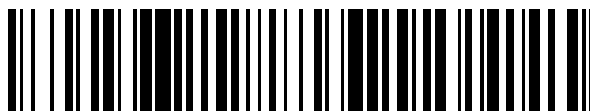


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 376**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12M 1/02 (2006.01)

C12M 3/08 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2011 PCT/IB2011/051614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11128868**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2011 E 11723646 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2558568**

54 Título: **Procedimiento para obtener una población de células progenitoras estrómicas**

30 Prioridad:

14.04.2010 IT MO20100111

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

28.03.2019

73 Titular/es:

**RIGENERAND S.R.L. (100.0%)
Via Maestri del Lavoro, 4
41036 Medolla (MO), IT**

72 Inventor/es:

**DOMINICI, MASSIMO;
CAFARELLI, LUIGI;
VERONESI, ELENA;
PICCINNO, MARIA SERENA;
PAOLUCCI, PAOLO;
DE SANTIS, GIORGIO y
PIERFRANCO, CONTE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 706 376 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

Procedimiento para obtener una población de células progenitoras estromáticas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una población de células, en particular una población de células progenitoras estromales a partir de una cantidad de tejido adiposo recogido de un ser vivo.

10 **Técnica anterior**

El término células progenitoras estromales, al que se hace referencia en lo sucesivo brevemente como SP, define todas las poblaciones de células que son capaces de proliferación y diferenciación, y también proporcionan soporte para los tejidos y las células circundantes.

15 Las SP son elementos celulares raros situados en los tejidos de los seres vivos, que están diseñados para perpetuar su función de recambio de las células dañadas y/o senescentes.

20 Se encontraron inicialmente en tejidos de alto recambio, tales como el sistema hematopoyético y epitelial, pero se pueden encontrar, aunque con menor frecuencia, en tejidos y órganos que tienen poca o ninguna capacidad de regeneración, tales como el sistema nervioso central.

25 Originalmente, los estudios de médula ósea iniciados más de treinta años antes pudieron identificar ciertas SP a las que se hará referencia en lo sucesivo como SP mesenquimatosas, que son capaces de mantener la hemopoyesis y la osteogénesis, proporcionando así un soporte funcional y estructural.

30 Los estudios in vitro mostraron que estas células tienen un alto potencial proliferativo, así como capacidades de diferenciación, en determinadas condiciones apropiadas, es decir, la capacidad de convertirse en elementos celulares pertenecientes a tejido óseo, cartilaginoso, adiposo, muscular y nervioso.

Este conocimiento sobre las características de las SP mesenquimatosas de médula ósea ha ampliado el alcance de la investigación para introducir terapias novedosas en la denominada medicina regenerativa.

35 Debido a su potencial de diferenciación, las SP mesenquimatosas de médula ósea se han estudiado para la regeneración de los tejidos lesionados después de traumatismo y eventos degenerativos agudos y crónicos, tales como cardiopatías; en oncología, se pueden usar para transportar medicamentos que tienen una acción antitumoral y también encuentran aplicación en enfermedades autoinmunitarias, debido a la producción de moléculas moduladoras de la respuesta inmunitaria. Además, debido a su función de soporte, se ha encontrado que son útiles como ayuda en el trasplante de citoblastos hemopoyéticos.

40 Algunos de estos estudios condujeron a las aplicaciones clínicas de las SP, tales como infarto de miocardio, diabetes sacarina, enfermedades autoinmunitarias, regeneración ósea, quemaduras, lipodistrofias e insuficiencia hepática.

45 En todas las indicaciones anteriores, y para aplicación terapéutica eficaz, necesita ser infundido o trasplantado un gran número de SP, es decir, del orden de varios millones por kilogramo de peso de un paciente.

Esto requiere la expansión prolongada de SP fuera del donante, es decir, in vitro en matraces de cultivo.

50 Esto es necesario debido a la baja presencia de SP en el tejido de la médula ósea original, y puede ser una limitación.

55 Además, el sitio de recogida (la médula ósea) puede no ser fácilmente accesible y estar dañado debido a la presencia de células neoplásicas o tratamientos farmacológicos simultáneos.

Por lo tanto, se han considerado sitios de recogida de SP adicionales, tales como el periostio, trabéculas óseas, el músculo esquelético, el pulmón, el cordón umbilical y en particular el tejido adiposo subcutáneo (AT).

60 En relación con el AT, la célula principal es la de los adipocitos, que es tan grande como aproximadamente 100 µm y cumple el papel principal del AT, es decir, el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos introducidos por la dieta.

65 También en el AT, las SP son un conjunto de progenitores que se replican en respuesta a la estimulación hormonal apropiada, permitiendo de ese modo que parte de las progenies se diferencien en adipocitos maduros, y también actúan como soporte de las estructuras vasculares, por el que se definen como pericitos estromales.

La masa de AT en los seres humanos adultos es una función de la dieta y estilo de vida y varía de 2-3 % del peso total en un atleta a 60-70 % en un individuo obeso.

5 El aumento de la incidencia de la obesidad ha aumentado la disponibilidad de AT, también debido a un aumento en la cirugía estética para reducir la masa adiposa subcutánea con fines estéticos u otros.

En estos casos, la recogida de AT actualmente puede producirse mediante liposucción.

