



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 345 867**

② Número de solicitud: 200901046

⑤ Int. Cl.:
C12N 5/0775 (2010.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2010**

Fecha de la concesión: **15.07.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **28.07.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.07.2011

⑰ Titular/es: **Fundación Instituto Mediterráneo para la Biotecnología y la Investigación Sanitaria (IMABIS)**
Avda. Carlos Haya, nº 25 - Local Bajo
29010 Málaga, ES

⑱ Inventor/es: **Martín Hernández, Miguel;**
Roldán Ortiz, María del Mar y
Tinahones Madueño, Francisco

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio.**

㉖ Resumen:

Células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio.

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y se refiere a células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio, y, preferiblemente, de estroma de epiplón, con capacidad para diferenciarse y dar lugar a células con características de células especializadas, y a los métodos de obtención de las mismas. Dichas células pueden usarse en la preparación de medicamentos y composiciones farmacéuticas para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas, así como en la evaluación de la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos.

ES 2 345 867 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y se refiere a células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio, y, preferiblemente, de estroma de epiplón, con capacidad para diferenciarse y dar lugar a células con características de células especializadas, y a los métodos de obtención de las mismas. Dichas células pueden usarse en la preparación de medicamentos y composiciones farmacéuticas para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas, así como en la evaluación de la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos.

Estado de la técnica anterior

15 Actualmente, el desarrollo de la tecnología en el campo de las células madre ha hecho que éstas sean consideradas como una prometedora terapia para diversas patologías humanas, incluyendo: lesiones condrales, óseas y musculares, enfermedades neurodegenerativas, rechazo inmunológico, enfermedades cardíacas y desórdenes de la piel (US 5.811.094, 5.958.767, 6.328.960, 6.379.953, 6.497.875).

20 Por otra parte, las células madre pueden ser una fuente potencial de cantidades virtualmente ilimitadas de células, tanto indiferenciadas como diferenciadas, para la realización de ensayos *in vitro* dirigidos a la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos (Patente US 6.294.346), así como para determinar su actividad, metabolismo y toxicidad.

25 Según el origen de las células madre podemos diferenciar entre células madre embrionarias (células ES) y células madre adultas. Las células ES proceden de la masa celular interna de los blastocistos y tienen como característica principal el hecho de ser pluripotenciales, lo que significa que pueden dar lugar a cualquier tejido adulto derivado de las tres capas embrionarias (Evans y Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Patente US 6.200.806). Las células madre adultas son células parcialmente comprometidas presentes en tejidos adultos, las cuales pueden permanecer décadas en el cuerpo humano, aunque con el paso del tiempo comienzan a escasear (Fuchs y Segre, 2002).

30 A pesar de la alta pluripotencialidad de las células ES, las terapias basadas en el uso de células madre adultas presentan una serie de ventajas técnicas sobre aquellas basadas en células ES. En primer lugar, las células derivadas de células ES son normalmente objeto de rechazo por parte del sistema inmunológico mientras que las células madre adultas no son rechazadas por el sistema inmune si han sido obtenidas por trasplante autólogo o trasplante heterólogo de células inmunocompatibles. Además el hecho de que estén parcialmente comprometidas reduce el número de etapas de diferenciación necesarias para generar células especializadas. Por otra parte, el uso de este tipo de células no está asociado a ningún tipo de controversia ética o legal. Finalmente, aunque este tipo de células presente una menor potencialidad de diferenciación que las células ES, la mayoría de ellas son realmente multipotentes (Joshi y Enver, 2002) lo que significa que pueden diferenciarse a más de un tipo de tejido.

35 Actualmente, las dos fuentes más empleadas para derivar células madre multipotentes han sido la médula ósea y el tejido adiposo subcutáneo, fundamentalmente obtenido de liposucciones.

45 En el primer caso, la extracción de médula ósea es un procedimiento clínico muy invasivo, normalmente limitado a pacientes con diferentes patologías hematológicas y del cual la cantidad de material celular obtenido es muy limitada. Es importante destacar que para el uso potencial de células madre multipotentes en terapias celulares es muy importante partir de una cantidad celular suficiente desde la propia derivación de las células. Por su propia naturaleza, las células madre multipotentes proliferan *in vitro* y es posible mantenerlas durante un elevado número de pases de cultivo, con lo cual es posible expandir su cultivo para obtener una cantidad celular elevada, sin embargo, para su uso en terapias de reemplazo no se debe utilizar células que han sido mantenidas durante un elevado número de pases de cultivo, fundamentalmente para minimizar riesgos de transformación celular y pérdidas de capacidad de diferenciación. Por tanto, es importante encontrar otros tejidos que proporcionen una mayor cantidad inicial de células madre multipotentes, como es el caso del tejido adiposo.

