

25 1.3 Enriquecimiento del cultivo en células madre multipotentes:

1.3.1 Obtención de una población de células madre quiescentes:

30 Las dos sub-poblaciones CA y CS son mantenidas en cultivo de la misma manera. Estas células, en fases precoces (que corresponde aproximadamente a 50-60 duplicaciones de la población), presentan unas características similares en términos de plasticidad, de proliferación y de morfología.

Las células son mantenidas en el medio de cultivo DMEM+ 10% de suero fetal de ternera descomplementado + antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina).

35 Cuando las células llegan al 80% de confluencia, se tratan con tripsina (Trypsine-EDTA, Invitrogen) y se vuelven a cultivar en tres nuevas cajas de diámetro idéntico. La densidad de inoculación correspondiente es de 1000 a 3500 células/cm<sup>2</sup>. Las células no ya no se diluyen voluntariamente, a fin de conservar en todas las cajas, las células multipotentes que, teóricamente, se dividen más lentamente que los precursores.

40 Las células se mantienen en estas condiciones hasta que dejen de proliferar. Para Primo 2, las células CA y CS dejan de proliferar a partir de la transferencia celular 20 (T20), que corresponde a 60 duplicaciones de la población.

45 Una coloración Xgal (que revela la actividad β-galactosidasa endógena, detectada a pH 6 y que traduce la senescencia de las células), revela que la población CS es senescente mientras que la población CA es simplemente quiescente (véase la Figura 1).

50 Para esta etapa de enriquecimiento, se han ensayado diferentes medios de cultivo. Se ha observado en particular que las células madre de la invención no reaccionan al "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF) (10ng/ml). El LIF no produce ningún cambio de morfología o de proliferación en las células. Esto tiende a confirmar que las células no expresan ningún receptor para LIF (LIF-R)

1.3.2. Inducción de una proliferación intensiva de las células madre

55 Después del establecimiento de una población de células CA quiescentes, se añade entonces al medio de cultivo anteriormente descrito el bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) humano a la concentración de 5 ng/ml de medio.

60 Como se indica en la Figura 2, sólo las células de la población CA responden de manera eficaz al bFGF. Por el contrario, el bFGF no tiene prácticamente ningún efecto sobre la población CS en fases tardías (es decir después de 50 duplicaciones de la población).

Estas observaciones confirman una vez más el estado de quiescencia de la población CA y el estado de senescencia de la población CS.

65 Las células CA, tratadas con bFGF, se someten a un tratamiento con tripsina al 80% de confluencia y diluidas esta vez de 5 a 10 veces en nuevas cajas de cultivo idénticas.

Hay que precisar dos puntos suplementarios sobre el bFGF:

El bFGF conlleva un cambio de morfología de las células. Quiescentes, son aplanadas y ensanchadas. En presencia de bFGF, y por lo tanto en fase proliferativa, toman una forma fibroblástica (Figura 3, Figura 12)

Además, el efecto del bFGF es reversible (Figura 3).

#### 1.4. Congelación de las células de las dos sub-poblaciones CA y CS

Las células de las dos sub-poblaciones CA y CS son congeladas regularmente, para constituir una reserva de cada población celular y para permitir seguir su evolución durante transferencias celulares. La crioconservación no cambia las propiedades de estas células.

De manera práctica, las células son tripsinadas, centrifugadas y resuspendidas en el medio de congelación constituido de suero fetal de ternera adicionado con el 10% de DMSO. Estas células son después colocadas a -20°C durante 1h, después a -80°C durante una noche y finalmente se almacenan en nitrógeno líquido a -180°C.

#### 2. Medición de la actividad telomerasa de las células madre

##### 2.1 Metodología para la determinación de la actividad telomerasa:

La actividad telomerasa se cuantifica mediante el kit TeloTAGGG Telomerase PCR Elisa<sup>PLUS</sup> (Roche).

La cuantificación de la actividad telomerasa se lleva a cabo en dos etapas:

i) la primera etapa es una etapa de amplificación/elongación (o TRAP assay) en la que la telomerasa añade unidades teloméricas (TTAGGG) en el extremo 3' de un primer biotinilado.

ii) la segunda etapa es la detección y la cuantificación mediante Elisa.

Los productos PCR obtenidos en la etapa 1 son hibridados con un primer específico de los extremos teloméricos, marcado con digoxigenina. Además, las microplacas Elisa son tratadas con estreptavidina, lo que permite la inmovilización de los productos por medio de la biotina. Los amplicones inmovilizados son detectados con un anticuerpo anti-digoxigenina, conjugado con un anti-DIG-HRP y el sustrato peroxidasa TMB.

La intensidad de la reacción fotométrica se estima utilizando un lector de microplaca Elisa (absorbancia a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 690 nm).

Se calcula entonces la actividad telomerasa relativa de la muestra con respecto a la actividad telomerasa de un control positivo (células de la línea HEK293 para Human Embryonic Kidney 293)

##### 2.2 Resultados de la determinación de la actividad telomerasa:

Utilizando el kit "TeloTAGGG telomerase PCR Elisa Plus" comercializado por Roche, se ha cuantificado la actividad telomerasa presente en las 2 sub-poblaciones CA y CS de la primo2.

Una actividad telomerasa significativa se detecta en las células madre de la invención. Para Primo 2CA (T25: transferencia celular 25, que corresponde a aproximadamente 100 duplicaciones de la población), la actividad telomerasa es de aproximadamente un 20% en comparación con la actividad telomerasa de la línea humana transformada HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293* inmortalizado por Ag T). La línea HEK293T se utiliza en este kit como referencia.

A la inversa, no se ha detectado ninguna actividad telomerasa significativa en las células CS, por ejemplo las células de la primo 2 CS (T20) presentan una actividad de aproximadamente un 5% en comparación con la de las HEK293T.

#### 3. Cariotipo de las células madre

El cariotipo permite la observación y la clasificación de los cromosomas presentes durante la metafase.

##### 3.1 Metodología para la determinación del cariotipo:

Las metafases se obtienen utilizando las técnicas clásicas de citogenética. Después de la acumulación de las células en metafase por bloqueo del aparato fusorial (incubación en presencia de colchicina durante 3h), se procede a la dispersión cromosómica en el citoplasma por la acción de una solución hipotónica (75 mM KCl durante 40 min a

37°C) después a una fijación con metanol/ácido acético (3/1). Los cromosomas se identifican después mediante la técnica de las bandas R (RHG-banding techniques)

### 3.2 Resultados de la determinación del cariotipo:

Se ha realizado el cariotipo de las células. Se efectuaron estos cariotipos sobre las 2 sub-poblaciones CA y CS, en presencia o no de bFGF y en diferentes pasos (T21, T23 y T34 para primo2 CA).

En todos los casos, los cariotipos son totalmente normales. Las células no han sufrido por lo tanto ninguna reestructuración cromosómica. La Figura 4 muestra el cariotipo de las células de la Primo 2CA.

### 4. Plasticidad celular de las células madre

La plasticidad de las células madre se evalúa según las técnicas siguientes:

#### 4.1 Metodología para evaluar la plasticidad celular:

##### 4.1.1. Condiciones de diferenciación en diferentes tipos celulares:

Las células son tripsinadas y después inoculadas a 20000 células/cm<sup>2</sup>. Las células alcanzan la confluencia 24 a 48h después. Al ser la confluencia una etapa crítica para la diferenciación, las células son mantenidas en confluencia durante 24h suplementarias antes de proceder a la diferenciación (adipocitos, osteoblastos, miocitos).

##### i) Condiciones de diferenciación en adipocitos

Las células confluentes son incubadas en un medio DMEM/ Ham's F12 (vol/vol, 1:1) suplementado de 100U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 5 µg/ml de insulina humana (Sigma), 10 µg/ml de transferrina humana (Sigma), 1 µM de activador de PPAR (por ejemplo BRL49653), 100 a 250 µM de isobutil-metilxantina (IBMX) y 1 µM de dexametasona. Cuarenta y ocho a setenta y dos horas después, este medio se sustituye por el medio anteriormente descrito pero que no contiene ya IBMX y dexametasona. Este medio de diferenciación se sustituye cada 2-3 días, y esto durante un periodo de 15 a 20 días, que corresponde a una diferenciación adipocitaria óptima.

##### ii) Condiciones de diferenciación en osteoblastos

Las células que confluyen desde hace 24h se incuban con el medio de diferenciación osteoblástico compuesto de DMEM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomina, 10% de suero fetal de ternera descomplementado, 0,1 µM de dexametasona (SIGMA), 10 mM de β-glicerofosfato (SIGMA) y de 50 µM de ácido ascórbico (SIGMA).

El medio se sustituye cada 2-3 días, durante un periodo comprendido entre 15 y 20 días.

##### iii) Condiciones de diferenciación en miocitos

Las células que confluyen desde hace 24h, se incuban o bien en un medio DMEM, o bien en el medio PromoCell, en presencia del 2% de suero fetal de ternera descomplementado y de antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomina). El medio se sustituye cada 2-3 días durante 3 a 6 semanas, particularmente cada tres días, durante 21 días.

##### iv) Condiciones de diferenciación en células endoteliales

Las células son inoculadas a 20 000 /cm<sup>2</sup> en un medio DMEM que contiene 10 ng/ml de VEGF<sub>121</sub> humano (SIGMA). El medio de diferenciación se sustituye cada 2-3 días, durante 21 días.

#### 4.1.2 Coloraciones

##### i) Coloración Oil Red O (adipocitos: coloración de los lípidos intracelulares)

Después de la fijación en una solución PBS/0.25% glutaraldehído, las células se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución de Oil Red O 2% (peso/volumen). Después, las células se lavan y se conservan en glicerol al 70%.

##### ii) Coloración Alizarin Red (osteoblastos: Calcificación de la matriz extracelular)

Después de la fijación en una solución PBS/0,25% glutaraldehído, las células se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente con la solución Alizarin Red 1% (peso/volumen). Las células se lavan después con agua y se conservan en seco.

4.1.3. Análisis de transcripción

i) Extracción de ARN

5 Los ARN celulares son extraídos utilizando el Tri Reagent(Euromedex, Ref TR-118)

ii) Transferencia Northern

10 Se depositan 20 µg de ARN / pocillo sobre un gel de agarosa (1,2%)/MOPS (1X)/ formaldehído (1,1M). Después de la electroforesis en tampón de migración MOPS (1X), los ARN son transferidos en una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia).

15 La membrana se hibrida después en presencia de una sonda específica, marcada con <sup>32</sup>P [dCTP] con la ayuda del kit Rediprime TM II Random Prime Labelling system (Amersham Pharmacia).

iii) RT-PCR

La reacción de transcripción inversa PCR se ha realizado utilizando el kit OneStep RT-PCR de Qiagen.

20 4.1.4. Análisis de la expresión de marcadores intracelulares:

Esta técnica se ha utilizado para cuantificar el número de células de primo2 CA capaces de diferenciarse *in vitro* en miocitos. El marcador analizado es la miosina de las fibras musculares rápidas (fast twitch myosin o FT myosin), marcador tardío de la miogénesis.

25 Después del despegue de las células, estas se fijan en presencia de PBS/1% formaldehído durante 15 min a temperatura ambiente, después se permeabilizan con una solución de digitonina (10 µg/ml de PBS) durante 7 a 8 min a temperatura ambiente.

30 Se procede después al marcado con anticuerpo, siguiendo el protocolo descrito para la detección de los marcadores de superficie (véanse los Ejemplos 7 y 11 a continuación). El anticuerpo utilizado es un anticuerpo de ratón conjugado directamente con ficoeritrina y que reconoce la FT miosina humana.

35 4.1.5. Inmunohistoquímica

Las células se fijan con un 4% de paraformaldehído durante 10 min a temperatura ambiente. Cuando la proteína buscada es nuclear (como por ejemplo la miogenina), las células son permeabilizadas en presencia de PBS/0,1% Tritón X100 durante 10 min. Se procede después al bloqueo de la actividad peroxidasa endógena, incubando las células con un 3% de H2O2 durante 5min.

40 Las células son después incubadas con el anticuerpo primario entre 30 min y 1h a temperatura ambiente, después con el anticuerpo secundario (anti-espuma IgG acoplado con la peroxidasa (Vector Laboratories) o anti-goat IgG acoplado con la peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology).

45 Los anticuerpos primarios utilizados en nuestros experimentos, von Willebrand factor (vWF) (goat IgG, que reconocen al mismo tiempo el vWF humano, de rata y de ratón) (Santa Cruz Biotechnology) y miogenina (mouse anti human IgG) (Santa Cruz Biotechnology), se utilizaron al 1:100.

50 4.2 Resultados del análisis de la plasticidad celular

4.2.1. Plasticidad de las dos subpoblaciones celulares CA y CS con fases precoces

55 En fases precoces (por ejemplo T1, T5, T7, que corresponde a 3, 15 y 21 duplicaciones de la población, respectivamente), las poblaciones CA y CS presentan las mismas características en términos de plasticidad, morfología y proliferación.

i) Diferenciación en adipocitos

60 Los resultados para los experimentos que implican una coloración Oil Red O se ilustran en la Figura 5 (para Primo 2CA y Primo 2CS) y la Figura 14 para Primo 1CA (40 duplicaciones de la población), Primo 3CA (25 duplicaciones de la población) y Primo 6CA (25 duplicaciones de la población). Además, en la Figura 13 se ilustran unos adipocitos procedentes de Primo 1CA, Primo 3CA y Primo 6CA después de 50, 40 y 40 duplicaciones de la población, respectivamente. Una comparación de las Figuras 13 y 14 demuestra claramente que, cuanto más sea elevado el número de duplicaciones de la población, más homogénea es la diferenciación.

65

Un análisis por "transferencia Northern" (Figura 6) demuestra la expresión de transcripción de marcadores adipogénicos (aP2 y PPAR $\gamma$ 2) durante la diferenciación: CA T14 (42 duplicaciones de la población) y CS T16 (48 duplicaciones de la población).

5 ii) Diferenciación en osteoblastos

La Figura 7 ilustra la diferenciación de las células CS y CA en osteoblastos. Coloración Alizarin Red.

10 4.2.2. Evolución de la plasticidad celular con fases tardías

Las células de primo 2 CS, a partir de la transferencia 20 (que corresponde a aproximadamente 60 duplicaciones de la población) entran en senescencia. Pierden simultáneamente su potencial proliferativo y su capacidad de diferenciación.

15 Por el contrario, las células de la población CA, en la misma fase, se vuelven quiescentes. Proliferan en presencia de bFGF y conservan su plasticidad. Esta plasticidad permanece sin cambios en la transferencia 40 (que corresponde a aproximadamente 200 duplicaciones de la población). La Figura 8 ilustra la diferenciación adipocitaria y osteoblástica para Primo2 CA T30 (aproximadamente 130 duplicaciones de la población).

20 Se conserva también en la población CA, a unas fases tardías, la expresión de transcripción de los diferentes marcadores específicos, o bien de la diferenciación adipocitaria, o bien de la diferenciación osteoblástica. (Figura 9) Primo2 CA T32 (140 duplicaciones de la población).

25 4.2.3 - Capacidad de las células de primo2 CA para diferenciarse y células endoteliales *in vitro*

Las células de primo2 CA son capaces, en condiciones de cultivo apropiadas, de diferenciarse *in vitro*, después de 3 semanas aproximadamente, en miocitos y en células endoteliales.