10 Como resultado, el AT es una fuente potencial de SP, debido a su abundancia y accesibilidad.

Zuk PA et al, en el artículo "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells", publicado en Molecular Biology of The Cell (2002), iniciaron diversos estudios para valorar la analogía entre SP de origen adiposo y de médula ósea. Estas pruebas iniciales mostraron una serie de analogías en términos de potencial de diferenciación y expresión de antígenos, y estos datos preliminares permitieron la introducción de SP en muchos campos de la medicina regenerativa para aplicaciones de cardiología y medicina cosmética, particularmente a partir de células derivadas del paciente, es decir, células autólogas.

15 Según las solicitudes de patente WO2009027563 y el documento EP 2184068, es conocida una "población de citoblastos adultos derivados de tejido adiposo cardíaco y uso de los mismos en la generación cardíaca".

Estas invenciones se refieren al aislamiento y caracterización de una población novedosa de citoblastos adultos derivados de tejido cardíaco graso que expresan GATA-4 y/o Cx43 de forma constitutiva. Dicha población celular puede usarse en protocolos de terapia celular para regenerar el tejido miocárdico dañado.

25 A partir de la solicitud de patente US2005008626, son conocidos "Procedimientos de uso de células derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de afecciones cardiovasculares".

Según esta patente, las células presentes en el tejido lipoaspirado procesado se usan para tratar pacientes, incluyendo pacientes con afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares. Los procedimientos para tratar los pacientes incluyen el procesamiento del tejido adiposo para suministrar una cantidad concentrada de citoblastos obtenidos del tejido adiposo a un paciente. Los procedimientos se pueden practicar en un sistema cerrado para que los citoblastos no estén expuestos a un ambiente externo antes de ser administrados a un paciente. Por consiguiente, en un procedimiento preferido, las células presentes en el lipoaspirado procesado se colocan directamente en un receptor junto con los aditivos necesarios para promover, generar o apoyar un beneficio cardiovascular terapéutico.

35 A partir de la solicitud de patente US2005076396, son conocidos "Citoblastos y redes derivados de tejido adiposo".

40 Esta solicitud de patente proporciona citoblastos derivados de tejido adiposo (ADSC), fracciones enriquecidas de citoblastos derivados de tejido adiposo (ADSC-EF) y redes derivadas de tejido adiposo, solas y combinadas con los ADSC de la invención. En un aspecto, la solicitud de patente proporciona un ADSC sustancialmente libre de adipocitos y glóbulos rojos y poblaciones clonales de citoblastos de tejido conectivo. Los ADSC se pueden emplear solos o dentro de composiciones biológicamente compatibles, para generar tejidos y estructuras diferenciados, tanto in vivo como in vitro. Además, los ADSC se pueden expandir y cultivar para producir moléculas tales como hormonas y para proporcionar medios de cultivo acondicionados para soportar el crecimiento y la expansión de otras poblaciones celulares. En otro aspecto, la solicitud de patente proporciona una red derivada de tejido adiposo sustancialmente desprovista de células, que incluye material de matriz extracelular de tejido adiposo. La red se puede usar como sustrato para facilitar el crecimiento y la diferenciación de las células, ya sea in vivo o in vitro, en dispositivos o incluso en tejidos o estructuras maduras.

55 El presente estado de la técnica está limitado porque tienen que recogerse grandes cantidades de AT subcutáneo para obtener un número adecuado de SP. Estos volúmenes de grasa recogida generalmente están por encima de 0,5 l y pueden ser tan grandes como 1 l. Si bien estos volúmenes son grandes en términos absolutos, tienen una incidencia relativamente pequeña en un paciente obeso o con sobrepeso, es decir, que tiene un parámetro de Índice de Masa Corporal (IMC) superior a 25. Tales volúmenes no pueden obtenerse de individuos con bajo IMC (que tienen un IMC de menos de 18,5) que difícilmente podrían tener la cantidad requerida de SP autólogas.

60 Por lo tanto, este procedimiento de la técnica anterior sólo es aplicable a un número limitado de pacientes.

Además, se requieren procedimientos quirúrgicos invasivos, que implica los riesgos de cualquier cirugía, y en particular la aparición de embolia grasa.

65 Además, las recogidas de AT siempre requieren anestesia general del paciente, con los cuidados y los riesgos implicados en ello.

Divulgación de la invención.

Es un objeto de la presente invención mejorar la técnica anterior.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para obtener una población de células que permita extender la aplicación terapéutica de SP derivadas de AT a un mayor número de individuos.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento de obtención de SP a partir de una pequeña masa de AT, es decir, del orden de unas pocas centésimas a milésimas de mililitro, que está presente y es fácilmente recogible en todo tipo de pacientes, incluso en Individuos muy delgados (con un IMC inferior a 18,5).

Aún otro objeto de la invención es recoger suficientes cantidades de SP del AT bajo anestesia local.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de una población de células SP como se define en la reivindicación 1.

Por lo tanto, la invención proporciona las siguientes ventajas:

recoger un número adecuado de SP de un volumen muy pequeño de AT en pacientes que posiblemente tengan un IMC de menos de 18,5;

obtener cantidades considerables de células a partir de cantidades muy pequeñas de tejido recogido de un paciente;

obtener las pequeñas cantidades de tejido recogido mediante cirugía mínimamente invasiva, bajo anestesia local, con un riesgo, molestia y dolor considerablemente reducidos para el paciente;

el uso de pequeñas cantidades de AT para aislar una población de SP que mantiene las propiedades de sus progenitores, es decir, las características inmunogénicas y las capacidades de diferenciación;

obtener células progenitoras de pacientes para trasplante posterior, para regenerar tejidos dañados.