55 En cuanto a la obtención de células madre multipotentes derivadas de tejido adiposo, hasta el momento se han descrito líneas derivadas de liposucciones y grasa subcutánea, siendo en ambos casos el rendimiento de derivación más elevado que en el caso de médula ósea. No obstante, no todo el tejido adiposo humano tiene exactamente las mismas funciones endocrinas y por tanto su naturaleza y composición celular varía.

60 Actualmente, las células madre multipotentes son la materia prima con mayor potencial de éxito para su uso en terapias de reemplazo celular. Además, constituyen una fuente de células indiferenciadas y diferenciadas de gran utilidad para la realización de ensayos *in vitro* dirigidos al desarrollo de compuestos terapéuticos. Existe por tanto una necesidad de obtener células madre multipotentes con elevada plasticidad y capacidad de expansión en cultivo por periodos largos.

65

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio, y, preferiblemente, de estroma de epiplón, con capacidad para diferenciarse y dar lugar a células con características de células especializadas, y a los métodos de obtención de las mismas. Dichas células pueden usarse en la preparación de medicamentos y composiciones farmacéuticas para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas, así como en la evaluación de la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos.

Los inventores han obtenido líneas de células madre multipotentes derivadas del estroma de mesenterio, y concretamente, de estroma de epiplón humano. Estas líneas celulares poseen la capacidad para ser expandidas por periodos largos de cultivo y tienen una elevada plasticidad celular, por lo que pueden ser empleadas en terapia celular de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas, con las ventajas técnicas que presentan las células madre adultas multipotentes, tales como la simplificación del protocolo para la inducción de su diferenciación o la reducción de la posibilidad de rechazo inmunológico en el trasplante. Por otra parte, estas líneas celulares pueden ser utilizadas para el desarrollo de estudios farmacológicos, toxicológicos, farmacogenómicos o genéticos.

Un primer aspecto de la invención, se refiere a una célula madre multipotente aislada derivada de estroma de mesenterio de mamífero, de ahora en adelante, “célula madre multipotente de la invención”, caracterizada por:

- a) ser positiva para los siguientes antígenos de superficie: CD105, CD90, CD73, CD29, CD49d y CD49a.
- b) ser negativa para los siguientes antígenos de superficie: CD45, CD34, CD14 y HLA DR.

El mesenterio, es un término en anatomía animal, incluyendo humanos, que designa a una membrana serosa que constituye un repliegue plano del peritoneo, principalmente de tejido conjuntivo, que contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos con destino a las vísceras abdominales, y que une al estómago y al intestino con las paredes posteriores del abdomen, dando así posicionamiento a estos órganos digestivos. En el mesenterio, en especial de personas obesas, se acumula un elevado número de células adiposas.

Los mesenterios incluyen: el mesenterio, propiamente dicho, que envuelve a determinadas regiones del intestino delgado (como, por ejemplo, el yeyuno y el ileón), el mesocolon, que envuelve a determinadas regiones del colon (como, por ejemplo, el mesoapéndice, que envuelve el apéndice vermiforme; el mesocolon transversal, que retiene al colon transversal; o el mesocolon sigmoide, que envuelve al colon sigmoideo); el ligamento ancho del útero, que envuelve al útero; y el omento o epiplón, que es un repliegue específico del peritoneo (que se divide en dos partes: el epiplón mayor o gastrocólico, y el epiplón menor o gastrohepático). El epiplón mayor o gastrocólico recubre la curvatura mayor del estómago y lo une con el bazo y el colon transversal y se continúa como un delantal situado en la cara anterior del intestino. Es el lugar de acumulación de tejido adiposo en las personas obesas. La unión específica peritoneana de la curvatura mayor del estómago con el bazo se le llama también epiplón gastroesplénico. Desde el bazo también parte un pliegue que se une con la cola del páncreas, llamado epiplón pancreático-esplénico. El epiplón menor o gastrohepático recubre el borde izquierdo del hígado uniéndolo con el borde derecho del estómago, duodeno y a la curvatura menor del estómago.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre multipotente de la invención es derivada de epiplón de mamífero. En una realización más preferida, la célula madre multipotente de la invención procede de un primate y, en una realización aún más preferida, procede de un humano.

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células madre totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las células madre pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales, capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (Weissman *et al.* Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:387-403). Por tanto, el término “célula madre multipotencial” o “células madre multipotenciales”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a célula capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria.