30 i) Diferenciación miocitaria

Después de 4 días en presencia de medio de diferenciación en miocitos, las células de primo2 CA expresan unos marcadores precoces de la diferenciación miocitaria como la miogenina (marcado con inmunohistoquímica, véase la figura 21). Después de 7 días, ya no es detectable la expresión de miogenina.

35 Después de 21 días, un 95% de las células de primo2 cultivadas en este medio expresan un marcador tardío de la diferenciación miocitaria, a saber la miosina de las fibras musculares rápidas o Fast Twitch myosin (marcado intracelular y análisis con FACs, véase la figura 22).

40 ii) Diferenciación en células endoteliales

Contrariamente a las células adipocitarias, osteoblásticas y miocitarias que pertenecen al "Limb bud mesoderm", las células endoteliales derivan del mesodermo visceral.

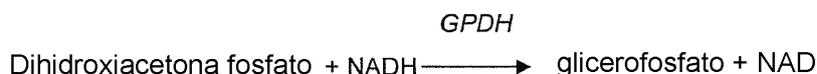
45 Después de 21 días de mantenimiento en un medio compuesto de DMEM y de hVEGF121 (10ng/ml), las células de primo2 CA expresan el factor de von Willebrand, marcador específico de las células endoteliales (inmunohistoquímica, véase la figura 23).

5. Caracterización de la funcionalidad adipocitaria por determinación enzimática

50 5.1 Metodología para caracterizar la funcionalidad adipocitaria

5.1.1 Medición de la actividad glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH)

55 Se procede, en primer lugar, a la lisis de las células de las cuales se desea medir la actividad GPDH. El principio de la determinación se resume en este esquema:



60 Se determina la velocidad inicial de desaparición del NADH a 340 nm (en presencia de NADH, DHAP y del lisado celular), lo que permite calcular la cantidad de sustrato degradado, dando como resultado la actividad enzimática específica (después de la determinación de las proteínas).

La lectura se realiza en un espectrofotómetro que permite realizar las cinéticas (KONTRON Uvicon 860 termostatado a 37°C).

5.9.2. Ensayo de lipólisis

Este ensayo consiste en medir el glicerol radiomarcado liberado por los adipocitos en presencia de agonistas de receptores adrenérgicos. El método utilizado es el descrito por Bradley DC y Kaslow HR (Anal Biochem, 1989, 180,11-16). El glicerol liberado está fosforilado en presencia de gliceroquinasa, y de ATP y de ATP marcado con P<sup>32</sup> en la posición  $\gamma$ . El ATP residual se hidroliza después en medio ácido a 90°C y se precipita con molibdato de amonio y de trietilamina. La radioactividad incorporada en forma de glicerofosfato marcado con P<sup>32</sup> se estima por recuento en un contador  $\beta$  y los valores son expresados en pmol gracias a una curva estándar.

5.2 Resultados de la caracterización de la funcionalidad adipocitaria

5.2.1. Actividad glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH)

Células primo2 CA (T24 en presencia de bFGF humano):

Después de 11 días de diferenciación (2 experimentos)

Control: 77 nmol/min/mg de proteína

En presencia de un agonista de PPAR $\gamma$  (BRL49653): 290nmol/min/mg de proteína

Después de 16 días de diferenciación (3 experimentos)

Control: 20 nmol/min/mg de proteína

En presencia de un agonista de PPAR $\gamma$  (BRL49653): 390 nmol/min/mg de proteína

Células primo2 CS (T22 en presencia de bFGF humano):

Después de 13 días de diferenciación (3 experimentos)

Control: 22 nmol/min/mg de proteína

En presencia de un agonista de PPAR $\gamma$  (BRL49653): 30 nmol/min/mg de proteína

5.2.2. Capacidad de lipólisis de las células de primo 2 CA

Se han realizado las lipólisis en células primo2 CA T32 con unos agonistas específicos de los diferentes receptores  $\beta$  adrenérgicos, a saber:

Isoproterenol:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 adrenérgico

Dobutamina:  $\beta$ 1 adrenérgico

Terbutalina:  $\beta$ 2 adrenérgico

CL316243  $\beta$ 3 adrenérgico:

Las velocidades de lipólisis obtenidas son las siguientes (según la curva estándar de glicerol):

Control: 5,76 nmol/h/mg de proteína

Dobutamina: 60,1 nmol/h/mg de proteína

Terbutalina: 93,78 nmol/h/mg: 60,1 nmol/h/mg de proteína

CL316243: 17,1 nmol/h/mg de proteína

Los resultados se ilustran en la Figura 10.

Los experimentos de lipólisis muestran la presencia de receptores  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 adrenérgicos, y la ausencia de receptores  $\beta$ 3 adrenérgicos, resultados de acuerdo con las observaciones *in vivo* (Galitzky *et al.*; (1997) British J. Pharmacol 122: 1244-1250).

6. Caracterización de la funcionalidad de los osteoblastos por detección del calcio asociado a la matriz extracelular

6.1 Metodología para la caracterización de la funcionalidad de los osteoblastos:

5 Para detectar el calcio segregado por los osteoblastos, las células se cultivan en el medio de diferenciación osteoblástica anteriormente descrito.

10 Después de la diferenciación óptima, el tapiz celular se lava con una solución 0.1 N NaOH durante 45 min. Después, se procede a una etapa de neutralización, añadiendo HCL 1 N (0,2 vol/ 1 vol NaOH). Las cajas, en las que queda todavía la matriz extracelular, se secan y después se incuban con la solución de "SIGMA calcium detection kit". La cantidad de calcio segregada por los osteoblastos se cuantifica por lectura de esta solución en el espectrofotómetro (DO575)

6.2. Resultados: Funcionalidad de los osteoblastos

15 La funcionalidad de los osteoblastos se ha demostrado mediante la técnica de detección del calcio asociado con la matriz extracelular (Figura 11).

20 Se puede también subrayar la importancia del lote de suero fetal de ternera en la diferenciación osteoblástica. Esto refleja el papel crucial en la diferenciación osteoblástica de algunas citoquinas, hormonas o factores de crecimiento no caracterizados y presentes en proporciones variables según los lotes de suero.

7. Marcado celular y análisis en citometría de flujo

25 Se ha puesto en evidencia el carácter HLA Clase I negativo de las células madre de la invención mediante el análisis en citometría de flujo, utilizando un sistema de simple marcado clásico:

7.1 Simple marcado

30 Las células se despegan y después se lavan en PBS. Después de la centrifugación, las células se resuspenden y se incuban con el anticuerpo primario a la concentración de 10 µg/ml durante 30 min a 4°C. Los anticuerpos utilizados son o bien un anticuerpo monoclonal de ratón, dirigido contra las moléculas HLA de clase I (W6/32, Novocastra), o bien un anticuerpo IgG de ratón (Santa Cruz) utilizado como control negativo. El número de células utilizadas por condición es de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$ . Las células empleadas para este análisis son las siguientes:

- HeLa: Células humanas tumorales (HLA Clase I positivo: control positivo).
- SVF: Tejido adiposo adulto, ninguna duplicación de la población (HLA Clase I positivo)
- Primo 2CA: 120 duplicaciones de la población
- Primo 2CS: 45 duplicaciones de la población

35 Después, las células se lavan y después se incuban durante 20 min a 4°C con un anticuerpo (denominado secundario) que es un anti-IgG de ratón acoplado al FITC ( $0.2\mu\text{g}/10^6$  células) (Caltag).

40 Después, las células se lavan y se analiza su fluorescencia por citometría en flujo (Scan FACS Becton Dickinson).

Los resultados son ilustrados en la Figura 15, y muestran que las células madre de la invención (por ejemplo Primo 2CA) presentan un nivel de expresión de moléculas HLA de Clase I no detectable por citometría de flujo de simple marcado. Las células madre de la invención son por lo tanto "HLA Clase I negativo".

45 Este experimento de citometría de flujo se ha realizado también con las células madre de Primo1CA y de Primo3CA, así como con las células de Primo 2CS (Figura 15). En todos los casos, el nivel de expresión de superficie de HLA Clase I es negativo.

8. Obtención de clones multipotentes a partir de las células CA

50 Se inocularon las células de Primo 2 CA en condición de dilución límite, a saber 1/3 de células por pocillos de placas de 24 pocillos, después se mantuvieron en presencia de un 10% FCS que contiene 5ng/ml bFGF.

55 Seis días después, se aislaron y amplificaron unos clones. Estos clones conservan su fenotipo no diferenciado hasta el acondicionamiento de diferenciación. Su capacidad de diferenciación en adipocitos y osteoblastos se pone entonces en evidencia.

60 La Figura 16 muestra dos clones, CA1 y CA3, puestos en el medio de cultivo que permite la diferenciación en adipocitos y en osteoblastos. Los adipocitos se revelaron mediante el colorante con aceite rojo, y los osteoblastos mediante el rojo Alizarin. Los clones analizados por citometría de flujo se revelan también HLA Clase I y II negativos

9. Expresión de un transgén en las células madre

5 Las células madre de la invención, en particular las células del clon CA1 (obtenido según el Ejemplo 7) se han transducido en la fase 21 duplicaciones de la población, por un retrovirus que expresa un gen de resistencia a un antibiótico, la puromicina, y el gen informador LacZ bajo el control de un promotor LTR.

10 Los viriones infecciosos son producidos a partir de células 293 transfectadas de manera estable con un vector PVPack-GP (que contiene las secuencias gag y pol), que se cotransfectan con el plásmido pFB-Neo-lacZ y el vector PVPack-VSVG expressing vector, que contiene la proteína G del virus de la estomatitis vesicular.

La figura 17 muestra que las células transducidas y después seleccionadas en presencia de puromicina expresan todas el gen LacZ revelado *in situ* por la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

15 10. Expresión de Oct-4, de ABCG2 y de Rex-1 en las células madre CA

Oct-4 es un factor de transcripción expresado específicamente en las células madre embrionarias de ratón y es indispensable para el mantenimiento de su pluripotencialidad. Se ha demostrado también que Oct-4 está expresado por las células madre embrionarias humanas.

20 La expresión transcripcional de Oct-4 se ha puesto en evidencia en las células madre de la invención. Los ARN se extraen a partir de las células CA (poblaciones homogéneas y poblaciones clonales) y se amplifica la expresión de Oct-4 est por RT-PCR, y después se detecta por hibridación. Las condiciones de PCR son: 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 1 min durante 45 ciclos. -RT: control negativo.

25 Asimismo, se ha puesto en evidencia la expresión transcripcional de ABCG2 en células CA (poblaciones homogéneas y poblaciones clonales). Los ARN se extraen a partir de células CA y CA1 y se amplifica la expresión de ABCG2 por RT-PCR, después se detecta por hibridación. Las condiciones de PCR para ABCG2 son: 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min durante 31 ciclos.

30 La Figura 18 muestra los resultados obtenidos con las células Primo 2CA de la transferencia 16 (48 duplicaciones de la población) y las células del clon Primo 2CA1 de la transferencia 5 (15 duplicaciones de la población). Expresan Oct-4 y ABCG2.

35 Las células primo 2 CA expresan también el factor de transcripción Rex-1 (figura 18, parte derecha). El factor de transcripción Rex-1 es un marcador específico de células madre embrionarias de ratón y humanas. Las condiciones de PCR para Rex-1 son las siguientes: 94°C 1 min., 60°C 1 min., 72°C 1 min., número de ciclos 31, 72° 5 min 1 ciclo.

40 11. Caracterización de las células CA de la invención en términos de marcadores de superficie

La caracterización de las células CA de la invención, particularmente las células de Primo 2CA, se ha profundizado en términos de marcadores de superficie, con la ayuda de la técnica de citometría de flujo.

45 11.1. Metodología para el análisis de la expresión de los marcadores de superficie por citometría de flujo:

El protocolo de marcado se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 7). Los anticuerpos utilizados en este contexto son los siguientes:

50 HLA de clase I conjugado con la fluoresceína (FITC);

HLA-DR (HLA clase II) conjugado con ficoeritrina (PE);

55 CD-3 (marcador de los linfocitos T) conjugado con PE;

CD13 (marcador de las células estromales de la médula ósea, células endoteliales, progenitoras precoces de los granulocitos/monocitos y de sus descendencias) conjugado con FITC

60 11.2 - Resultados de la caracterización de las células CA de la invención en términos de marcadores de superficie:

Las células de primo 2 CA son negativas en superficie para la expresión de CD3, de HLA clase I y de HLA-DR. Por el contrario, son CD13 positivas (marcador expresado, entre otros, en las células estromales de la médula ósea (véase la figura 20)

65 La ausencia en superficie de las moléculas HLA de clase I y II sugiere altamente la no inmunogenicidad de las células de primo2 CA.

Es interesante señalar que las células de primo 2 CA difieren de las células humanas de la médula ósea descrita por Reyes *et al.* (Blood, Noviembre de 2001).

5 Estas células denominadas MPC por "Mesodermal Progenitor Cells" son HLA clase I y clase II negativas y CD13 positivas únicamente cuando se cultivan a baja densidad, en un medio de cultivo que contiene una baja concentración de suero fetal de ternera (2%) con presencia obligatoria de EGF y de PDGF.

10 Por el contrario, cultivadas en presencia del 10% de suero fetal de ternera (concentración utilizada para amplificar las células de la invención, en particular las células de primo2 CA), las hMPCs presentan el fenotipo inverso, a saber HLA clase I y HLA-DR positivas y CD13 negativas. Las hMPCs cultivadas en presencia del 10% de suero fetal de ternera o de bFGF (FGF-2) pierden su potencial de proliferación muy rápidamente y mueren.

15 12. Diferenciación de las células madre CA de la invención en células endoteliales y en miocitos *in vivo*:

Se ha demostrado en el ejemplo 4 que las células de la invención son capaces de diferenciarse *in vitro*, después de tres semanas en células endoteliales y en miocitos.

20 Los ejemplos presentados a continuación demuestran que las células humanas CA de la invención (particularmente las células de Primo 2CA, de Primo 1CA y de Primo 3CA) inyectadas en el músculo de ratón mdx, modelo animal de las miopatías de Duchenne en el hombre, son capaces de regenerar unas fibras normales después de solamente 10 días. De manera sorprendente, estas células no son rechazadas cuando se trasplantan en estos ratones no inmunosuprimidos. Tales células, por su capacidad de regeneración *in vivo* y su ausencia de inmunogenicidad, ofrecen numerosas perspectivas terapéuticas en un contexto alogénico.

25 12.1 Protocolo de trasplante y análisis de la regeneración *in vivo* por inmunofluorescencia y FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

30 12.1.1. Protocolo de trasplante

Para analizar el potencial de regeneración *in vivo* de las células CA de la invención (más particularmente de las células primo2 CA, de Primo 1CA y de Primo 3CA), se ha utilizado el modelo animal, unos ratones mdx (C57BL/10ScSn DMD<sup>mdx</sup>/J).

35 Estos ratones mdx (X-chromosome-linked muscular dystrophy) constituyen un buen modelo para estudiar las miopatías de Duchenne en el ser humano, ya que presenta una mutación puntual del gen de la distrofina (localizado en el cromosoma X), lo que conlleva la no-traducción de la distrofina. En el ser humano, la ausencia de distrofina, proteína con un papel mal conocido, conlleva una cascada de eventos poco comprendidos en la actualidad, lo que provoca la desaparición progresiva de las fibras musculares y el fallecimiento.

40 Para los experimentos *in vivo* de regeneración muscular, se han utilizado las células siguientes:

\* unas células de primo 2 CA obtenidas entre 80 y 160 duplicaciones de la población (más precisamente 80, 120 y 160 duplicaciones de la población);

45 \* unas células de Primo 1CA obtenidas a 50 y a 120 duplicaciones de la población;

\* unas células de Primo 3CA a 45, a 80 y 110 duplicaciones de la población.