Breve descripción de los dibujos

Otras características y ventajas de la invención serán más fácilmente evidentes tras la lectura de la descripción detallada de una realización no exclusiva preferida de un procedimiento de obtención de una población de células, en particular células SP de AT, que se muestra como un ejemplo no limitante por los dibujos anexos, en los que:

La FIG. 1 es una vista de la muestra lipoasccionada dividida en 9 partes, cada una con un volumen de aproximadamente 0,020-0,025 ml y que se someten a tres procedimientos diferentes por triplicado, es decir, las partes designadas como muestra E se sometieron a un proceso de digestión enzimática, las tres partes designadas como muestra M se sometieron a un proceso de digestión mecánica y se cultivaron las tres partes designadas como muestra P.

La FIG. 2a es una vista del esqueleto del tejido adiposo en el sobrenadante después de la digestión enzimática, obtenida usando un microscopio invertido (a una ampliación x100).

La FIG. 2b es un diagrama que muestra el número de células (en millones) obtenidas después de la digestión de las muestras E y M.

Las FIG. 3a y 3b son dos imágenes de un cultivo in vitro de la muestra P, obtenidas a los cero días y a los siete días respectivamente, en particular la FIG. 3a es una vista de la masa adiposa, la FIG. 3b es una vista de las células adheridas al plástico de un matraz o recipiente de cultivo y definidas como preadipocitos (zona 1).

La FIG. 3c es una imagen del cultivo in vitro de 10 días de una muestra E, que muestra la presencia tanto de preadipocitos adherentes como SP aisladas de tejido adiposo.

La FIG. 3d es una imagen obtenida utilizando un microscopio invertido (a una ampliación x100) del cultivo in vitro de 10 días de una muestra M, donde se puede señalar que el proceso de cultivo simple no es eficaz en el aislamiento de SP, ya que no se muestran células adheridas al matraz o recipiente de cultivo.

La FIG. 4 es un diagrama que muestra el crecimiento de la muestra E en que se muestra la duplicación de células SP en los primeros cuatro pases de cultivo.

La FIG. 5a es una imagen de la SP de la muestra E en el pase de cultivo cuatro.

La FIG. 5b es una imagen de SP que muestra negatividad para la tinción de gotitas de grasa típicamente intracitoplasmáticas, conocida como aceite rojo O.

La FIG. 5c es una imagen de los preadipocitos aislados de la muestra P, que muestran positividad para la tinción de aceite rojo O.

La FIG. 6a es un diagrama que muestra la expresión del antígeno CD45.

La FIG. 6b es un diagrama que muestra la expresión del antígeno CD31.

La FIG. 6c es un diagrama que muestra la expresión del antígeno de pericito CD146.

La FIG. 6d es un diagrama que muestra la expresión del antígeno CD90.

La FIG. 6e es un diagrama que muestra la expresión del antígeno CD73.

La FIG. 6f es un diagrama que muestra la expresión del antígeno CD105.

La FIG. 7a muestra una imagen obtenida utilizando un microscopio invertido de SP no inducida osteogénicamente, negativo para la tinción con rojo de alizarina.

La FIG. 7b muestra una imagen ampliada x100 de SP inducida osteogénicamente, es decir, positiva para la tinción con rojo de alizarina.

La FIG. 7c muestra una imagen ampliada x100 de SP no inducida adipogénicamente, es decir, negativa para la tinción con aceite rojo O.

La FIG. 7d muestra una imagen ampliada x100 de SP inducida adipogénicamente, es decir, positiva para tinción con aceite rojo O.

La FIG. 7e muestra una imagen ampliada x100 de SP no inducida condrogénicamente, es decir, negativa para la tinción con azul Alcian.

La FIG. 7f muestra una imagen ampliada x100 de SP inducida condrogénicamente, es decir, positiva para la tinción con azul Alcian.

Descripción detallada de unas pocas realizaciones preferidas

Ejemplo 1.

La muestra de AT se recogió del área facial subcutánea de una donante femenina sana de 46 años de edad por liposucción de Coleman. También se pueden usar otros procedimientos para la recogida.

Los fragmentos de AT se lavaron tres veces con una solución salina conocida como solución tampón de Dulbecco-fosfato (D-PBS) añadida con antibiótico (1 U/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomina y 2,5 mg/ml de anfotericina B), durante un tiempo global de 15 minutos.

La última etapa de lavado, que se diseñó para procurar una muestra sin ningún componente líquido, se llevó a cabo utilizando un filtro (filtro celular de 100 µm).

Los fragmentos de AT se transfirieron a un recipiente estéril (placa de Petri) y se dividieron en nueve partes, teniendo cada una un volumen de aproximadamente 0,025 ml. La última, como se muestra en la Figura 1, se sometió a tres procedimientos diferentes por triplicado: tres partes (muestra E) se sometieron al mismo proceso de digestión enzimática, tres partes (muestra M) se sometieron al mismo proceso de digestión mecánica y, finalmente, las últimas tres partes, designadas como muestra P, se cultivaron todas.