Otro aspecto de la invención se refiere a una población celular aislada constituida por, o que comprende, células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio de mamífero (“células madre multipotentes de la invención”), caracterizada por:

- a) ser positiva para los siguientes antígenos de superficie: CD105, CD90, CD73, CD29, CD49d y CD49a.
- b) ser negativa para los siguientes antígenos de superficie: CD45, CD34, CD14 y HLA DR.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, esta población celular está constituida por, o comprende, células madre multipotentes derivadas de estroma de epiplón de mamífero. Preferiblemente, esta población celular constituida por, o que comprende, células madre multipotentes derivadas de estroma procede de un primate y, más preferiblemente, de un humano.

La célula madre multipotente de la invención, o la población celular constituida por, o que comprende, las células madre multipotentes de la invención, puede ser caracterizada mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de su estado indiferenciado. En el Ejemplo 1 de la patente, la población de células madre multipotentes es caracterizada mediante inmunocitometría. Otros métodos que pueden ser utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan a: análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

Las células madre multipotentes derivadas del estroma pueden ser inducidas a diferenciarse *in vitro* para dar lugar a células que expresen al menos una característica propia de una célula especializada. Tales tipos celulares parciales o totalmente diferenciados incluyen, pero no se limitan a linajes celulares propios de los siguientes tejidos y órganos: cartílago, hueso, grasa, músculo, tejido nervioso, piel, hígado o páncreas, por ejemplo, condrocitos, osteocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, queratinocitos, hepatocitos o células pancreáticas.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a una célula aislada diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada. En una realización preferida de la invención, la célula diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada seleccionada de la lista que comprende: condrocito, osteocito, adipocito, miocito, cardiomiocito, neurona, astrocito, oligodendrocito, queratinocito, hepatocito o célula pancreática. En una realización más preferida de la presente invención, la célula diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada seleccionada de la lista que comprende: condrocito, osteocito o adipocito.

Otro aspecto de la invención se refiere a una población celular aislada diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención, o a partir de una población celular aislada constituida por, o que comprende, las células madre multipotentes de la invención, caracterizada porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada. En una realización preferida de este aspecto de la invención, esta población celular diferenciada se caracteriza porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada de la lista que comprende: condrocito, osteocito, adipocito, miocito, cardiomiocito, neurona, astrocito, oligodendrocito, queratinocito, hepatocito o célula pancreática. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, esta población celular diferenciada se caracteriza porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada de la lista que comprende: condrocito, osteocito o adipocito.

Los términos “célula diferenciada” o “población celular diferenciada” se refieren a la célula aislada o a la población celular aislada obtenida al cultivar a la célula o las células madre multipotentes de la invención en condiciones que favorezcan la inducción de su diferenciación a células especializadas, y que como consecuencia de ello, expresan, al menos, una característica propia de una célula especializada.

La célula diferenciada o la población celular diferenciada puede ser caracterizada mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de diferenciación de las células madre de la presente invención a diversos linajes. Métodos utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan a: inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*. Algunos de los métodos que pueden emplearse para la caracterización se explican en el Ejemplo 2 de la patente.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en terapia celular somática.

Se entiende por “terapia celular somática” la utilización de células somáticas vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación, para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo, por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos. Entre los medicamentos de terapia celular somática se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse: células manipuladas para modificar sus propiedades inmunológicas, metabólicas o funcionales de otro tipo en aspectos cualitativos o cuantitativos; células clasificadas, seleccionadas y manipuladas, que se someten posteriormente a un proceso de fabricación con el fin de obtener el producto terminado; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes) que ejercen la acción pretendida en principio en el producto acabado; derivados de células autólogas expresadas *ex vivo* (*in vitro*) en condiciones específicas de cultivo; o células modificadas genéticamente o sometidas a otro tipo de manipulación para expresar propiedades funcionales homologas o no homologas anteriormente no expresadas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central o periférico, piel, hígado o páncreas. Una realización preferida de este aspecto de la presente invención, se refiere a una composición

ES 2 345 867 B1

farmacéutica que comprende las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago o hueso.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en terapia celular somática para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central o periférico, piel, hígado o páncreas. Una realización preferida de este aspecto de la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en terapia celular somática para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago o hueso.

15 En una realización preferida de estos aspectos de la invención, la composición farmacéutica comprende cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento, y además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento, y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

20 Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica.

30 Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutanea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

35 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

45 Otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares aisladas descritas anteriormente en este documento para la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para la elaboración de un medicamento de terapia celular somática.

50 Otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central o periférico, piel, hígado o páncreas. Una realización preferida de este aspecto de la presente invención, se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago o hueso.