50 En todos los experimentos, se han utilizado unos ratones mdx de 3 a 4 meses de edad, de sexo indistintamente masculino o femenino.

55 El músculo tibial anterior izquierdo se trasplanta con 150 000 células de primo 2 CA, de Primo 1CA o de Primo 3CA, recogidas en un volumen de 50 µl de HBSS (Hank's Buffered Saline solution). Se inyecta el mismo volumen de HBSS en el músculo derecho que sirve de control negativo.

60 Para analizar el potencial de regeneración muscular de las células de la invención, se han tratado, en un primer tiempo, los ratones trasplantados con un agente inmunosupresor, la ciclosporina, para evitar el riesgo de rechazos inmunitarios. La administración de ciclosporina se realiza por vía intraperitoneal, una vez por día a la concentración de 10mg/kg (peso del animal)/día, a partir del trasplante.

Los ratones mdx trasplantados y tratados simultáneamente con ciclosporina son sacrificados después de 10 días.

65 En paralelo, para ensayar la no inmunogenicidad de las células de primo2 CA, de Primo 1CA o de Primo 3CA, los inventores han utilizado el mismo protocolo de trasplante pero sobre ratones mdx que tienen un sistema inmunitario normal, es decir no tratados con ciclosporina.

Los músculos son trasplantados, así como los músculos control (inyectados únicamente con 50 µl de HBSS), se recuperan y se congelan en isopentano y después en nitrógeno líquido.

5 12.1.2 Detección de la distrofina por inmunofluorescencia

Se preparan unos cortes seriados de 12 µm a partir de los músculos congelados y deshidratados mediante pasos sucesivos de 10 minutos en etanol al 50, 75 y 100%.

10 Para realizar el marcado con distrofina, los cortes congelados se fijan con metanol/ácido acético glacial (70/30, v/v) durante 15 min a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS (Phosphate-buffered Saline) y de la incubación durante 30 min. en una solución de bloqueo (PBS+3% BSA (Bovine Serum Albumine)), los cortes son incubados durante una hora con un anticuerpo específico de la distrofina humana (espuma anti-humano IgG2a, Novocastra NCL-DYS3), o un anticuerpo que reconoce al mismo tiempo la distrofina humana, de rata y de ratón (mouse IgG1 NCL-DYS2 Novocastra). Para reducir el ruido de fondo, el anticuerpo se acopla previamente con fluoresceína (Alexa Fluor 488), utilizando el "Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG2a o IgG1 Labeling Kit", según el anticuerpo (Molecular Probes).

20 Los recortes se lavan después con PBS y después con agua, y se analizan por microscopía de fluorescencia (Olympus BH2).

12.1.3. Detección de los núcleos humanos trasplantados por FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

25 Se deshidratan las láminas mediante pasos sucesivos de 2 min., en baños de etanol, a concentraciones crecientes (70, 80 y 100%), después se desnaturalizan a 73°C en una solución con el 70% de formamida/2XSSC (solución salina citratada) durante 2 min. 30s. Después, se rehidratan las láminas (baños de etanol de concentraciones decrecientes 100, 80 y 70%) antes de proceder a la hibridación.

30 La sonda utilizada para detectar los núcleos humanos es una sonda específica de todos los centrómeros humanos (α-satélite) acoplada a la digoxigenina (CP5095-DG.5, Appligene Oncor).

35 La sonda, previamente diluida en el tampón de hibridación Hybrisol VI (Appligène Oncor) (1 µl de sonda por 10 µl de tampón), se desnaturaliza durante 5 min a 72°C y después se deposita sobre las láminas. La etapa de hibridación se realiza a 37°C, en una cámara húmeda durante 12h.

Las láminas se lavan después: 1 lavado en un 50% de formamida/2XSSC a 43°C durante 15 min. seguido de un lavado en 2XSSC a 37°C durante 8 minutos.

40 La etapa ulterior es una etapa de detección, que consiste en la aplicación sobre las láminas de un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado con rodamina (Appligène Oncor) (5 min. en la oscuridad). Antes del análisis de los cortes, se procede a la coloración de la totalidad de los núcleos utilizando una solución de DAPI (coloración azul).

45 Después, se observan las láminas en microscopio de fluorescencia (Axiophot Zeiss) con una lámpara de 100 vatios y un sistema de filtros (Perceptive Scientific International).

12.1.4. Doble marcado inmunofluorescencia/FISH

50 Para poder co-localizar los huesos humanos con las fibras musculares que reexpresan la distrofina, los inventores han procedido a un doble marcado (distrofina/huesos humanos). Para hacer esto, la etapa de detección de la distrofina se efectuó antes de proceder al marcado de los huesos humanos por FISH.

12.2- Resultados: capacidad de regeneración muscular y no inmunogenicidad de las células CA de la invención *in vivo*:

55 12.2.1 Capacidad de regeneración muscular *in vivo*

60 Se han vuelto a cuestionar numerosos estudios que se refieren a la multipotencialidad de las células madre adultas *in vivo*, en particular después de la puesta en evidencia del poder de fusión de estas células (Terada *et al.*, Nature 2002; Wurmser *et al.*, Nature, 2002 y Ying *et al.*, Nature, 2002). Además, algunos trabajos sugieren que la capacidad de estas células para expresar unos marcadores específicos del tejido en el que están trasplantados, es un caso extremadamente raro (Wagers *et al.*, Science, 2002; Morshead *et al.*, Nature, 2002).

65 Para evitar los problemas evocados anteriormente, se han utilizado unos ratones mdx, modelo animal de las miopatías de Duchenne. Estos ratones son deficientes en distrofina (mutación puntual a nivel del gen) (En realidad, existe un número bajo de fibras inversoras que reexpresan la distrofina pero el porcentaje de estas fibras no supera el 1% (Hoffman *et al.*, J Neurol Sci, 1990; Gillis, J Muscle Research and Cell Motility, 1999)).

En primer lugar, para evitar cualquier fenómeno de rechazo, los ratones mdx se trataron con un agente inmunosupresor, la ciclosporina.

5 La inyección de un número bajo de células de primo2 CA (100 000 a 150000 células) en el músculo Tibial Anterior se traduce por una restauración de la distrofina en aproximadamente un 50% de las fibras, en sólo 10 días. Estas fibras positivas son agrupadas en forma de racimos (que corresponden probablemente al punto de inyección).

10 De acuerdo con los resultados anteriores, utilizando la técnica de FISH, se ha podido localizar los huesos humanos con las fibras musculares positivas de la distrofina (véanse las figuras 24 y 25).

Se obtienen unos resultados similares para unas células de primo 2 CA entre 60 y 160 duplicaciones de la población, tratadas previamente o no con bFGF (FGF-2). Se obtuvieron unos resultados similares con el clon CA1, derivado de la población primo2 CA.

15 12.2.2 No inmunogenicidad de las células CA *in vivo*:

Contrariamente a la mayoría de las células somáticas, las células CA de la invención están desprovistas de marcadores HLA clase-I (véase el Ejemplo 7) y de marcadores HLA Clase-II en superficie (Ejemplo 11). Este fenotipo extremadamente raro sugiere altamente la no inmunogenicidad de las células CA de la invención.

20 Para validar la no inmunogenicidad de estas células *in vivo*, se ha utilizado un enfoque experimental similar al descrito en la sección 12.2.1 pero utilizando unos ratones mdx no inmunosuprimidos.

25 Después de 10 días de trasplante, el músculo de los ratones trasplantados y no inmunosuprimidos reexpresan unos porcentajes de distrofina comparables a los de los ratones tratados con ciclosporina. Se constata un potencial de regeneración muscular, al mismo tiempo para las células de Primo 2CA, y para las células de Primo 1 CA y de Primo3CA, en ausencia de inmunosupresor (véase la Figura 24 para las células de Primo 2CA y la Figura 31 para las células de Primo 1 CA y de Primo 3CA).

30 Después de 50 días de trasplante, en ausencia de inmunosupresor, el número de fibras musculares positivas para la distrofina continúa aumentando en el tibial anterior inyectado, pero se encuentran unas fibras también en otros músculos como el gastrocnemio (véase la Figura 25). Estos resultados sugieren altamente que las células de primo2 CA son capaces, no sólo de regenerar el músculo en el punto de inyección, sino también migrar para reparar los músculos circundantes. Se observó un aumento del porcentaje de núcleos periféricos de origen humano en el interior de las fibras, y una disminución del porcentaje de núcleos centrales entre 10 y 50 días después del trasplante (del 73% al 85%, y del 27% al 15% respectivamente), lo que indica que las células inyectadas participan en la diferenciación terminal de los miocitos.

40 Con la ayuda de la técnica de FISH, los huesos están todavía presentes y co-localizados con las fibras distrofina-positivas. Además, la localización de un cierto número de huesos humanos en la periferia externa de las fibras sugieren la presencia de células satélites humanas y/o de células endoteliales de origen humano.

45 En comparación, el trasplante en gran cantidad de mioblastos humanos (4 millones) en ratones mdx no inmunosuprimidos se traduce por un rechazo total después de un mes (Huard *et al.*, Muscle and Nerve, 1994) y por lo tanto la ausencia de regeneración muscular.

50 Después de 80 días de trasplante, el número de fibras musculares positivas para la distrofina sigue aumentando en el músculo inyectado, y se encuentran unas fibras todavía en el gastrocnemio (véase la Figura 26).

55 Después de 6 meses de trasplante, más del 80% de las fibras expresan la distrofina humana, frente al 50% con tiempos de trasplante más precoces (Figura 27). Además, se constata también dentro de la fibra una expresión mucho más regular de la distrofina, en comparación con tiempos más precoces de trasplante, en los que la expresión de la distrofina es irregular dentro de la misma fibra. Además, el músculo trasplantado presenta una mejora clara a nivel de la morfología de las fibras (morfología de las fibras más regular y ausencia de necrosis, proceso importante en los ratones mdx de esta edad).

60 Estas observaciones indican que las células trasplantadas no dan lugar a ninguna reacción de rechazo en el ratón inmunocompetente. En efecto, el carácter no inmunógeno de las células trasplantadas se ha demostrado con la ayuda de una coloración con hematoxilina. No se observa ninguna reacción de rechazo (ausencia de infiltración por los linfocitos T CD3+) después de 10 días, (Figura 29), 50 días, 80 días (resultados no ilustrados), o después de 6 meses de trasplante de células de Primo 2CA (véase la Figura 30). Asimismo, la ausencia de infiltración linfocitaria puede también ser constatada 10 días después del trasplante de las células de primo 1CA y de Primo 3CA, lo que confirma la ausencia de reacción de rechazo. La Figura 32 ilustra los resultados obtenidos con las células de Primo 3CA. Se han obtenido los mismos resultados con las células de Primo 1CA. El comportamiento inmunoprivilegiado

de las células de primo 1CA y de Primo 3CA es por lo tanto idéntico al observado en Primo 2CA. Estos resultados se confirmaron también utilizando un anticuerpo anti-CD-3, que demuestra la ausencia de infiltración linfocitaria.

5 Por el contrario, el trasplante de células estromales-vasculares humanas no purificadas, aisladas a partir de tejido adiposo humano induce una reacción inmunitaria citotóxica y humoral (figuras 29(c) y (c')).

10 En conclusión, después de seis meses del trasplante, las células conllevan una clara mejora del músculo trasplantado con un fuerte porcentaje de fibras que expresan la distrofina humana y una ausencia del proceso de necrosis que se observa en los ratones mdx no tratados de misma edad, en ausencia de inmunosupresor.

15 El origen humano de la distrofina expresada en las miofibras del músculo trasplantado se ha demostrado mediante inmunodetección comparativa, utilizado por un lado un anticuerpo específico para la distrofina humana (dirigido contra el extremo N-terminal de la distrofina humana: mouse anti-human IgG2a: NCL-DYS3 de Novocastra), y por otro lado un anticuerpo capaz de reconocer al mismo tiempo la distrofina humana y la distrofina murina (dirigido contra el extremo C-terminal de la distrofina humana y murina: mouse anti-human IgG1: NCL-DYS2 de Novocastra).

20 Los resultados de esta inmunodetección comparativa se ilustran en la figura 28. La presencia de miofibras que expresan la distrofina, y la localización subcelular en el tibial anterior 10 días después del trasplante es visible. La similitud entre las figuras 28(a) y (b) indica el origen humano de la distrofina expresada. La distrofina humana está localizada debajo de la sarcolema. Sin embargo, el colágeno III de ratón está presente en el espacio extracelular entre las miofibras (figuras 28(c) a (e)).

25 Los mecanismos implicados en la tolerancia de las células CA de la invención, en un contexto xenogénico, es decir en un organismo inmunológicamente muy diferente (ratón mdx), sigue estando por elucidar.

30 Sin embargo, se puede suponer que un cierto número de células situadas en la periferia externa de las fibras musculares desempeñan un papel clave en esta tolerancia. Estas células pueden tener un papel de inmunosupresión local sintetizando unos factores inmunosupresivos como, por ejemplo, unas citoquinas anti-inflamatorias de tipo Th2 como la IL10 y/o que expresan en su superficie unas proteínas que conducen a la ausencia de reconocimiento por los linfocitos alo-reactivos del hospedante (Jorgensen *et al.*, Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy, Gene Therapy 10, 928-931 (2003)).

35 Estas células pueden también inducir una tolerancia generalizada permitiendo una reeducación del sistema inmunitario del hospedante. La presencia de células madre CA humanas en el timo y el hígado del hospedante refuerza esta hipótesis (Fändrich F *et al.*, "Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning", Nat. Med 8, 171-178 (2002).

40 Estos resultados demuestran el inmunoprivilegio de las células humanas CA de la invención que son capaces de regenerar el músculo sin ser rechazadas. Estas células ofrecen así numerosas perspectivas de terapias celulares en alotrasplante. En particular para las enfermedades genéticas como las miopatías en las que los autotrasplantes son imposibles, la utilización de células similares a primo2CA constituye una buena alternativa terapéutica.

**REIVINDICACIONES**

1. Célula madre humana multipotente y adulta aislada, caracterizada por que presenta:

- 5 i) una actividad telomerasa endógena de al menos un 20% de la actividad telomerasa de la línea humana transformada HEK293T,
- ii) un fenotipo HLA Clase I negativo, incluso en presencia del 10% de suero fetal de ternero,
- 10 iii) un cariotipo normal,
- iv) una capacidad para entrar en quiescencia después de 50 a 80 duplicaciones de la población,
- 15 v) una capacidad de auto-renovación conservada durante al menos 130 duplicaciones de la población, y
- vi) un porcentaje de senescencia inferior al 0,05% en la fase de 60 duplicaciones de la población.

2. Célula madre según la reivindicación 1, caracterizada por que tiene una capacidad de auto-renovación conservada durante la menos 200 duplicaciones de la población.

20 3. Célula madre según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que es susceptible de ser aislada a partir de tejido adiposo humano.

25 4. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que es capaz de diferenciarse en célula de origen endodérmico o ectodérmico o mesodérmico.

5. Célula madre según la reivindicación 4, caracterizada por que es capaz de diferenciarse en adipocito, en osteoblasto, en miocito, en condrocito o en célula endotelial.

30 6. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que expresa el factor de transcripción Oct-4, y/o Rex-1.

7. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que puede expresar al menos un transgén.