ES 2 706 376 T3

La muestra E fue digerida por la solución enzimática, que consiste en el tampón enzimático añadido con la mezcla de enzimas, y al mismo tiempo la muestra M fue digerida mecánicamente, es decir, solo con el tampón enzimático y sin mezcla de enzimas, y finalmente la muestra P fue cultivada sin ser procesada.

5 Las muestras E y M se fragmentaron usando tijeras oculares. La muestra E se incubó (a 37 °C) con la solución enzimática y la muestra M con el tampón enzimático, en una proporción de 0,004 ml de AT por cada ml de cada solución.

10 El tampón enzimático es un medio generalmente conocido como medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), añadido con 1 U/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomicina, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales (una solución compuesta de: L-alanina (0,89 mg/dl); L-asparagina H₂O (1.5 mg/dl); ácido L-aspártico (1,33 mg/dl); ácido L-glutámico (1,47 mg/dl); glicina (0,75 mg/dl); L-prolina (1,15 mg/dl); L-serina (1,05 mg/dl)).

15 La mezcla enzimática, por ejemplo una mezcla conocida como "COLLAGENASE P", vendida por Roche, contiene clostripaína a una concentración de 2,8 U/mg de liofilizado, proteasa (Azocoll) a una concentración de 160 U/mg y tripsina (BAEE) a una concentración de 0,23 U/mg.

Las muestras E y M se transfirieron a uno o más recipientes cilíndricos 50 ml conocidos como Falcon.

20 La cantidad de cada muestra en cada recipiente era de aproximadamente 30 ml; las muestras de AT se agitaron a 37 °C durante 120 minutos, es decir, las condiciones ideales para la actividad enzimática. La oscilación se dirigió longitudinalmente (75 oscilaciones/minuto) en la dirección del eje longitudinal del recipiente. Al final del tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos, procurando así un sobrenadante para desechar y un sedimento compuesto por todos los elementos celulares de AT. Con referencia a la Figura 2a, la observación de la muestra E con un microscopio óptico muestra la presencia del esqueleto del tejido adiposo en el sobrenadante, lo que confirma que tal tejido fue digerido efectivamente por la colagenasa.

25 El sedimento se lavó dos veces más después de la filtración utilizando un filtro celular de 100 µm, para retirar los adipocitos maduros.

30 Una vez que se completó el proceso anterior, el recuento de células se efectuó mediante una prueba de supervivencia celular usando tinción con azul de tripano al 0,4 %. Se obtuvieron 701.000 células y 482.000 células en promedio para las muestras E y M respectivamente (FIG. 2b).

35 Estas células se sembraron con una densidad de 10.000/cm² en recipientes de cultivo celular (matraces) con un medio Quantum 333 añadido con 1 U/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomicina.

Las Figuras 3a y 3b muestran el cultivo in vitro de la muestra P a 0 días y 7 días respectivamente.

40 La muestra sin procesar de día 0 exhibe la masa adiposa rica en adipocitos (FIG. 3a), mientras que la FIG. 3b muestra, a los 7 días, elementos celulares que se adhieren al plástico y se disponen alrededor de la masa adiposa.

45 Estos elementos celulares tienen una forma alargada y se caracterizan por la presencia de pequeñas vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas, y por ello tanto se denominan preadipocitos (zona A en la FIG. 3b).

Después de 15 días, a pesar del gran número de células que fueron aisladas inicialmente, el cultivo de la muestra P mostró un crecimiento limitado, no observándose por tanto ninguna expansión in vitro.

50 Por el contrario, después de 10 días desde el inicio del cultivo, se encontró que la muestra E contenía aproximadamente un 50 % de preadipocitos y tantos elementos fibroblastoides en el matraz (zona 1 de la FIG. 3c).

Finalmente, la Figura 3d muestra la muestra M: no pudo aislarse aquí población de células celular, porque no hay células que se adhieran al matraz de cultivo.

55 Los cultivos así preparados se continuaron en la incubadora en una atmósfera controlada (37 °C, 5 % de CO₂) y el medio se sustituyó cada 2-3 días para crecimiento en matraz completo, que se logró sólo por la muestra E.

60 Las etapas posteriores incluyeron la tripsinización con una solución de tripsina-EDTA (0,05 %-0,02 %) y la resiembra en nuevos matraces con una densidad de 5000 células /cm².

Después del pase de cultivo cuatro, se obtuvieron 50 x 10⁶ células en la muestra E, mientras que no se observó crecimiento en los otros grupos. La duplicación celular se calculó con la fórmula $\log(N_1/N_2)/\log 2$, donde N₁ y N₂ son el recuento celular en el i-ésimo pase y en el i + 1ésimo pase (FIG. 4). Se encontró que el crecimiento in vitro de SP sigue una curva exponencial.

65

Además, la SP así aislada (FIG. 5a) mantenía un fenotipo típicamente fibroblastoide en el cultivo, y ya no mostraba las vacuolas intracitoplasmáticas típicas de preadipocitos.

5 Por ello, como se muestra en la Figura 5b, se encontró que la SP era negativa para la tinción con "aceite rojo O", que tiñe gránulos intracelulares. Cuando se compara la SP con los preadipocitos aislados de la muestra P (Fig. 5c), se encuentra que la SP ha perdido las vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas típicas de los preadipocitos, y mantiene un fenotipo fibroblastoide. Esto muestra la conversión de preadipocitos a un estadio más indiferenciado.