60 Otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para la elaboración de un medicamento de terapia celular somática para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central o periférico, piel, hígado o páncreas. Una realización preferida de este aspecto de la presente invención, se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para la elaboración de un medicamento de terapia celular somática para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago o hueso.

65 Cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento pueden ser aplicadas al desarrollo de ensayos *in vitro* e *in vivo* con los siguientes propósitos industriales: búsqueda de fármacos, estudios

farmacológicos, estudios toxicológicos, estudios farmacogenómicos y/o estudios genéticos. Tales ensayos pueden ser utilizados para la identificación y/o caracterización de una multitud de dianas biológicas, compuestos bioactivos y/o agentes farmacológicos.

5 La célula madre multipotente de la invención, o la población celular constituida por, o que comprende, las células madre multipotentes de la invención, proporciona un sistema único en el cual esta célula o estas células pueden diferenciarse para dar lugar a linajes específicos del mismo individuo. Además, la célula madre multipotente de la invención, o la población celular constituida por, o que comprende, las células madre multipotentes de la invención, proporcionan una fuente de células en cultivo a partir de una potencial variedad de individuos genéticamente diversos
10 que pueden responder de distinta manera a diversos agentes biológicos y farmacológicos. Al comparar las respuestas de las células procedentes de una población estadísticamente significativa de individuos se pueden determinar los efectos de los agentes biológicos o farmacológicos ensayados sobre el tipo celular concreto. A diferencia de la mayoría de los cultivos primarios, las células madres multipotentes de la invención se pueden mantener en cultivo y de esta forma se pueden estudiar según vaya transcurriendo el tiempo. Por lo tanto, múltiples cultivos celulares procedentes de un
15 único o de distintos individuos pueden ser tratados con el agente de interés para determinar si existen diferencias en el efecto que tiene dicho agente en ciertos tipos de células con el mismo perfil genético o, alternativamente, en tipos celulares similares procedentes de individuos genéticamente distintos.

La utilización de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento en un sistema de escrutinio de alto rendimiento (*high-throughput screening*) permite analizar una amplia gama de agentes biológicos y/o farmacológicos, así como bibliotecas combinatoriales de los mismos, de una forma efectiva, para de esta forma elucidar sus efectos en las células humanas. Dichos agentes incluyen, pero no están limitados a: péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, hormonas, partículas virales, antibióticos, compuestos inhibitorios, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, mutágenos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas o preparados de vacunas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de cualquiera de las células o las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para evaluar *in vitro* la respuesta celular a, al menos, un agente biológico o farmacológico.

Una realización preferida de dicho método para evaluar *in vitro* la respuesta celular a agentes biológicos o farmacológicos, o a bibliotecas combinatoriales de dichos agentes, comprende lo siguiente: a) aislar las células proporcionadas por la presente invención a partir de un individuo o de una población estadísticamente significativa de individuos; b) diferenciar opcionalmente las células aisladas a un tipo celular concreto; c) expandir las células en cultivo; d) diferenciar opcionalmente las células expandidas a un tipo celular concreto; e) poner en contacto el cultivo con uno o más agentes biológicos o farmacológicos o con una biblioteca combinatorial de dichos agentes; y f) evaluar los posibles efectos biológicos de dichos agentes sobre las células del cultivo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, dicho agente biológico o farmacológico se selecciona de la lista que comprende péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, partículas virales, hormonas, antibióticos, compuestos inhibitorios, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, mutágenos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas o preparados vacunales.

La presente invención provee, además, de métodos de obtención de las células o las poblaciones celulares aisladas descritas anteriormente en este documento.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método de obtención de una célula madre multipotente aislada de la invención, o de una población celular aislada constituida por, o que comprende, células madre multipotentes, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) obtener una muestra biológica aislada de mesenterio; y

b) seleccionar las células madre multipotentes derivadas del estroma de la muestra biológica obtenida en (a).

En una realización preferida de este aspecto de la presente invención la muestra biológica aislada de mesenterio es de epiplón de mamífero. Preferiblemente, la célula madre multipotente, o la población celular aislada constituida por, o que comprende, células madre multipotentes de la invención obtenidas mediante este método, procede de un primate y, más preferiblemente, de un humano.