35 8. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que presenta el siguiente fenotipo:

- 40 HLA clase I negativo
- HLA clase II negativo
- CD3 negativo
- CD13 negativo

9. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que presenta un fenotipo CD13 positivo en presencia del 10% de suero fetal de ternera.

45 10. Célula según la reivindicación 8, caracterizada por que después de alcanzar la quiescencia, presenta, de manera estable, el fenotipo siguiente *in vitro*:

- 50 HLA clase I negativo,
- HLA clase II negativo,
- CD3 negativo,
- CD13 positivo,
- LIF-R negativo,
- Oct-4 positivo,
- 55 Rex-1 positivo, y
- ABCG2 positivo.

11. Célula según la reivindicación 10, caracterizada por que presenta *in vivo* una capacidad a migrar al estado no diferenciado, y no da lugar a una reacción de rechazo más de 10 días después del trasplante en un mamífero inmunocompetente.

60

12. Procedimiento para obtener células madre humanas multipotentes, que comprende las etapas siguientes:

- puesta en cultivo unas células que provienen de una extracción de tejido adiposo humano,

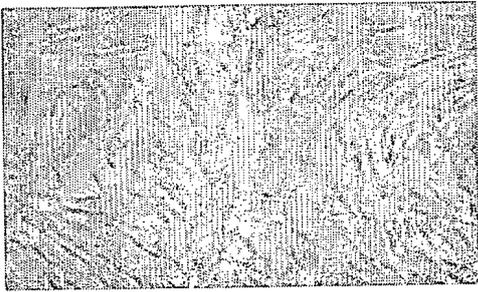
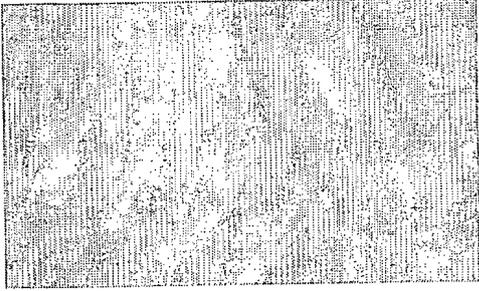
65

- selección de dos sub-poblaciones celulares, denominadas población "CA" y población "CS", presentando la población "CA" una velocidad de adhesión inferior a 12 horas, y presentando la población "CS" una velocidad de adhesión superior a 12 horas,
- 5 - enriquecimiento de la población "CA" hasta la obtención de una población de células quiescentes,
- inducción de una proliferación de las células madre de la población "CA".
- 10 13. Procedimiento según la reivindicación 12, que comprende las etapas siguientes:
- a) digestión enzimática de una muestra de tejido adiposo humano que proviene de un niño sano de menos de 10 años,
- 15 b) recuperación de una fracción celular desprovista de adipocitos, que contiene todos los tipos celulares presentes en la preparación obtenida según (a), con la excepción de los adipocitos,
- c) cultivo *in vitro* durante al menos 12 horas de la fracción celular obtenida según la etapa (b),
- 20 d) selección de las dos subpoblaciones celulares denominadas "CA" y "CS", presentando la población "CA" una velocidad de adhesión inferior a 12 horas, y presentando la población "CS" una velocidad de adhesión superior a 12 horas,
- e) enriquecimiento de la población "CA" hasta obtener una población de células capaces de entrar en un estado de quiescencia,
- 25 f) inducción de una proliferación de las células madre de la población "CA".
14. Procedimiento según la reivindicación 12 o 13, caracterizado por que la muestra de tejido adiposo es una muestra de tejido extramedular que proviene, por ejemplo, de la región umbilical o de la región púbica o de la región inguinal o de la región perineal o de la región abdominal, o de la región subcutánea.
- 30 15. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la proliferación inducida según la etapa (f) es una proliferación intensiva inducida por adición del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).
- 35 16. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la digestión enzimática según la etapa (a) se efectúa por la puesta en contacto de la muestra de tejido adiposo con una preparación de colagenasa durante un tiempo máximo de 10 minutos.
- 40 17. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la fracción celular desprovista de adipocitos se obtiene mediante la realización de una etapa de eliminación de los adipocitos, por ejemplo por centrifugación.
18. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la fracción celular puesta en cultivo según la etapa (c) no sufre ninguna etapa de filtración antes de ser cultivada.
- 45 19. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que la etapa de cultivo (c) se efectúa en un medio de cultivo adicionado de suero fetal de ternera sin adición de otros factores de crecimiento.
20. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que, durante la etapa de cultivo (e), se efectúa una transferencia celular cuando las células llegan al 80% de confluencia, siendo la transferencia efectuada a una densidad de inoculación de aproximadamente 1000 a 3500 células/cm<sup>2</sup>.
- 50 21. Procedimiento según la reivindicación 12 o 13, caracterizado por que la población "CA" se vuelve quiescente después de aproximadamente 60 duplicaciones de la población.
- 55 22. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que comprende además una etapa de obtención de una población clonal a partir de una célula madre aislada a partir de la población "CA" obtenida después de la inducción de la proliferación de las células madre.
23. Población de células madre susceptible de ser obtenida mediante la realización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22.
- 60 24. Población de células según la reivindicación 23 caracterizada por que es clonal.
25. Población de células según la reivindicación 23 o 24, caracterizada por que es capaz de proliferar en presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).
- 65

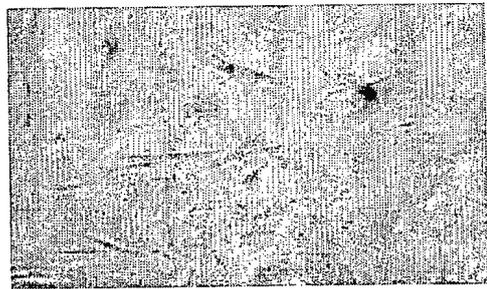
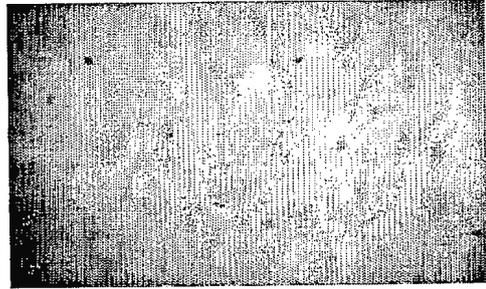
26. Células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, para una utilización en terapia.
- 5 27. Células madre o población de células madre según la reivindicación 26, caracterizada por que la terapia comprende el trasplante de células en un individuo, seguida de la diferenciación de las células y la regeneración de tejido *in vivo*.
- 10 28. Células madre o población de células madre según la reivindicación 27, caracterizadas por que el trasplante es alogénico.
- 15 29. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o población de células según la reivindicación 23 o 25, para una utilización en un método para la regeneración de tejidos óseos, adiposos, musculares o endoteliales *in vivo*.
- 20 30. Procedimiento para la producción de células diferenciadas del linaje mesodérmico, caracterizado por que se cultivan unas células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, a partir de la confluencia, en presencia de un medio de diferenciación.
31. Procedimiento según la reivindicación 30, caracterizado por que las células madre se inoculan a una densidad de aproximadamente 10 000 a 25 000 células/cm<sup>2</sup>.
32. Procedimiento según la reivindicación 30 o 31, caracterizado por que el medio de cultivo es un medio que permite la diferenciación en adipocitos.
- 25 33. Procedimiento según la reivindicación 30 o 31, caracterizado por que el medio de cultivo es un medio que permite la diferenciación en osteoblastos.
- 30 34. Procedimiento según la reivindicación 30 o 31, caracterizado por que el medio de cultivo es un medio que permite la diferenciación en miocitos, o un medio angiogénico.
- 35 35. Procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de modular la diferenciación de células en células del linaje mesodérmico, caracterizado por:
- a) la puesta en cultivo de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en condiciones que permiten su diferenciación en células del linaje mesodérmico, en presencia de un agente candidato,
- b) comparación de la diferenciación de las células en presencia del agente candidato con la diferenciación en ausencia del agente candidato.
- 40 36. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por que las condiciones de cultivo permiten la diferenciación en adipocitos.
- 45 37. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por que las condiciones de cultivo permiten la diferenciación en osteoblastos.
38. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por que las condiciones de cultivo permiten la diferenciación en miocitos.
- 50 39. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado por que el agente susceptible de modular la diferenciación es una sustancia anti-diferenciadora.
- 55 40. Procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de presentar una actividad lipolítica, caracterizado por:
- a) puesta en cultivo de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en condiciones que permiten su diferenciación en adipocitos,
- 60 b) puesta en contacto de los adipocitos así obtenidos, con un agente candidato,
- c) evaluación de la actividad lipolítica del agente candidato.
- 65 41. Procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de presentar una actividad anti-lipolítica, caracterizado por:

- a) puesta en cultivo de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en condiciones que permiten su diferenciación en adipocitos,
- 5 b) puesta en contacto de los adipocitos así obtenidos, con un agente candidato, en presencia de un agente lipolítico,
- c) evaluación de la actividad anti-lipolítica del agente candidato.
- 10 42. Procedimiento de cribado que permite identificar unos agentes susceptibles de presentar una actividad insulino-sensibilizante, caracterizado por:
- a) puesta en cultivo de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en condiciones que permiten su diferenciación en adipocitos,
- 15 b) puesta en contacto de los adipocitos así obtenidos, con un agente candidato,
- c) evaluación de la actividad insulino-sensibilizante del agente candidato.
- 20 43. Utilización de las células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en cosmética.
- 25 44. Composición cosmética que comprende una pluralidad de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en asociación con un excipiente, vehículo, disolvente, colorante, perfume, antibiótico u otros aditivos aceptables en los productos cosméticos.
- 30 45. Composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o de una población de células madre según la reivindicación 23, 24 o 25, en asociación con un excipiente aceptable desde el punto de vista fisiológico.