10 La SP así obtenida en el proceso se ha usado para análisis posterior (ensayos de inmunofenotipo y diferenciación), que confirmó las características deseadas de la población obtenida con el procedimiento de la invención.

Ejemplo 2: Evaluación de inmunofenotipificación.

15 En primer lugar, se verificó la presencia de cualquier población contaminante, tal como las células endoteliales y las células del sistema inmunitario, buscando sus respectivos marcadores CD31 y CD45. Se encontró que las SP eran negativas para CD45 (FIG. 6a) y muy débilmente positivas para CD31 (FIG. 6b).

20 Al mismo tiempo, las SP resultaron ser positivas para antígenos progenitores, tales como CD90 (FIG. 6d), CD105 (FIG. 6f) y CD73 (FIG. 6e) y en menor medida para CD146 (FIG. 6c), como un marcador de pericito estromal típico.

Ejemplo 3: Ensayos de diferenciación.

25 Después de la fenotipificación, se llevó a cabo la diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de la SP, en el pase 4.

Diferenciación osteogénica:

30 Las células se sembraron con una densidad de 10.000 células/cm². Después del crecimiento completo (típicamente después de 2-4 días), se indujo la diferenciación osteogénica, conservando una muestra como control.

Se obtuvo la inducción ósea usando un medio apropiado compuesto de: medio basal (DMEM con 10 % de suero fetal bovino- FCS), dexametasona, 2-fosfato de ácido L-ascórbico y β-glicerofosfato.

35 Tal medio basal se mantuvo durante una semana, y se reemplazó cada 2-3 días. En el séptimo día, o día 7, se añadió proteína morfogenética ósea 2 al medio. Las células se mantuvieron con el medio de diferenciación durante siete días más, y tal medio se reemplazó cada dos o tres días.

40 En el día decimocuarto, se valoró el resultado de diferenciación por ensayo histológico (tinción con rojo de alizarina). En este ensayo, las células de los matraces se lavan brevemente en una solución de Tris-HCl y NaCl (3-5 ml/matraz), se fijan con metanol al 100 % a 4 °C durante 30 minutos y se lavan brevemente dos veces en agua desionizada. Luego, las células se dejan en contacto con una solución de rojo de alizarina (al 0,5 %) a pH 4,0-4,2 durante cinco minutos y se lavan brevemente.

45 Las células apropiadamente inducidas tienen propiedades típicas de los osteoblastos del tejido óseo, tales como la producción de depósitos de matriz ósea, como se observa en la zona 1 de la FIG. 7b, que no están presentes en el control no inducido, como se muestra en la FIG. 7a.

Diferenciación adipogénica.

50 Las células se sembraron con una densidad de 10.000 células/cm² en su medio de cultivo: una vez que se alcanzó el crecimiento completo (generalmente después de dos y cuatro días), se indujo la diferenciación adipogénica, usando un cultivo como un control.

55 El único medio para la diferenciación adipogénica es DMEM añadido con suero de caballo y suero de conejo, dexametasona, insulina, metilisobutilxantina (IBMX), indometacina y penicilina/estreptomina.

Las células se mantuvieron en condiciones de diferenciación durante 10 días, y el medio se reemplazó cada dos o tres días. En el décimo día, el microscopio óptico reveló la aparición de agrupaciones de células características, que contenían vacuolas lipídicas.

60 Estas vacuolas eran más evidentes por tinción con aceite rojo O: se lavaron las células en una solución salina y se fijaron con vapores de formol al 40 % durante diez minutos.

Luego se lavaron en ddH₂O durante dos minutos, seguido de tinción con una solución aceite rojo O (al 2 %) durante cinco minutos. Para resaltar las estructuras nucleares y citoplásmicas, las células se trataron con hematoxilina como contratinción (30"-1'). Finalmente, se lavaron en agua durante cinco minutos.

5 Las células se diferenciaron por tanto en adipocitos, como se muestra por la presencia de vacuolas lipídicas; tal presencia se confirma aún más por su positividad para la tinción con "aceite rojo O" (véase la Fig. 7d) y se valida aún más por la negatividad del control, que solo exhibe la contratinción de color púrpura de la hematoxilina (véase la FIG. 7c).

10 **Diferenciación condrogénica.**

Las células obtenidas de la fase adherente se dividen en tubos cónicos de 15 ml (2×10^5 células/ml) con DMEM rico en glucosa suplementado con BMP-6, TGF- β 3, dexametasona, 2-fosfato de ácido L-ascórbico, piruvato de sodio, prolina, glutamina y penicilina/estreptomina.

15 Las células se centrifugaron a la parte inferior de tubos cónicos de 15 ml y se cultivaron, cambiándose el medio cada dos días.

20 En el vigesimoprimer día de diferenciación, se recogieron los sedimentos, se fijaron en formol y se incluyeron en parafina.

Las secciones en serie de muestras inducidas y no inducidas se tiñeron luego con una solución de azul Alcían.

25 Este es un tinte de ftalocianina de cobre básico soluble en agua que tiñe los grupos ácidos del ácido hialurónico producido por las células condrodiferenciadas.

30 La muestra teñida con azul Alcían inducida asume una tinción más fuerte (véase la FIG. 7f) en comparación con el control no inducido (véase la FIG. 7e). El ácido hialurónico se tiñe y su producción provoca un aumento de volumen de la muestra inducida, en comparación con la muestra no inducida.