Es posible obtener una muestra biológica aislada del mesenterio y, preferiblemente, del epiplón, por ejemplo, pero sin limitarse mediante intervención quirúrgica abdominal abierta o intervención quirúrgica laparoscópica. La intervención quirúrgica abdominal abierta es una técnica quirúrgica que permite que la cavidad abdominal sea dejada abierta temporalmente, utilizando diversos procedimientos conocidos en el estado de la técnica, para facilitar el acceso al abdomen; la ventaja de este tipo de intervención quirúrgica es que la accesibilidad al tejido es completa y por tanto se pueden obtener una muestra biológica aislada de mesenterio y, preferiblemente, de epiplón mayor. La cirugía laparoscópica es una técnica quirúrgica que se practica través de pequeñas incisiones, usando la asistencia de una

ES 2 345 867 B1

cámara de video que permite al equipo médico ver el campo quirúrgico dentro del paciente y accionar en el mismo; la ventaja de este tipo de intervención quirúrgica es que es mínimamente invasiva y posibilita un periodo post-operatorio más rápido y confortable.

5 La selección de las células madre multipotentes derivadas de estroma de mesenterio y, preferiblemente, de epiplón, puede realizarse mediante diferentes procedimientos descritos en el estado de la técnica, y que pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitarse, procesado mecánico, tratamiento enzimático (por ejemplo, pero sin limitarse, con una colagenasa), centrifugación, lisis eritrocitaria, filtración, cultivo en plástico sin ningún otro soporte o matriz extracelular, cultivo en medios que favorecen la proliferación de estas células o inmunocitometría. Algunos de estos métodos se explican en detalle en el Ejemplo 1 de la patente.

15 La célula madre multipotente de la invención, o la población celular aislada constituida por, o que comprende, células madre multipotentes de la invención, obtenida mediante el método anteriormente descrito puede ser caracterizada para identificar las proteínas intracelulares y/o de superficie, genes, y/u otros marcadores indicadores de su estado indiferenciado mediante métodos ampliamente conocidos en el estado de la técnica. En el Ejemplo 1 de la patente, la población de células madre multipotentes derivadas de estroma obtenidas mediante este método es caracterizada mediante inmunocitometría. Otros métodos que pueden ser utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan a: análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*.

20 Preferiblemente, la célula madre multipotente de la invención, o la población celular aislada constituida por, o que comprende, células madre multipotentes de la invención, obtenida mediante el método anteriormente descrito, está caracterizada por:

- 25 a) ser positiva para los siguientes antígenos de superficie: CD105, CD90, CD73, CD29, CD49d y CD49a.
b) ser negativa para los siguientes antígenos de superficie: CD45, CD34, CD14 y HLA DR.

30 Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método de obtención de una célula diferenciada o de una población celular aislada diferenciada a partir de la célula madre multipotente de la invención, o a partir de la población constituida por, o que comprende, células madre multipotentes de la invención, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- 35 a) obtener una muestra biológica aislada de mesenterio;
b) seleccionar las células madre multipotentes derivadas de estroma de la muestra biológica obtenida en (a);
y
40 c) cultivar las células madre multipotentes de (b) en condiciones que favorezcan la inducción de su diferenciación a células especializadas.

45 Los métodos que se pueden usar para inducir la diferenciación de las células madre multipotentes de la invención a diversos tipos celulares especializados concretos son conocidos por los expertos en la materia. Algunos de estos métodos se explican en el Ejemplo 2 de la patente.

50 La célula diferenciada o la población celular diferenciada obtenida mediante el método anteriormente descrito puede ser caracterizada mediante la identificación de proteínas de superficie y/o intracelulares, genes, y/u otros marcadores indicativos de diferenciación de las células madre de la presente invención a diversos linajes. Métodos utilizados para la caracterización incluyen, pero no se limitan a: inmunocitometría, análisis inmunocitoquímico, análisis por *northern blot*, RT-PCR, análisis de expresión génica en *microarrays*, estudios proteómicos o análisis por *differential display*. Algunos de ellos se explican en el Ejemplo 2 de la patente.

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

60 Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la capacidad adipogénica de las líneas celulares derivadas obtenidas a partir de estroma de epiplón. En tres experimentos diferentes varias líneas celulares derivadas de estroma de epiplón humano se cultivaron durante 21 días en un medio de cultivo de inducción de diferenciación adipocítica (Poietics, Lonza), siguiendo el protocolo recomendado. Para comprobar el grado de diferenciación, las células se tiñeron con Oil Red O (SIGMA). (A) Control negativo. Células no tratadas con el medio de diferenciación adipogénica. (B) Células diferenciadas a adipocitos que acumulan numerosas vacuolas lipídicas positivas para la tinción con Oil Red O.

Figura 2. Muestra el estudio de la capacidad osteogénica de las líneas celulares derivadas obtenidas a partir de estroma de epiplón. En tres experimentos diferentes varias líneas celulares derivadas de estroma de epiplón humano se cultivaron durante 21 días en un medio de cultivo de inducción de diferenciación osteogénica (Poietics, Lonza). Para comprobar el grado de diferenciación las células se tiñeron con Alizarin Red (SIGMA). (A) Control negativo. Células no tratadas con el medio de diferenciación osteogénica. (B) Células positivas para la tinción con Alizarin Red de la matriz extracelular de calcio generada como consecuencia de la diferenciación osteogénica.