**CA**  
**T20**



**CS**  
**T20**



**FIGURA 1**

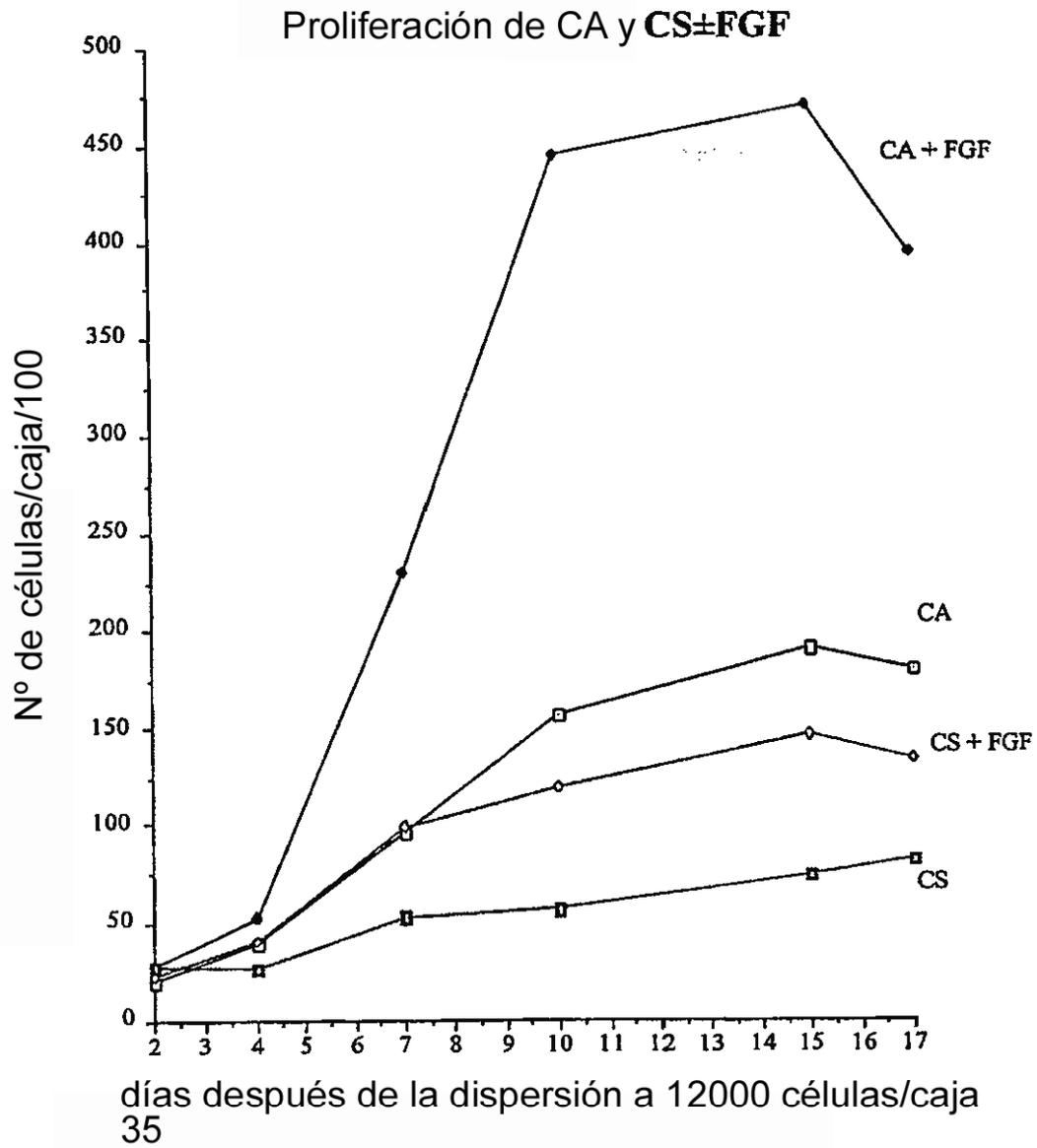


FIGURA 2

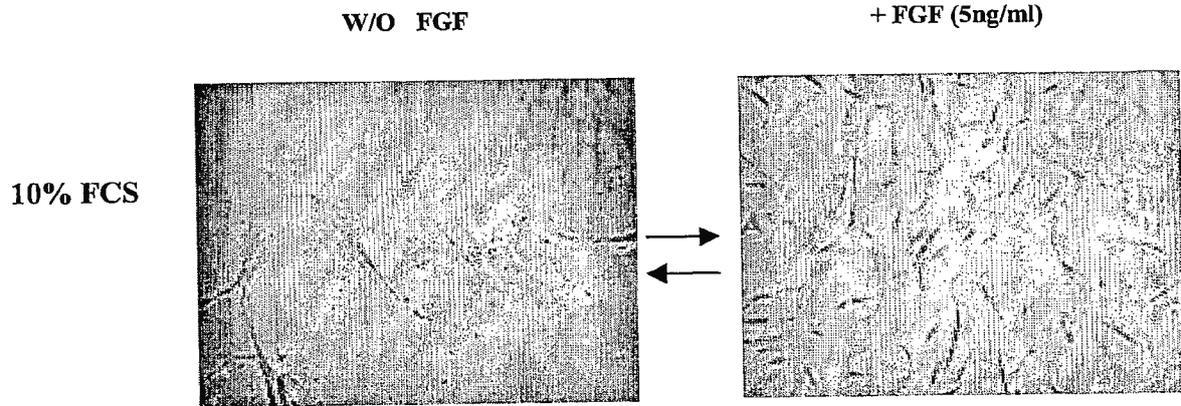


FIGURA 3

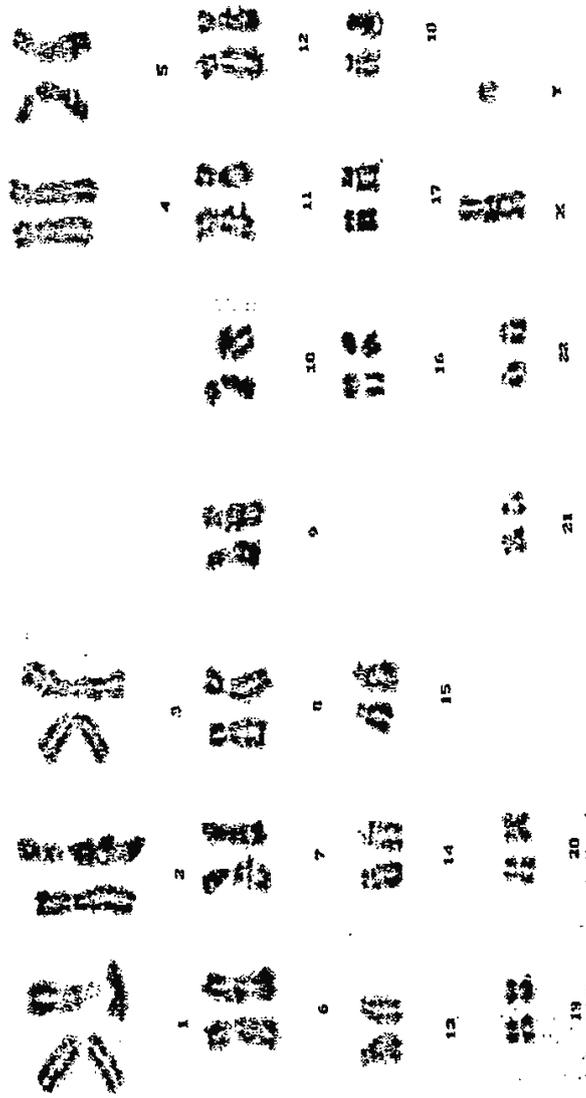
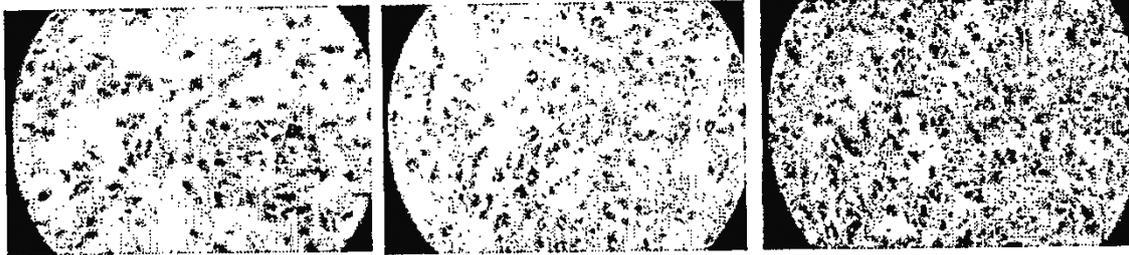


FIGURA 4



**CS T1**

**CST7**

**CA T5**

**FIGURA 5**

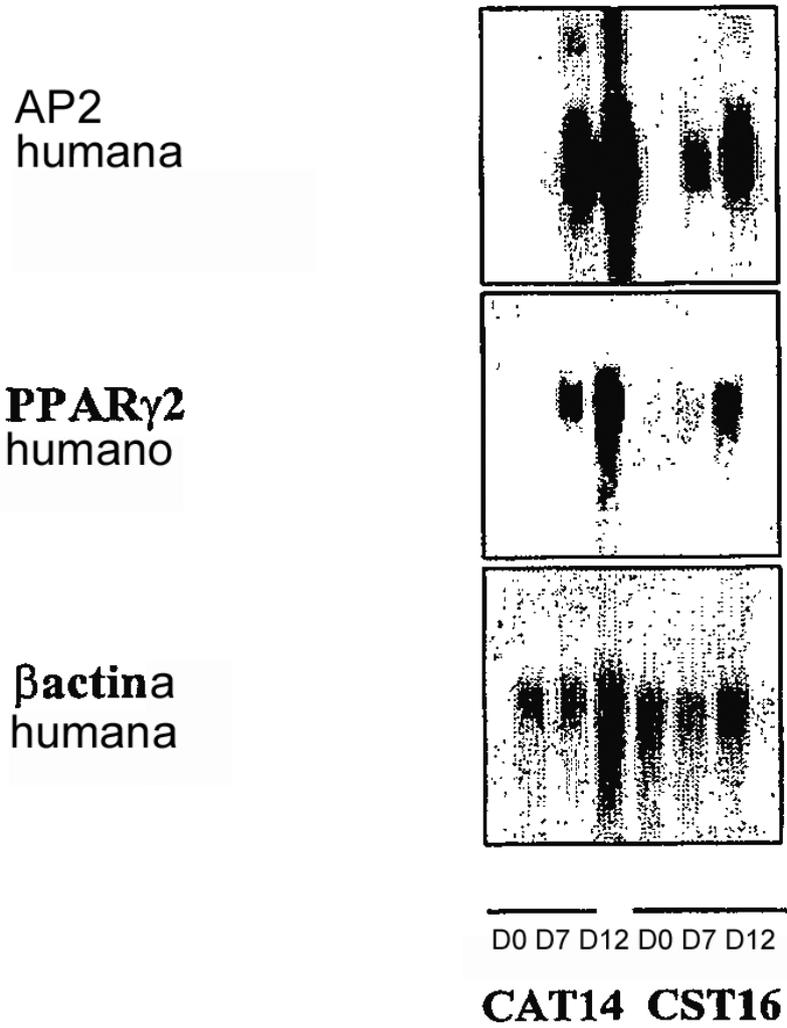


FIGURA 6

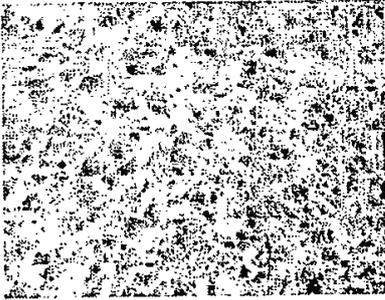


**CS T1**

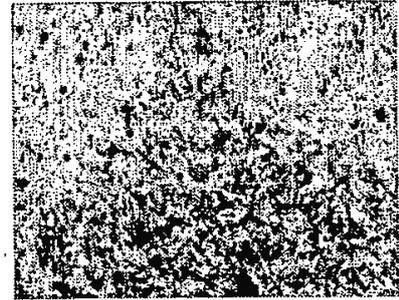
**CST7**

**CA T5**

**FIGURA 7**



A



B

FIGURA 8

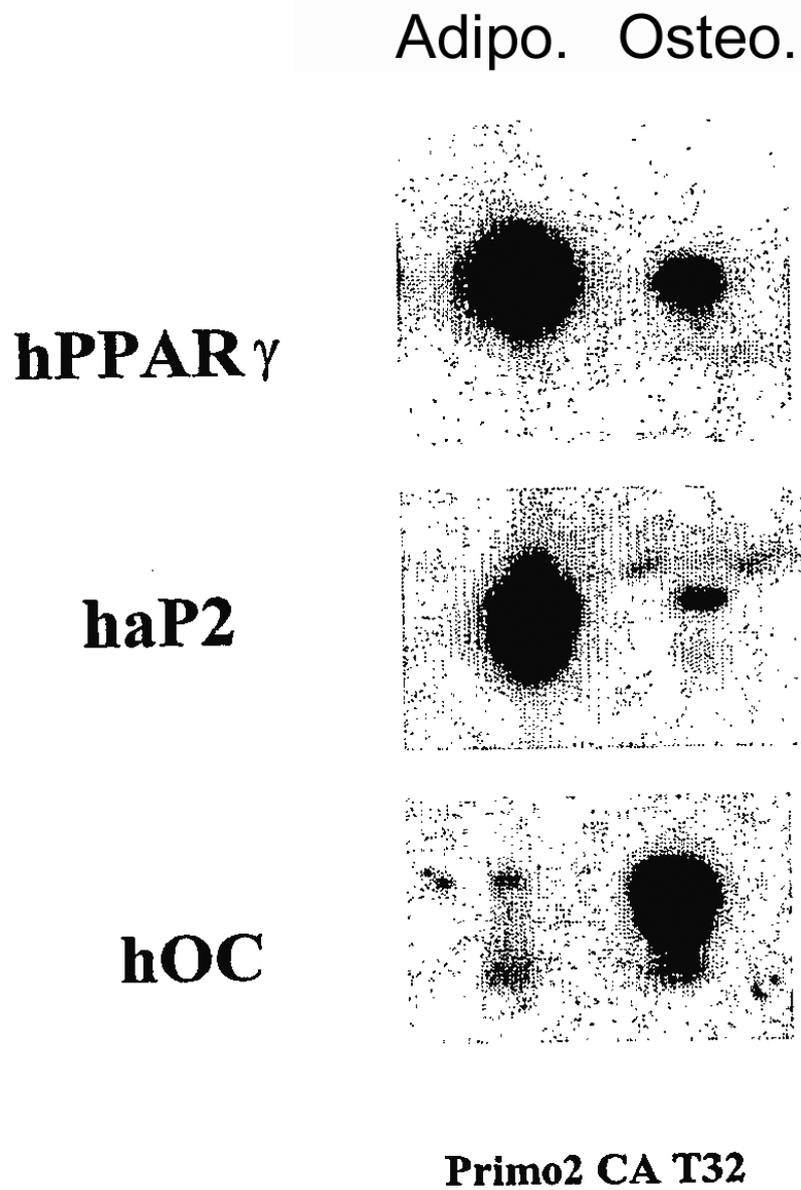


FIGURA 9

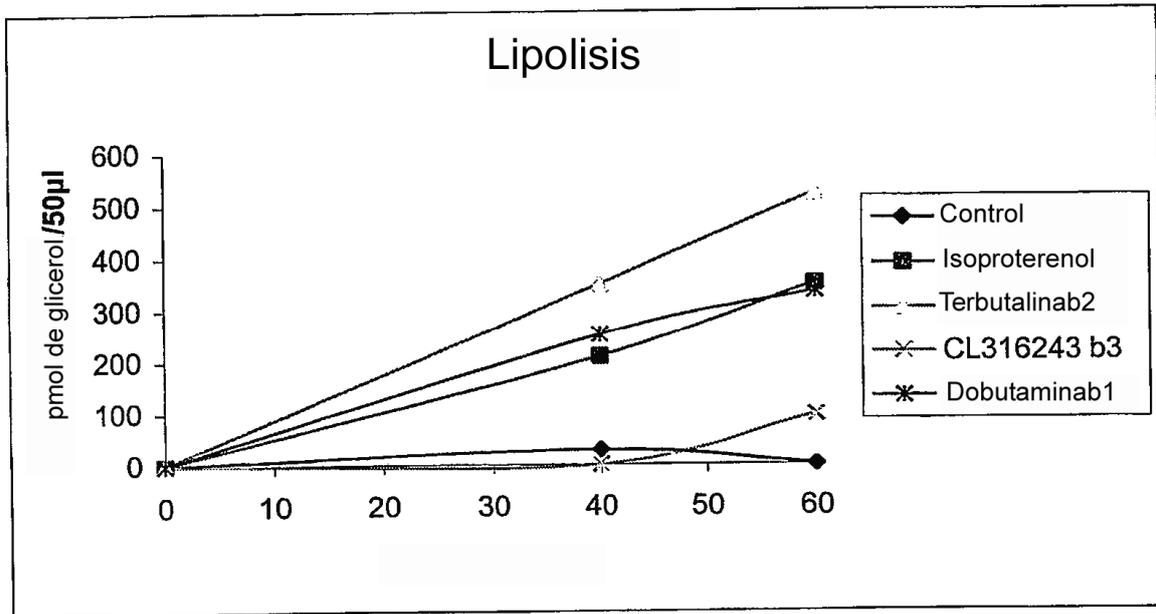
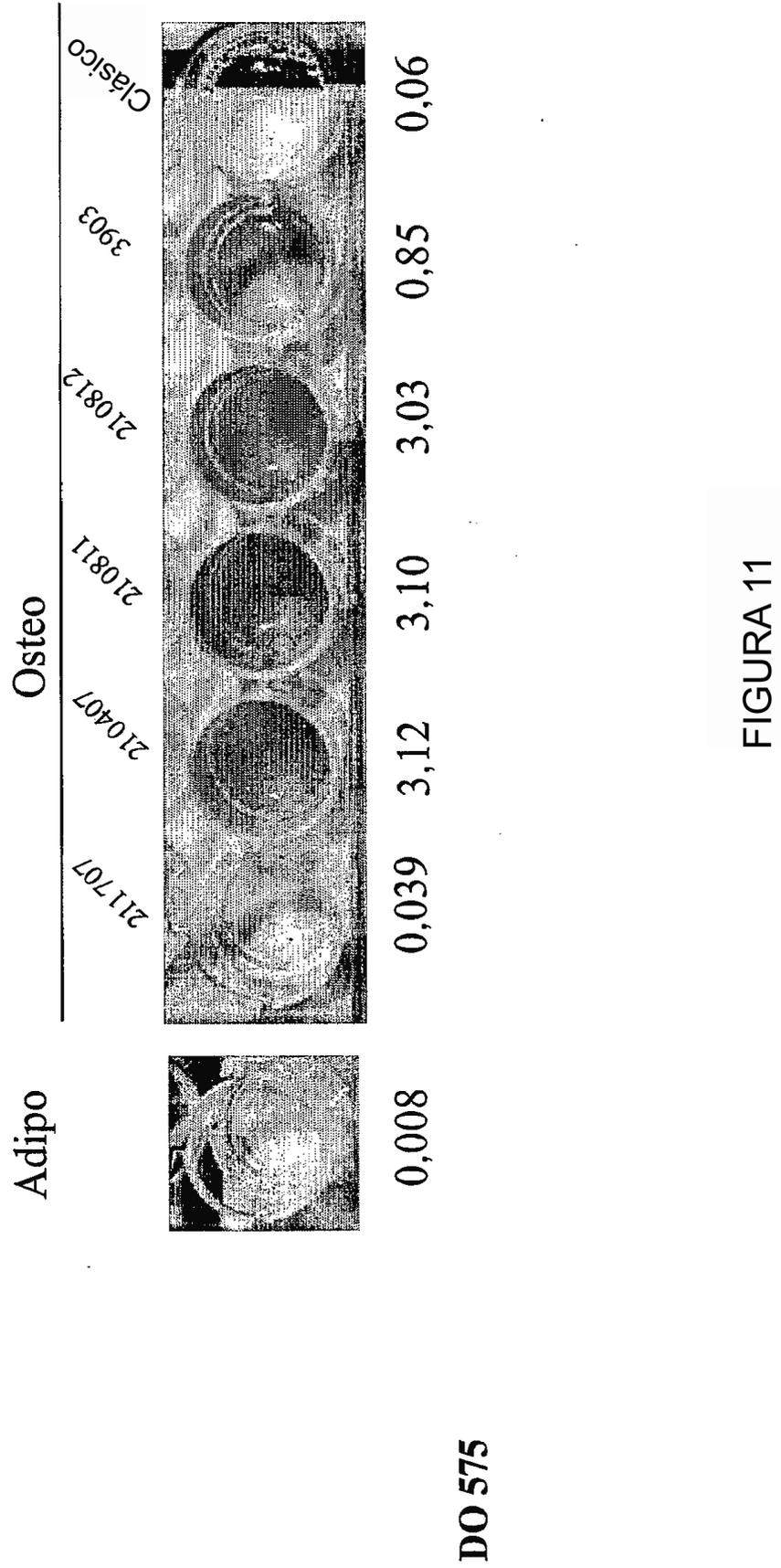