35 Por lo tanto, los ensayos de diferenciación, en combinación con la inmunofenotipificación, confirmaron las características progenitoras multipotenciales de células aisladas, incluso cuando se usan pequeñas cantidades de AT.

Se ha encontrado que la invención cumple los objetos previstos.

La invención así concebida es susceptible de cambios y variantes dentro del concepto inventivo.

40 Además, todos los detalles pueden ser reemplazados por otros elementos técnicamente equivalentes, según sea necesario, sin apartarse del alcance definido por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* para obtener una población de células progenitoras estromales a partir de una primera cantidad seleccionada de tejido adiposo que contiene células adiposas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- digerir dicha primera cantidad con una segunda cantidad de tampón enzimático del tipo usado en la disociación de tejidos orgánicos y biológicos para obtener una población de células libres;
 - 10 - sembrar esta población de células libres en medios de cultivo necesarios para su expansión;
- caracterizado porque** dicho tejido adiposo es tejido adiposo blanco de procedencia subcutánea y dicha primera cantidad está entre 0,004 ml y 0,036 ml y esa segunda cantidad está entre 0,9 ml y 1,1 ml, y **porque** dicha segunda cantidad comprende medios disolventes y solubles que comprenden:
- 15 medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
- penicilina (1U/ml) y estreptomina (1 mg/ml)
- 20 piruvato de sodio (1 mM) aminoácidos no esenciales que comprenden: L-alanina (0,89 mg/dl); L-asparagina H₂O (1,5 mg/dl); ácido L-aspártico (1,33 mg/dl); ácido L-glutámico (1,47 mg/dl); glicina (0,75 mg/dl); L-prolina (1,15 mg/dl); L-serina (1,05 mg/dl) y en donde dichos medios solubles comprenden:
- mezcla de colagenasa de clase I y II; y porque
 - 25 - dicha mezcla de colagenasa de clase I y II tiene una actividad enzimática entre 0,1 U/mg y 5,5 U/mg de producto liofilizado, que tiene una concentración enzimática entre 1,74 y 1,78 U/ml de dicho medio disolvente y en el que
- 30 dichos medios solubles comprenden:
- clostripaína a una concentración entre 0 U/mg y 7,6 U/mg de producto liofilizado;
 - proteasas a una concentración entre 0,05 U/mg y 164 U/mg de producto liofilizado;
 - 35 - tripsina a una concentración entre 0,23 U/mg y 2,3 U/mg de producto liofilizado en una forma seleccionada entre agentes individuales o en combinación.
- 40 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha digestión comprende agitar con dispositivos de agitación dichas primera y segunda cantidades durante un tiempo entre 20 minutos y 120 minutos, a una temperatura preestablecida.
- 45 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha temperatura preestablecida está comprendida entre 36 °C y 38 °C.
- 50 4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha agitación comprende oscilar dichos dispositivos de agitación en una dirección de oscilación seleccionada según un primer número de oscilaciones por minuto y en una segunda dirección de oscilación diferente de dicha primera dirección de oscilación y según un segundo número de oscilaciones por minuto.
- 55 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha primera dirección de oscilación comprende una dirección recta y dicha segunda dirección de oscilación comprende una dirección orbital.
6. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho primer número está entre 70 y 80 oscilaciones por minuto y dicho segundo número está entre 6 y 100 oscilaciones por minuto.
- 60 7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células progenitoras estromales comprenden células estromales mesenquimatosas y pericitos estromales.