Figura 3. Muestra el estudio de la capacidad condrogénica de las líneas celulares derivadas obtenidas a partir de estroma de epiplón. En tres experimentos diferentes varias líneas celulares derivadas de estroma de epiplón humano se cultivaron durante 21 días mediante la técnica de diferenciación celular de inducción en micromasa (Poietics, Lonza). Para comprobar el grado de diferenciación condrogénica las células se tiñeron con Alcian Blue 8G (SIGMA). (A) Control negativo de células no tratadas con el medio de cultivo de diferenciación condrogénica. (B) Células teñidas con Alcian Blue formando estructuras y con morfología típicas cartilaginosa. (C) Magnificación (20x) de la imagen del panel B.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Obtención, derivación, expansión y caracterización de líneas de células madre multipotentes a partir de estroma de epiplón humano

Obtención de epiplón humano como fuente de células madre multipotentes derivadas de estroma: Para la realización de la presente invención se utiliza tanto epiplón derivado de donantes sanos-delgados, como de pacientes con obesidad mórbida. El epiplón se obtiene tanto por intervenciones quirúrgicas mediante laparoscopia, como intervenciones de cirugía bariátrica a obesos mórbidos, donde la cantidad de tejido accesible es muy elevada.

Derivación de líneas de células madre multipotentes derivadas a partir de estroma de epiplón humano: El epiplón se procesa inmediatamente tras la obtención de la muestra de tejido. Para asegurar el máximo de garantía, rendimiento y reproducibilidad en el proceso de derivación de las células madre multipotentes, todo el procedimiento de derivación e inicio del cultivo celular se ha optimizado para completarlo en las tres horas posteriores a la obtención del tejido. El epiplón se divide en porciones menores, para facilitar el aislamiento de la fracción vascular del estroma del tejido, que es la fuente celular donde residen las células madre multipotentes. El tejido se lava varias veces con volúmenes iguales de HBSS + 2% P/S (*Hank's Balanceó Saline Solution* + 2% Penicilina/Streptomycin) (GIBCO). Una vez lavado el tejido se incuba, durante 30 minutos a 37°C, con una solución al 0.075% de colagenasa I (GIBCO) para digerir la matriz extracelular del mismo y liberar el estroma del tejido. Tras la digestión, la colagenasa se neutraliza con DMEM F12 + 10% FBS + 1% antibióticos (*Dulbecco's Modified Eagle Media F12 + 10% Fetal Bovine Serum*) (GIBCO) y la suspensión celular se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* de alta densidad de la fracción vascular del estroma del tejido. El *pellet* del estroma del tejido adiposo se resuspende en tampón de lisis de eritrocitos (BD Biosciences) y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la incubación la suspensión celular se filtra a través de una malla de nylon de 100 micras para eliminar debris celulares y se vuelve a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Por último, el *pellet* celular se resuspende directamente en el medio de cultivo inicial de expansión de células madre multipotentes: DMEM F12 + 10% FBS + 1% antibiótico/antimicótico. Las células se siembran en frascos de cultivo y se incuban durante 16-18 horas a 37°C en un incubador al 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Tras la incubación las células se lavan varias veces con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (GIBCO) para eliminar células sanguíneas no adherentes residuales. Las células se mantendrán en medio de cultivo inicial de expansión para fomentar la selección y homogenización de los cultivos para el linaje mesenquimal.

Expansión de líneas de células madre multipotentes derivadas de estroma de epiplón humano: El protocolo de trabajo está optimizado para garantizar la obtención de cultivos homogéneos de células madre multipotentes derivadas de estroma de epiplón humano. Para ello, el procedimiento de expansión se ha diseñado aprovechando las propias características de las células madre multipotentes, actualmente descritas por la ISCT (*International Society for Cellular Therapy*). Las células madre multipotentes presentan adherencia al plástico de cultivo y son capaces de proliferar indiferenciadas sin necesidad de ningún otro soporte o matriz extracelular, a diferencia de otros linajes celulares presentes en el estroma del tejido adiposo, por tanto estas características permiten iniciar un cultivo selectivo para potenciar el crecimiento y generación de líneas homogéneas de células madre multipotentes. Una vez que el cultivo inicial adquiere la confluencia necesaria para pasar (subcultivar) las células, se procede a un cambio de medio, el cual potencia todavía más la expansión selectiva de las células madre multipotentes. El medio de expansión mesenquimal presenta una formulación compuesta de diferentes factores de crecimiento y con un porcentaje reducido del 2% de suero (Mesempro, GIBCO). En estas condiciones de cultivo las líneas celulares derivadas pueden ser mantenidas en constante proliferación por un número muy elevado de pases de cultivo.