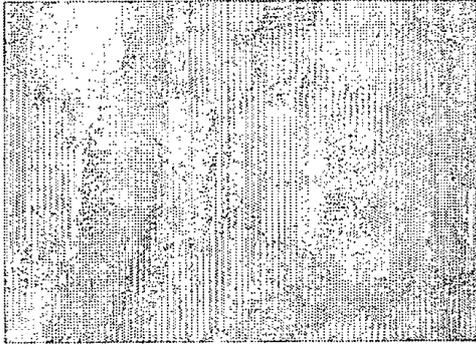
FIGURA 10



DO 575

FIGURA 11

A



B



C



D

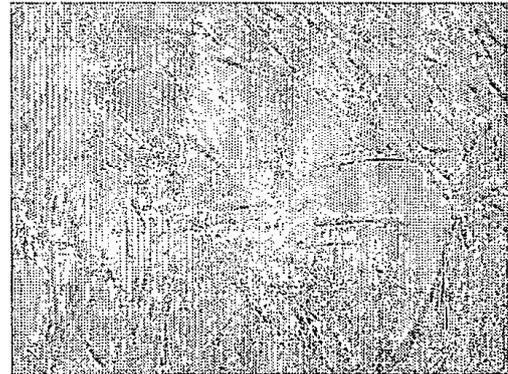


FIGURA 12



FIGURA 13

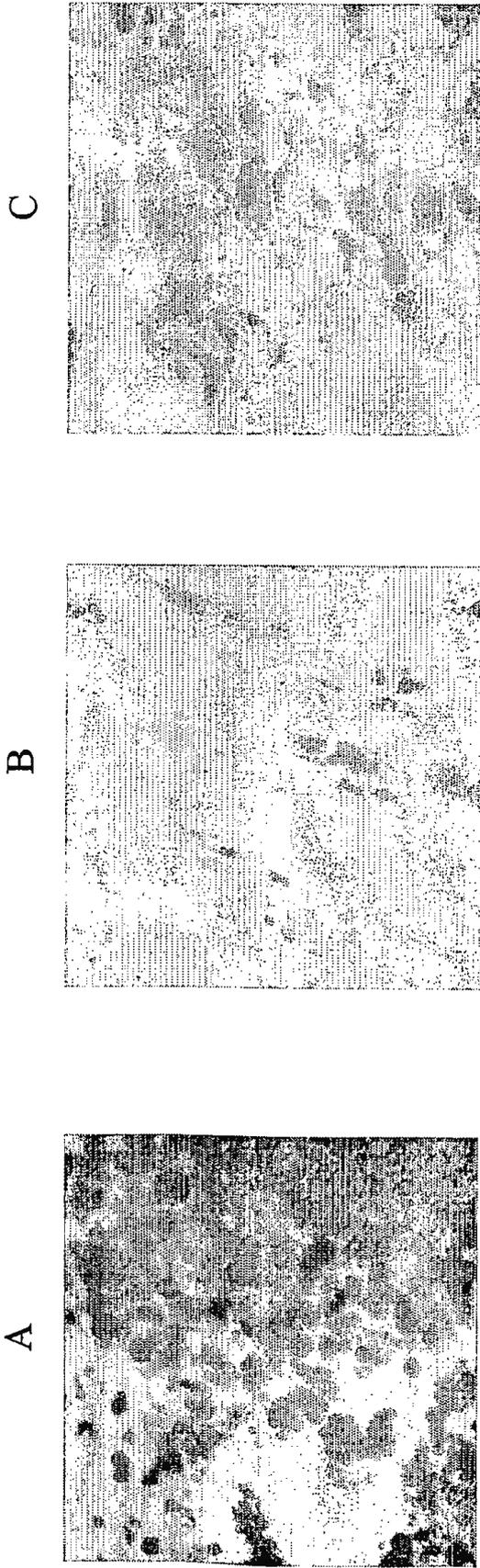
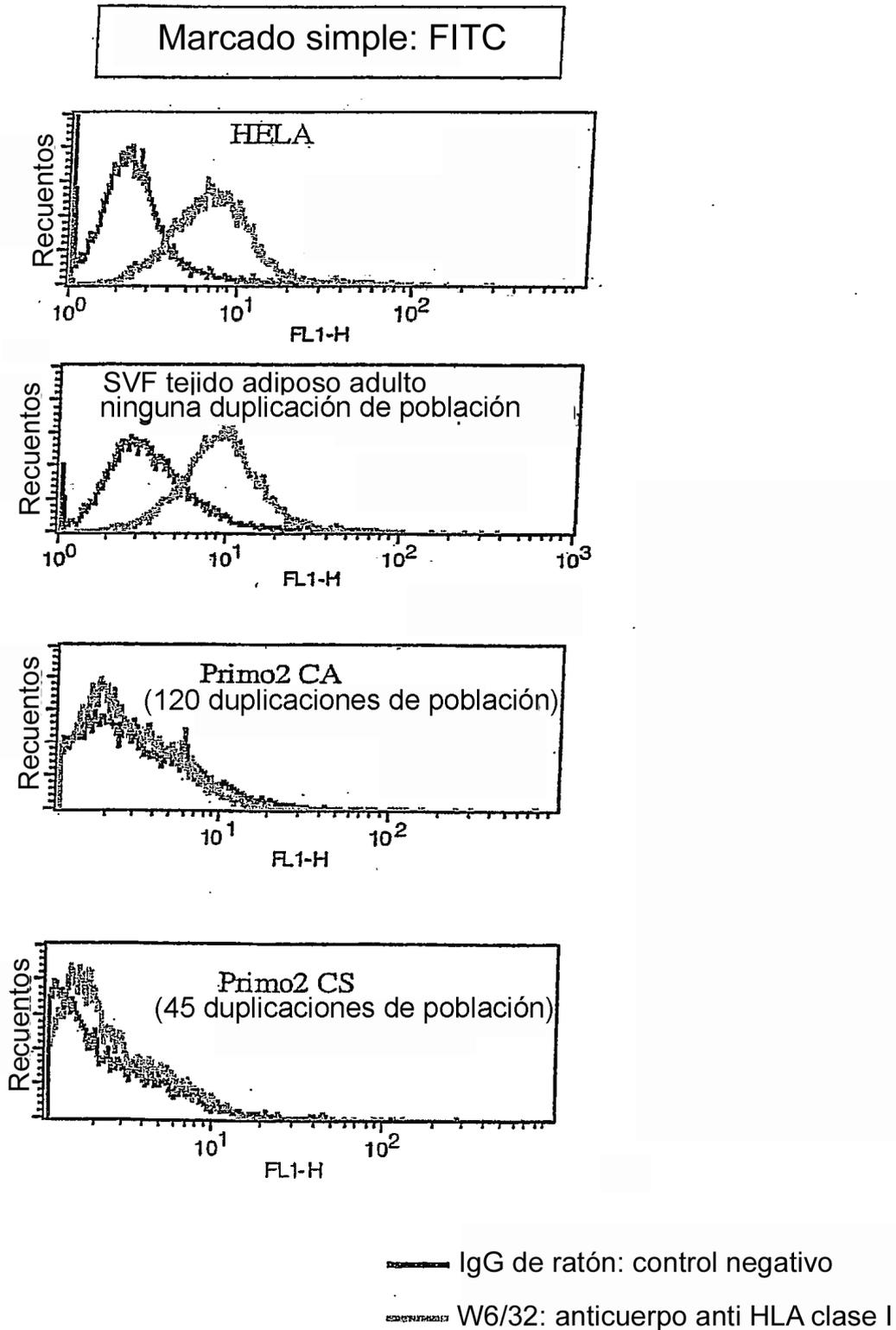


FIGURA 14

FIGURA 15



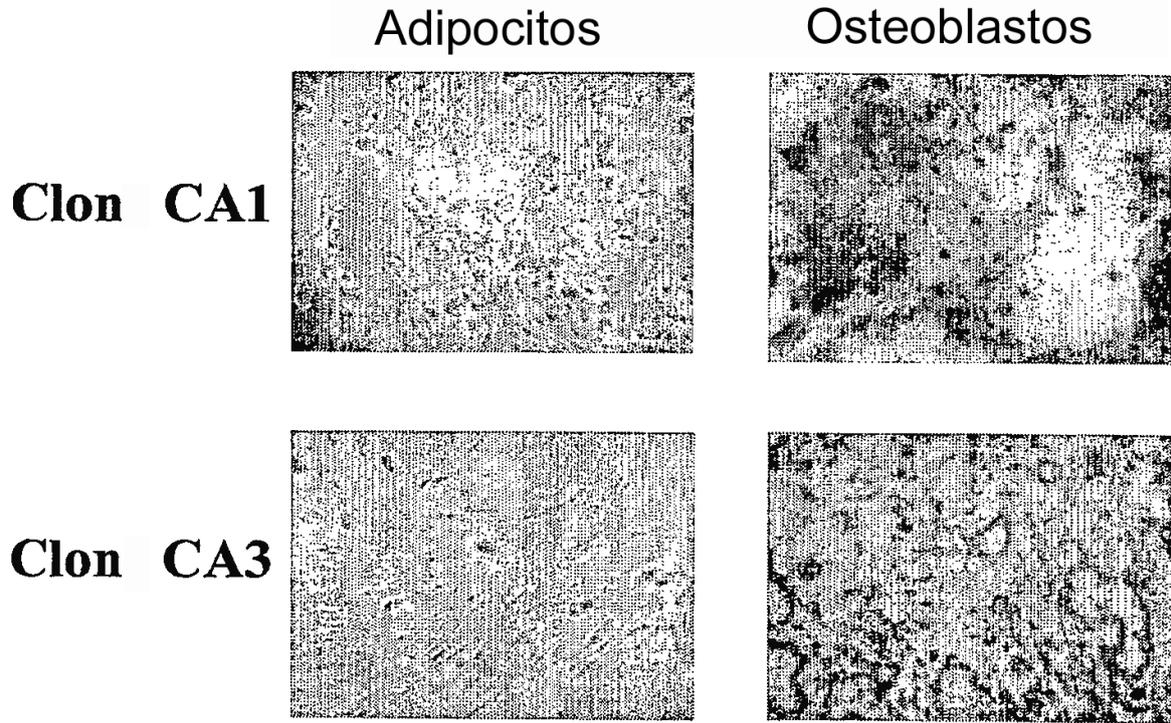


FIGURA 16

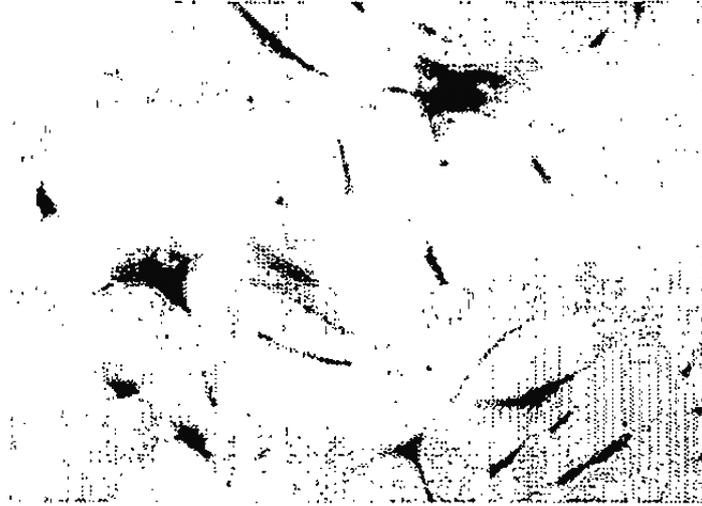
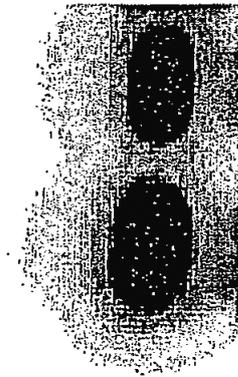