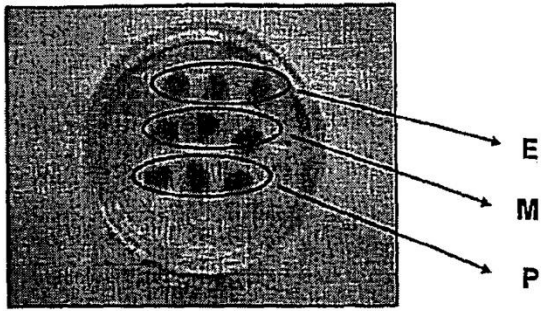


FIG. 1



FIG. 2a

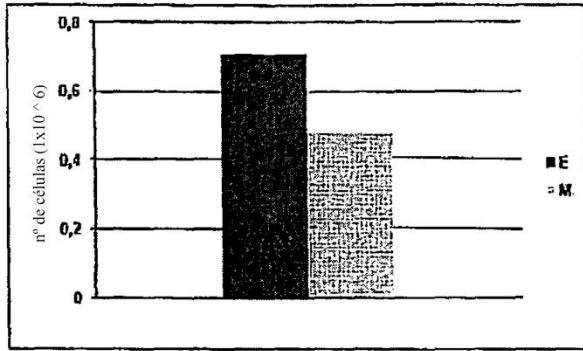


FIG. 2b

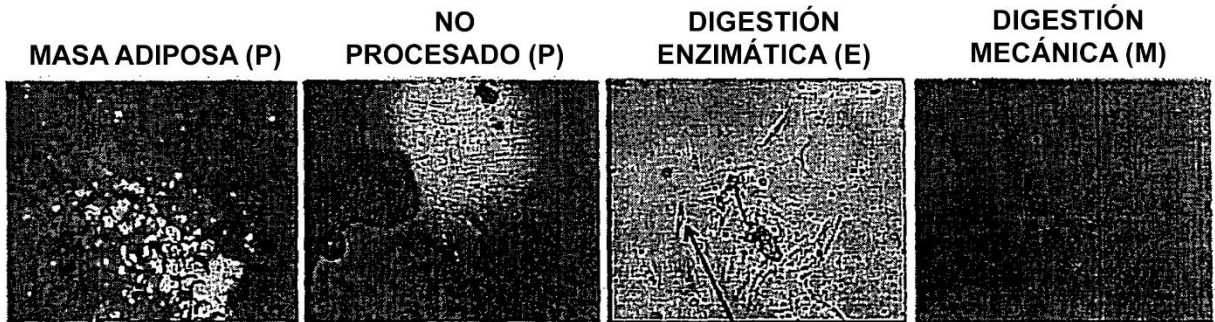


FIG. 3a

FIG. 3b

①

FIG. 3c

①

FIG. 3d

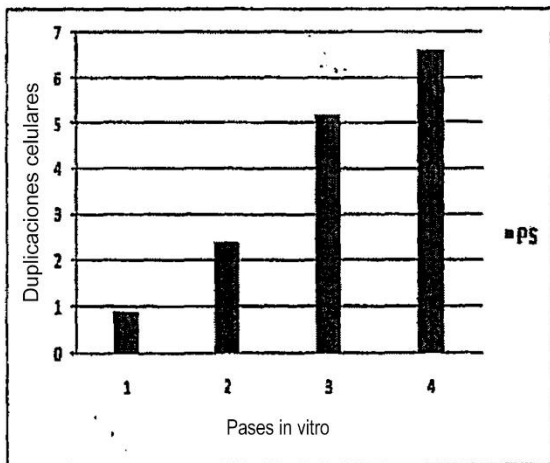


FIG. 4

CONTROLES

DIFERENCIADOS

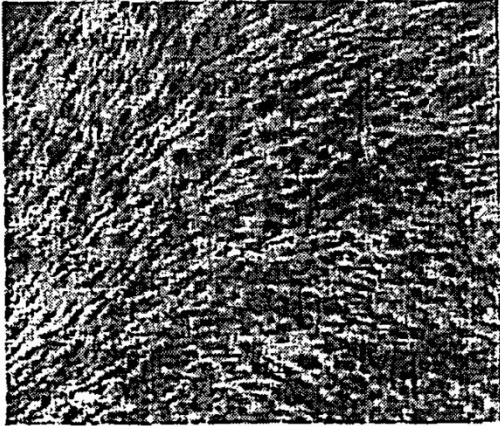


FIG. 7a

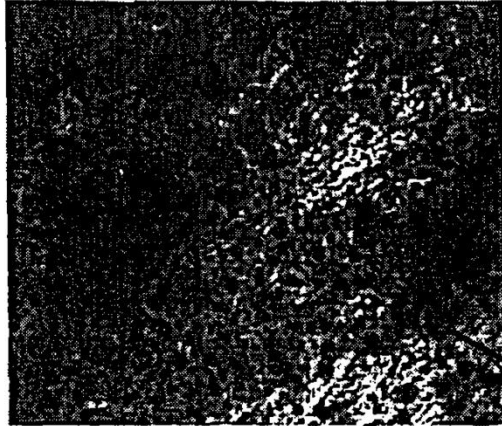


FIG. 7b

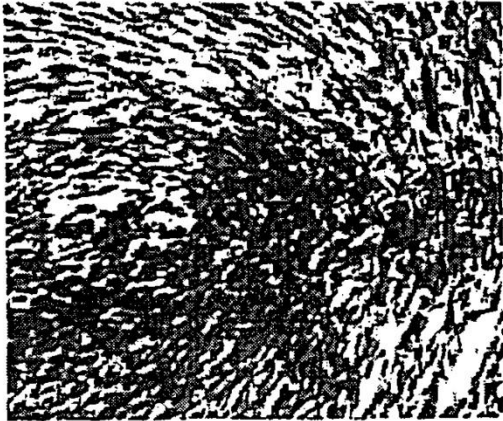


FIG. 7c

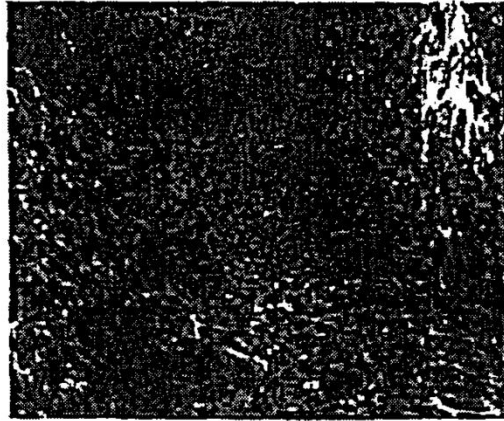


FIG. 7d

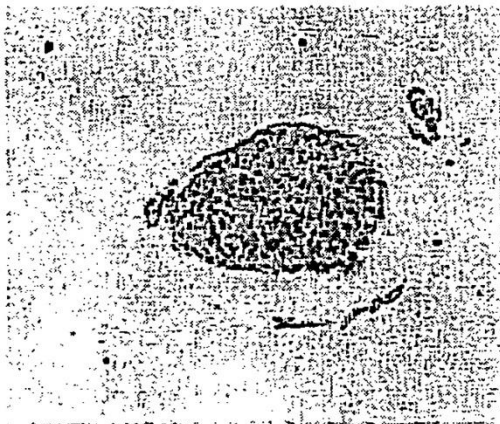


FIG. 7e