Ejemplo 2

Caracterización de las células madre multipotentes derivadas de estroma de epiplón

5 Una vez en fase de expansión de los cultivos es necesario llevar a cabo su caracterización para corroborar la derivación de líneas homogéneas de células madre multipotentes. Las líneas celulares derivadas presentan la morfología típica mesenquimal. Regularmente las células se someten a un análisis inmunofenotípico para corroborar que cumplen con los paneles de expresión de antígenos descritos por la ISCT (Dominici y cols., Cytotherapy 2007). Por último, para asegurar que las líneas de células madre derivadas de estroma de epiplón cumplen con todos los requisitos marcados por la ISCT, se realizan ensayos de diferenciación celular adipogénica, osteogénica y condrogénica, para corroborar la naturaleza multipotente de estas células.

15 Para asegurar el máximo control y garantía en los ensayos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, las células se cultivan utilizando medios de cultivo comerciales para la inducción de diferenciación a esos linajes celulares (Lonza) y siguiendo los protocolos de trabajo proporcionados por el distribuidor. Para corroborar la capacidad de diferenciación celular se realiza un estudio a tres niveles: morfológico, mediante tinciones específicas para cada tipo celular bien descritas en la bibliografía y análisis de expresión de marcadores de linaje celular específicos. Los resultados de estos análisis se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 345 867 B1

REIVINDICACIONES

1. Célula madre multipotente aislada derivada de estroma de mesenterio de mamífero, **caracterizada** por:
- 5 a) ser positiva para los siguientes antígenos de superficie: CD105, CD90, CD73, CD29, CD49d y CD49a.
b) ser negativa para los siguientes antígenos de superficie: CD45, CD34, CD14 y HLA DR.
- 10 2. Célula madre multipotente según la reivindicación 1 derivada de estroma de epiplón.
3. Célula madre multipotente según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde el mamífero es un humano.
- 15 4. Célula aislada diferenciada a partir de la célula madre multipotente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada.
- 20 5. Célula según la reivindicación 4, **caracterizada** porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada seleccionada de la lista que comprende: condrocito, osteocito, adipocito, miocito, cardiomiocito, neurona, astrocito, oligodendrocito, queratinocito, hepatocito o célula pancreática.
- 25 6. Célula según la reivindicación 5, **caracterizada** porque expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada seleccionada de entre: condrocito, osteocito o adipocito.
7. Población celular aislada que comprende células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Composición farmacéutica que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de la población celular según la reivindicación 7.
- 30 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 que comprende, además, otro principio activo.
- 35 11. Uso de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de la población celular según la reivindicación 7 para la elaboración de un medicamento.
- 40 12. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 11 para la elaboración de un medicamento de terapia celular somática.
13. Uso de la célula o de la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago, hueso, músculo, corazón, sistema nervioso central o periférico, piel, hígado o páncreas.
- 45 14. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 13 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de: cartílago o hueso.
- 50 15. Uso de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de la población celular según la reivindicación 7 para evaluar *in vitro* la respuesta celular a, al menos, un agente biológico o farmacológico.
- 55 16. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 15 donde dicho agente biológico o farmacológico se selecciona de la lista que comprende péptidos, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, partículas virales, hormonas, antibióticos, compuestos inhibitorios, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, mutágenos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas o preparados vacunales.
17. Método de obtención de la célula madre multipotente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende:
- 60 a) obtener una muestra biológica aislada de mesenterio; y
b) seleccionar las células madre multipotentes derivadas de estroma de la muestra biológica obtenida en (a).
- 65 18. Método de obtención de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 que comprende:
- a) obtener una muestra biológica aislada de mesenterio;

ES 2 345 867 B1

- b) seleccionar las células madre multipotentes derivadas de estroma de la muestra biológica obtenida en (a);
y
- 5 c) cultivar las células madre multipotentes de (b) en condiciones que favorezcan la inducción de su diferenciación a células especializadas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG.1