FIGURA 17

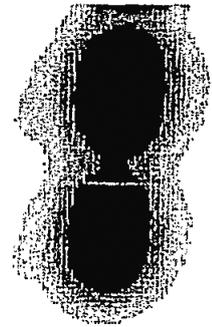
FIGURA 18

-RT  
CA  
CA1

Oct-4

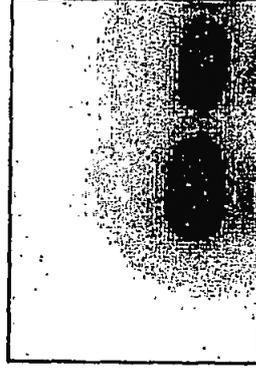


ABCG2

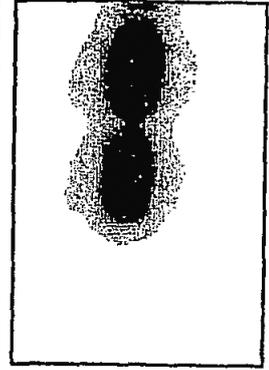


1 2 3

Oct-4



Rex-1



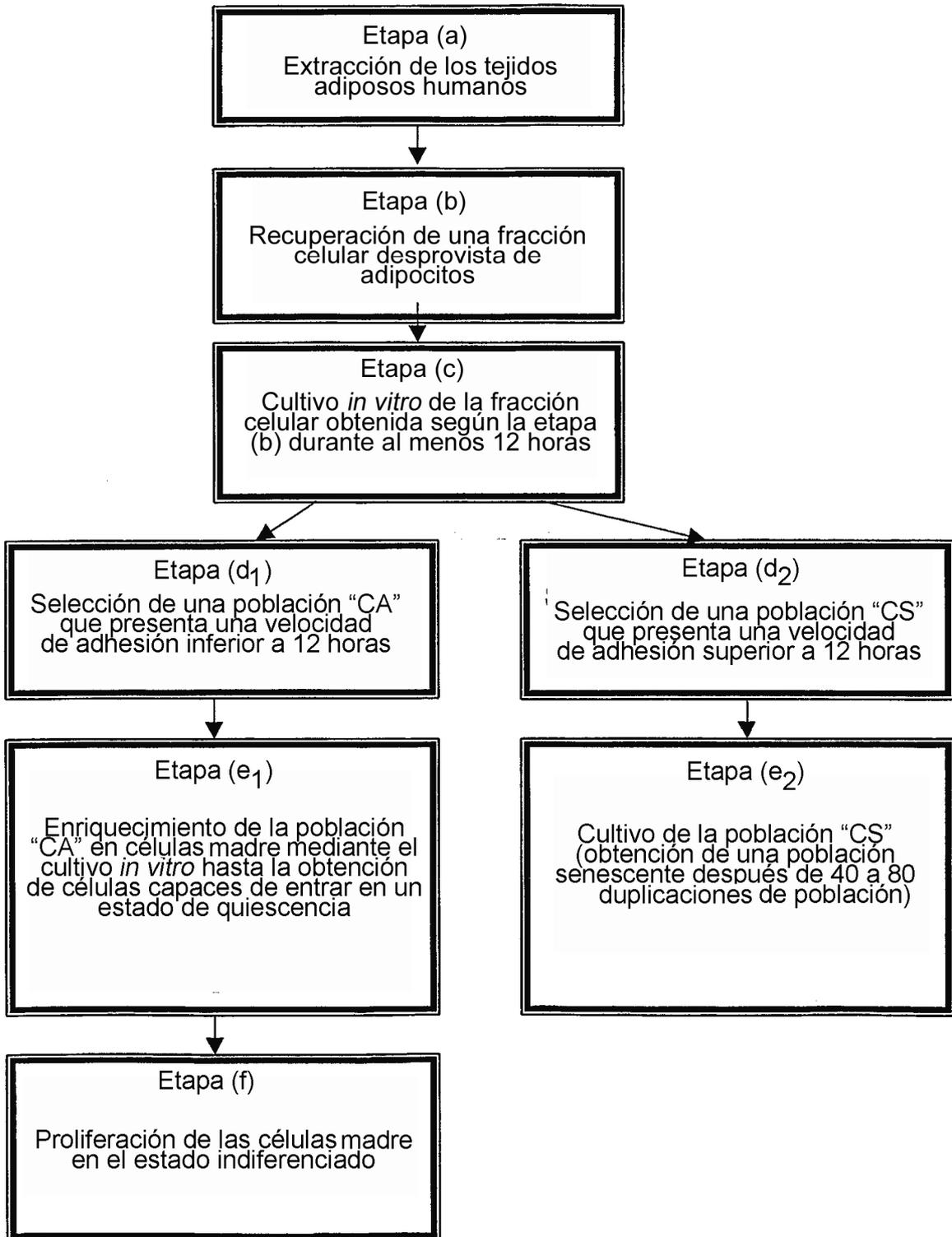


FIGURA 19

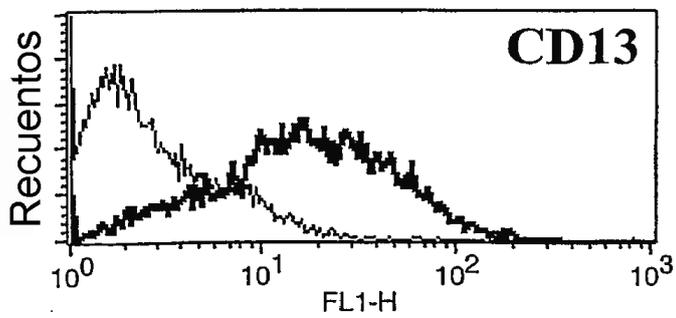
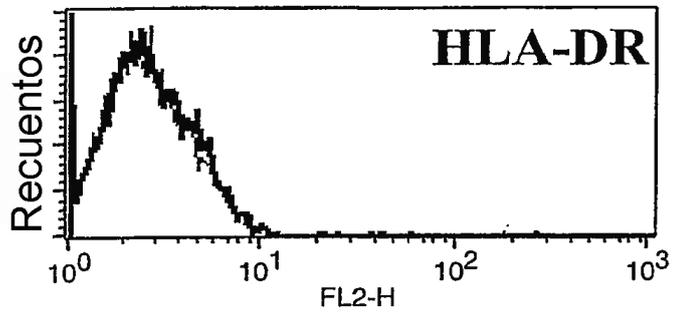
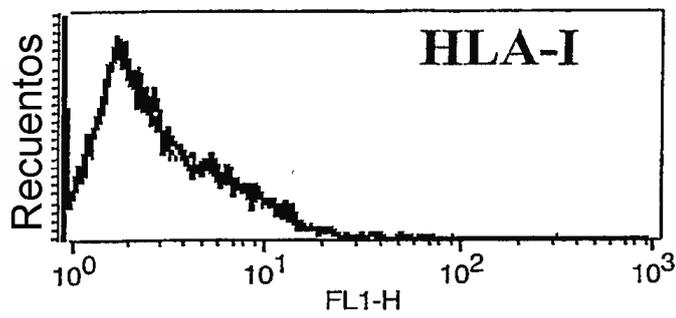
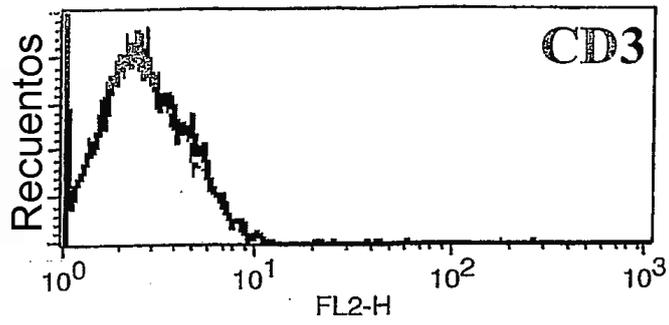