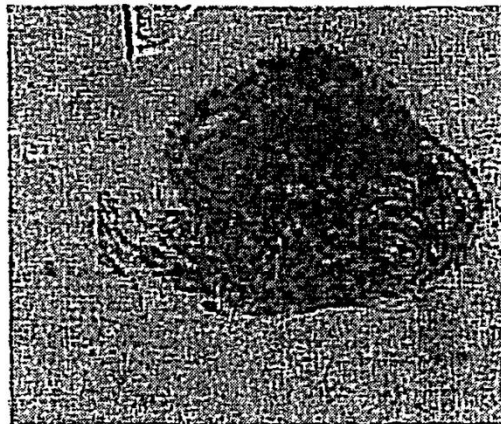


FIG. 7f

1

Aceite rojo O

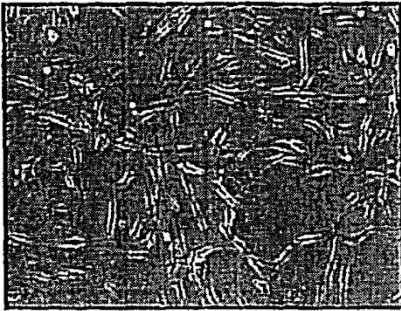


FIG. 5a

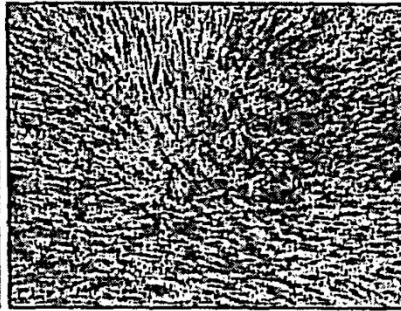


FIG. 5b

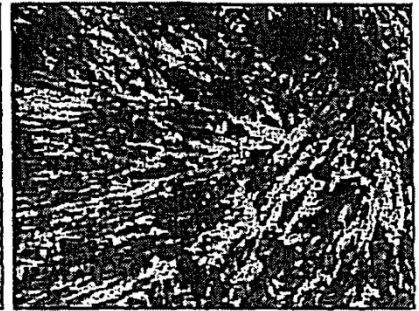


FIG. 5c

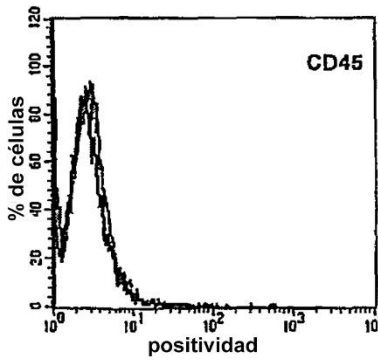


FIG. 6a

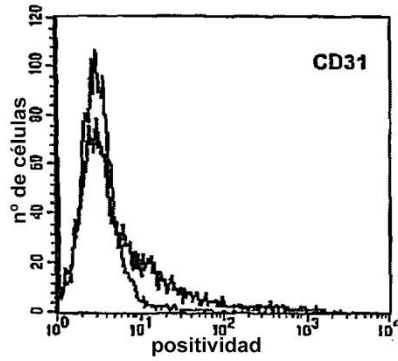


FIG. 6b

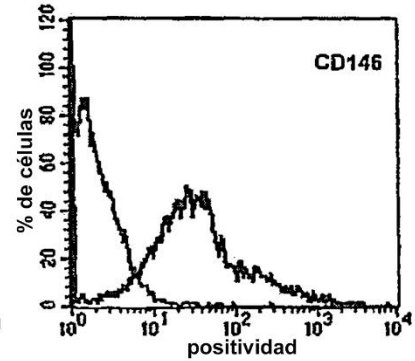


FIG. 6c

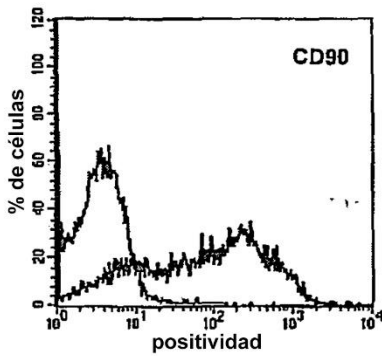


FIG. 6d

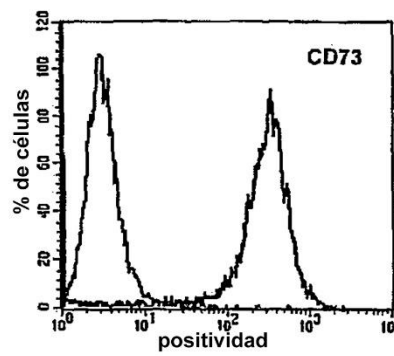


FIG. 6e

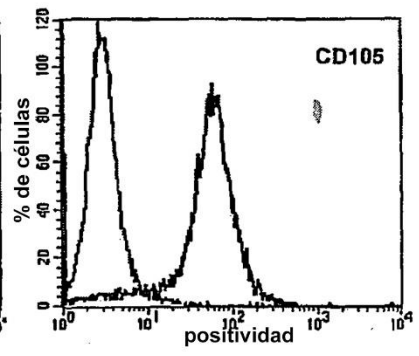


FIG. 6f