FIGURA 20

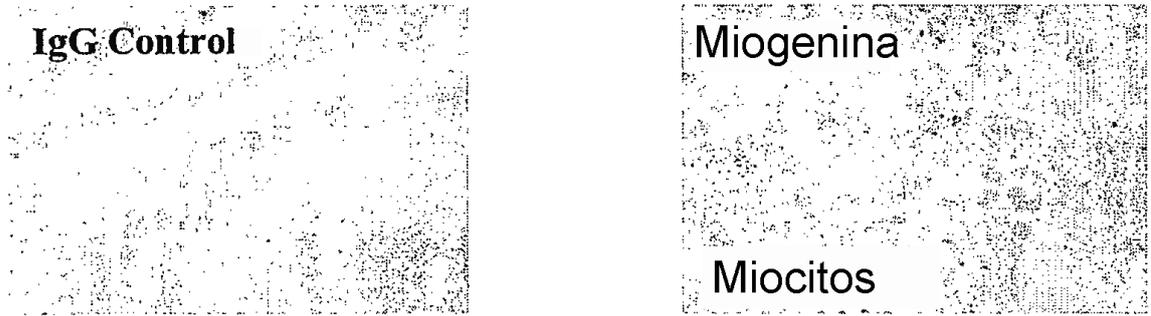


FIGURA 21

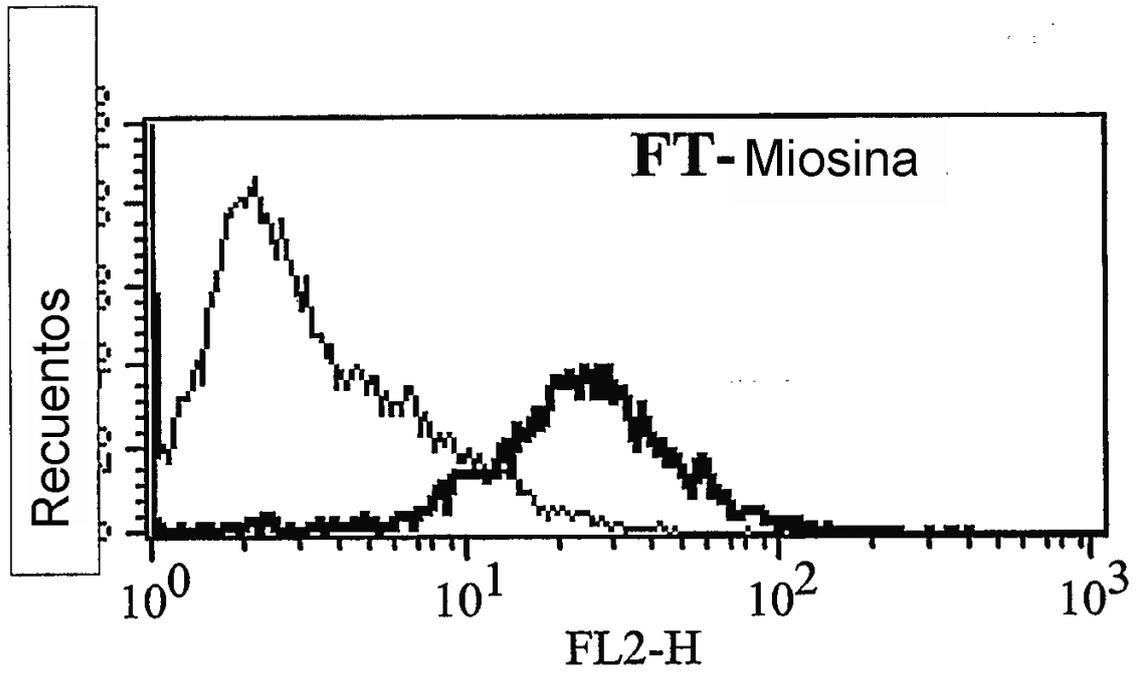


FIGURA 22

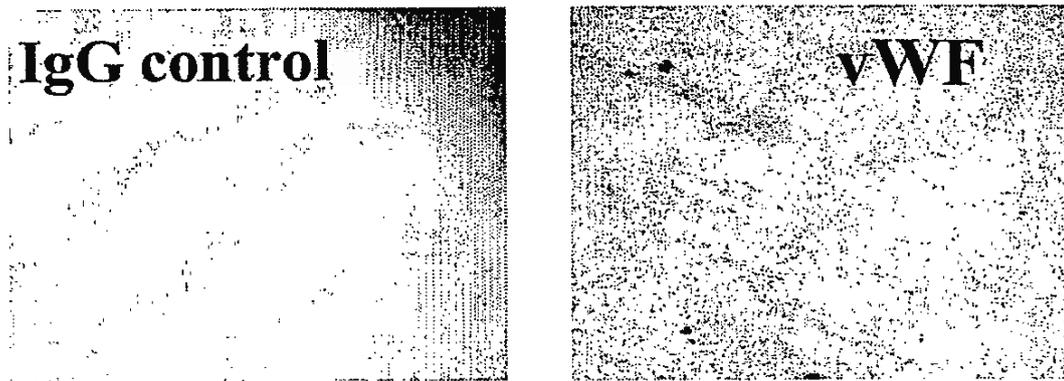


FIGURA 23

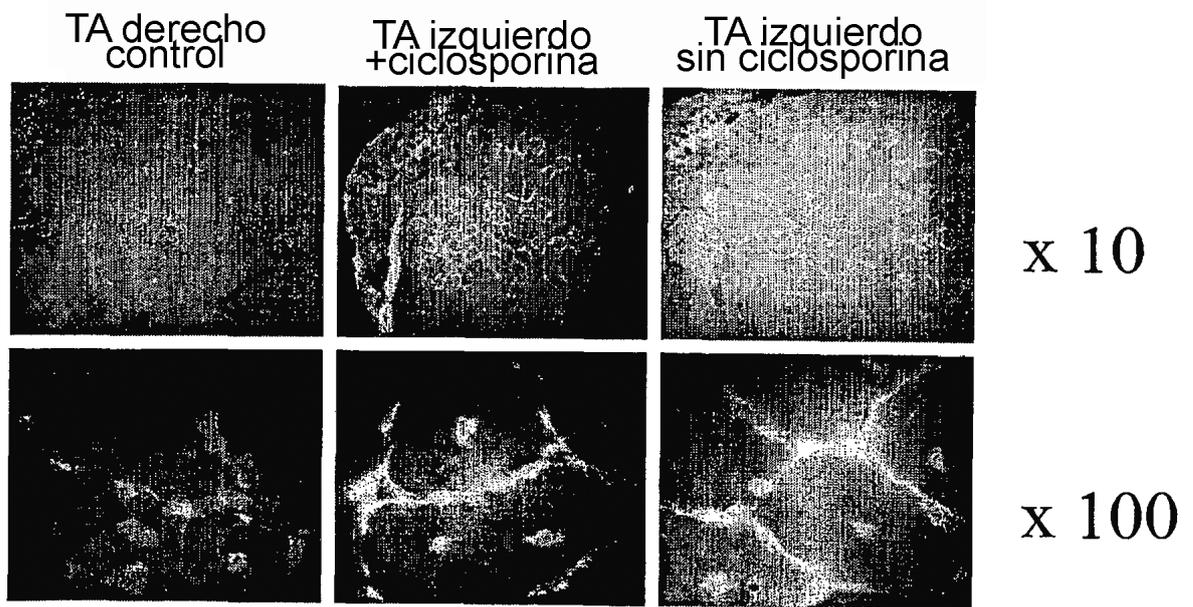


FIGURA 24

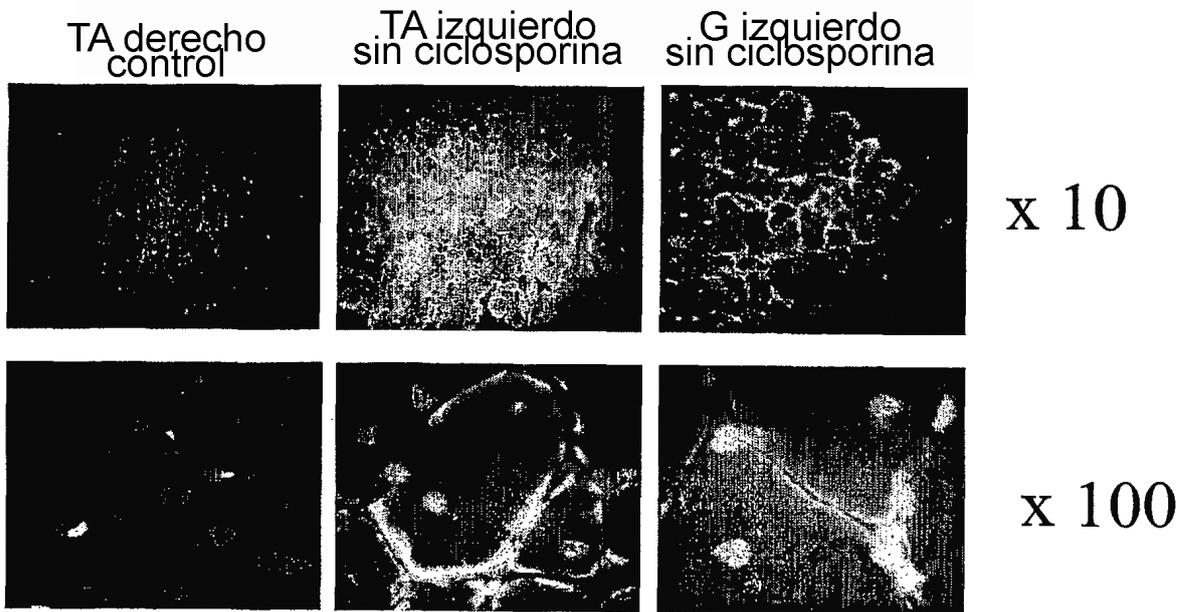


FIGURA 25

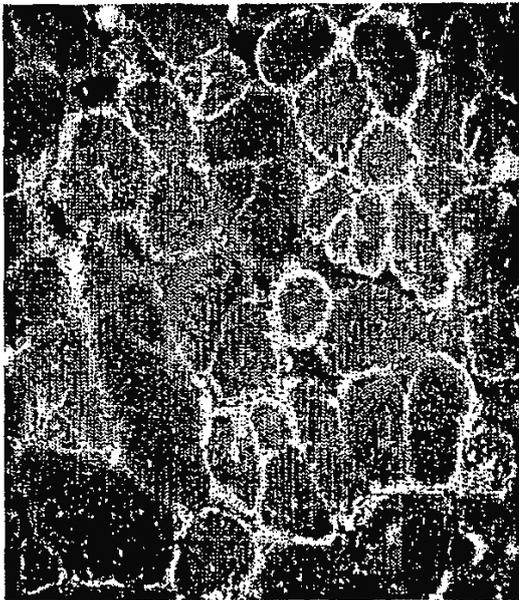
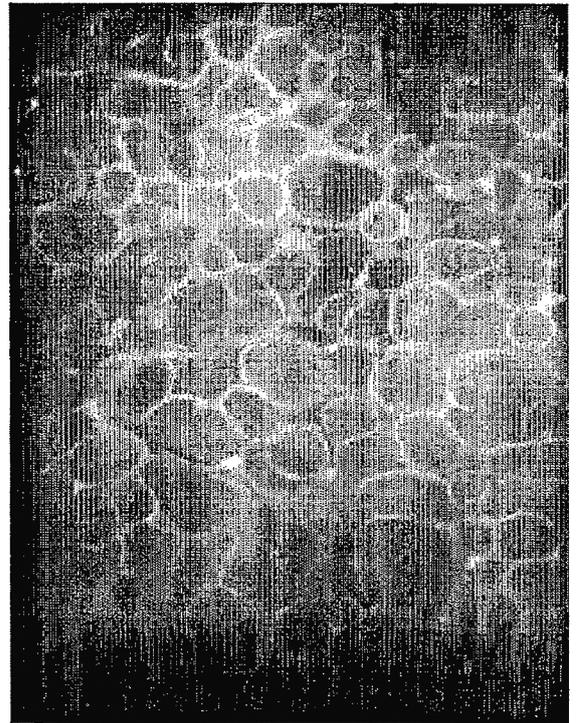
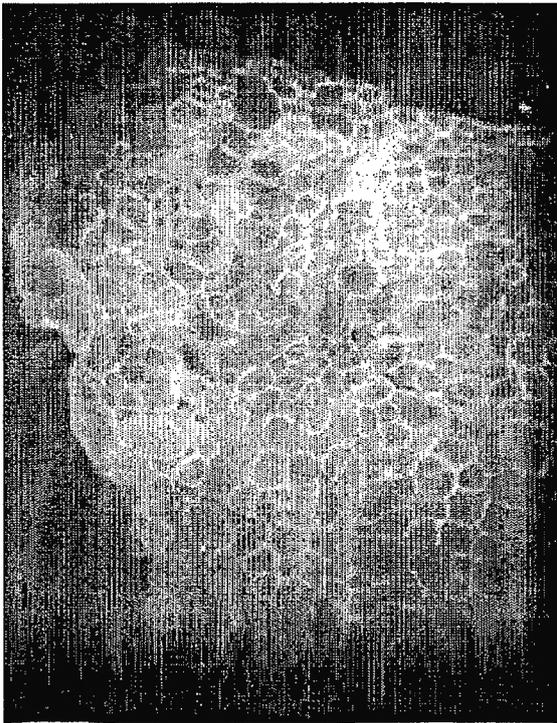
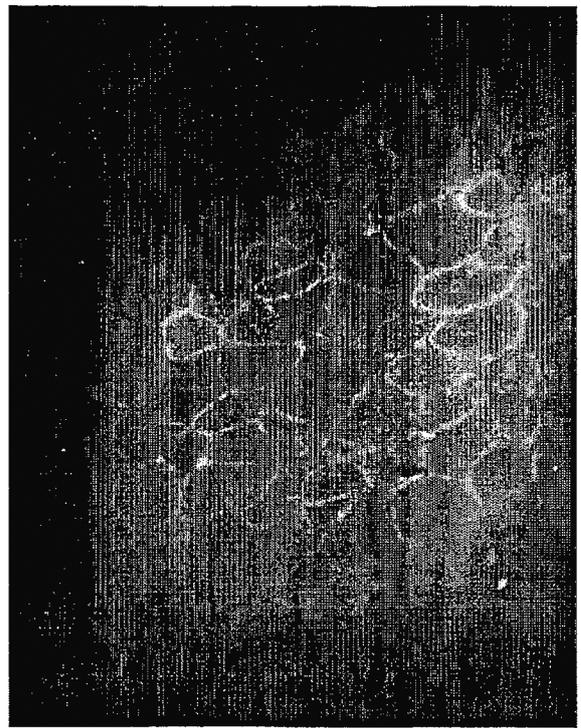
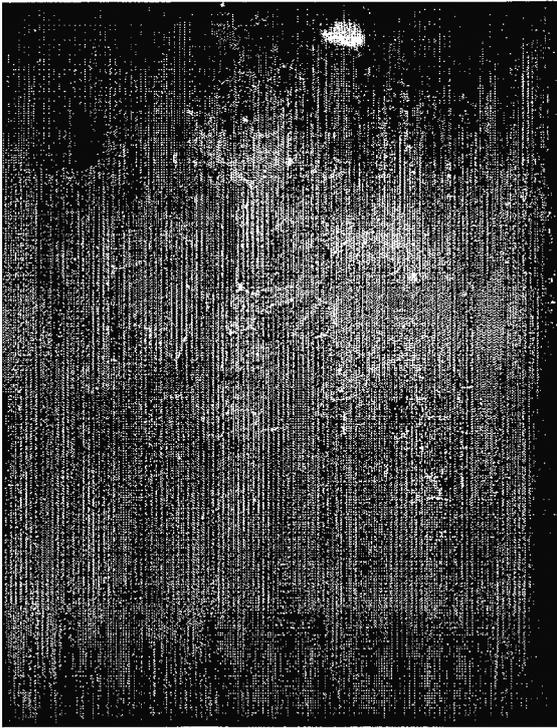


FIGURA 26



x10

x40

FIGURA 27

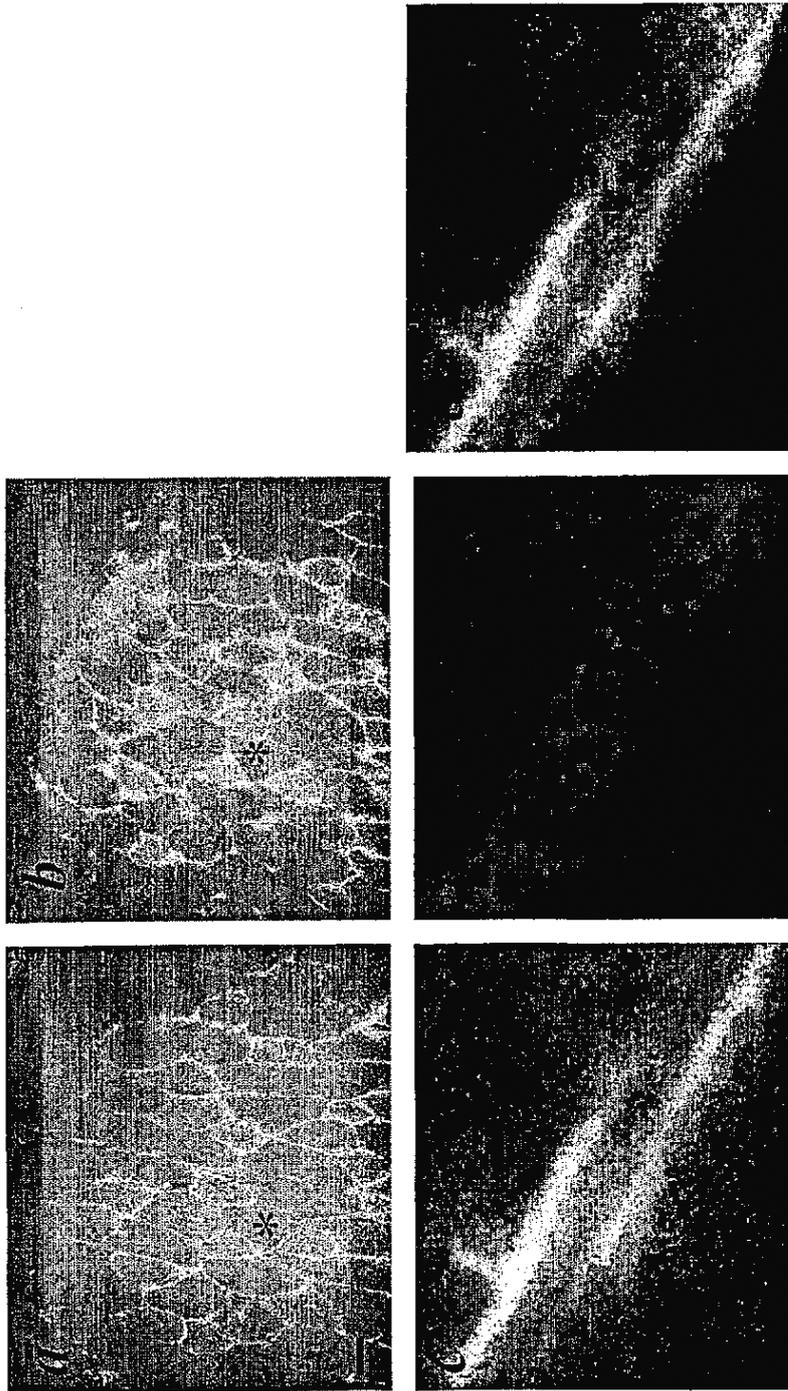


FIGURA 28

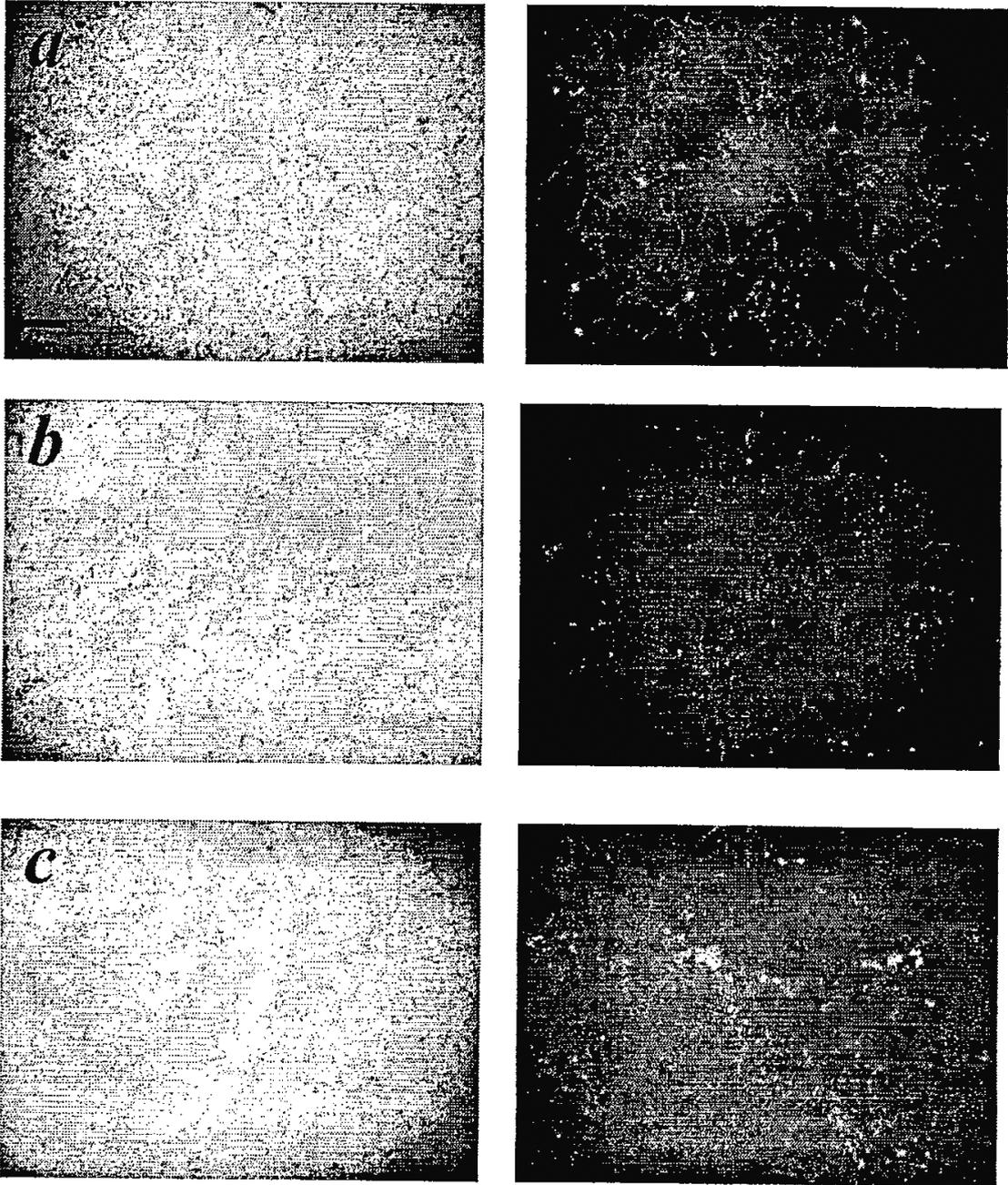
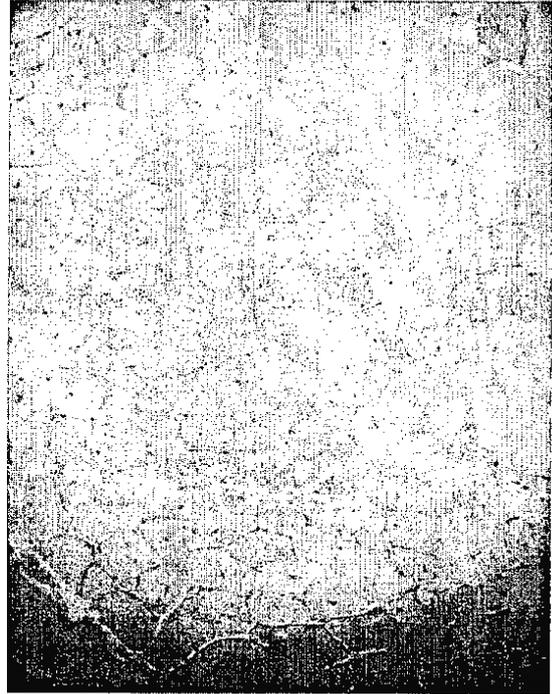


FIGURA 29



x10



x40

FIGURA 30

PRIMO 1



PRIMO 3

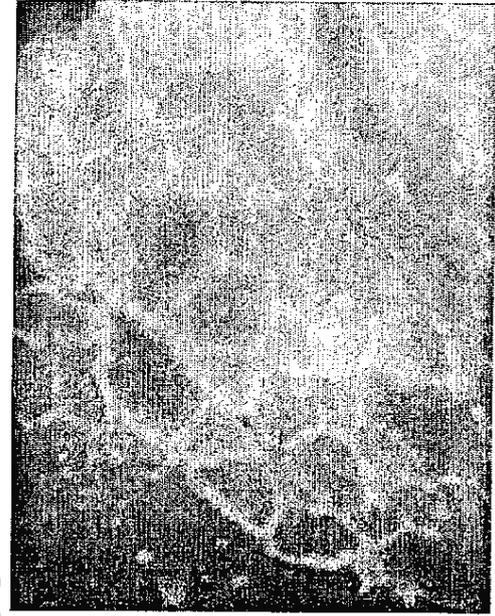
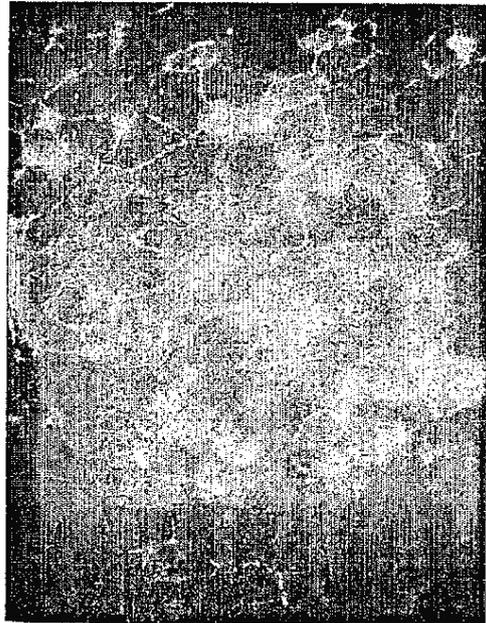


FIGURA 31



FIGURA 32