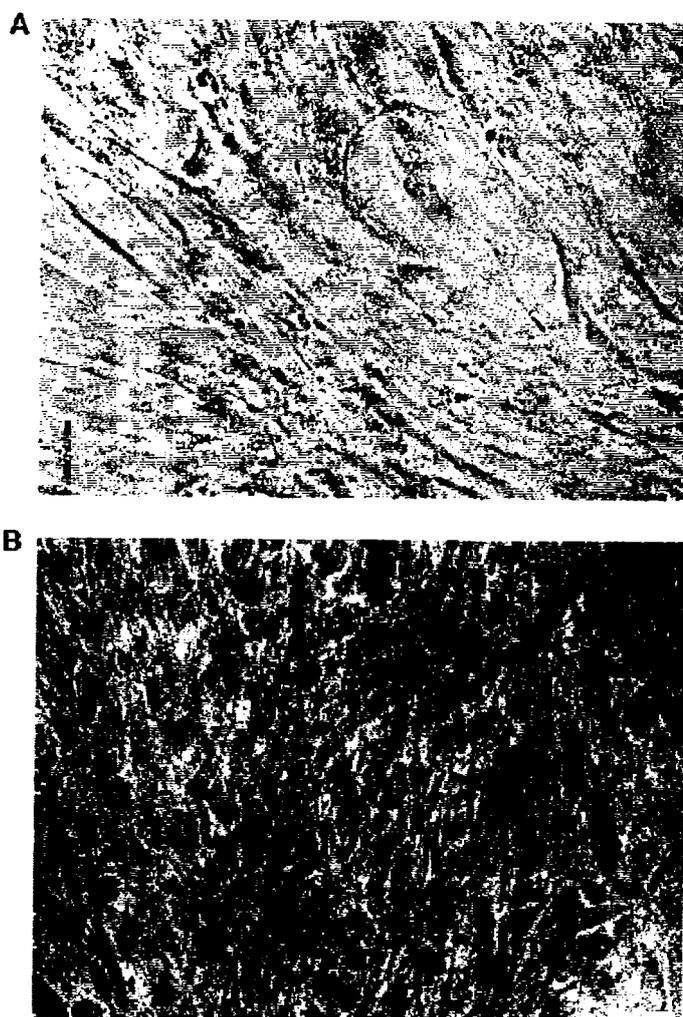


FIG.2

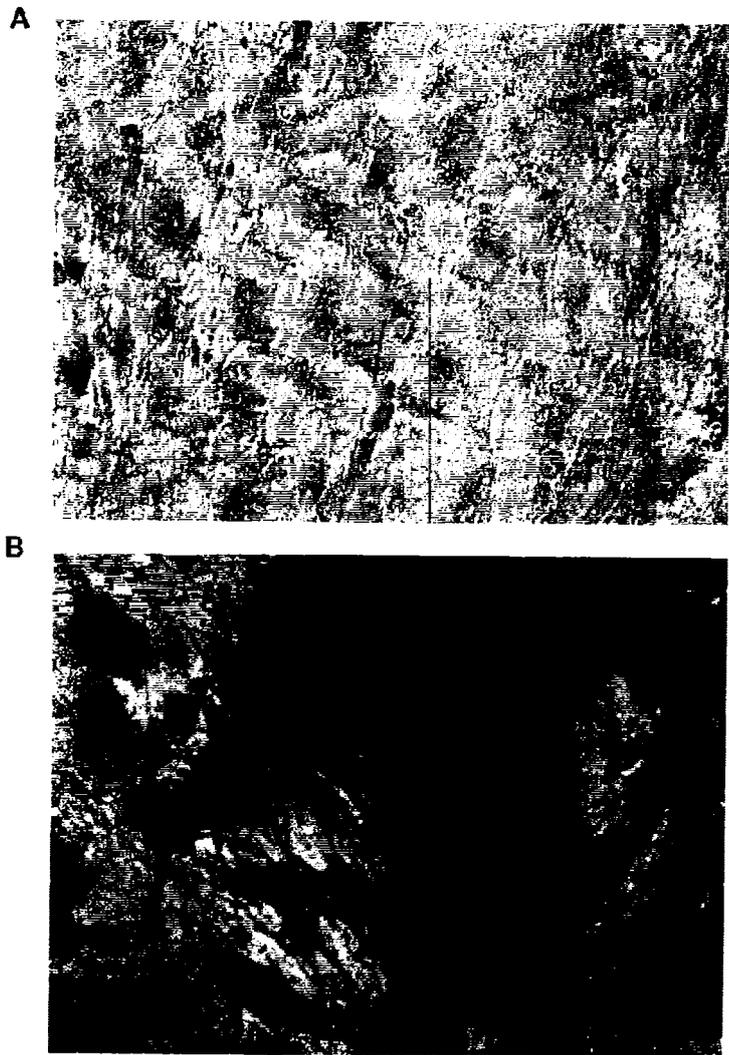
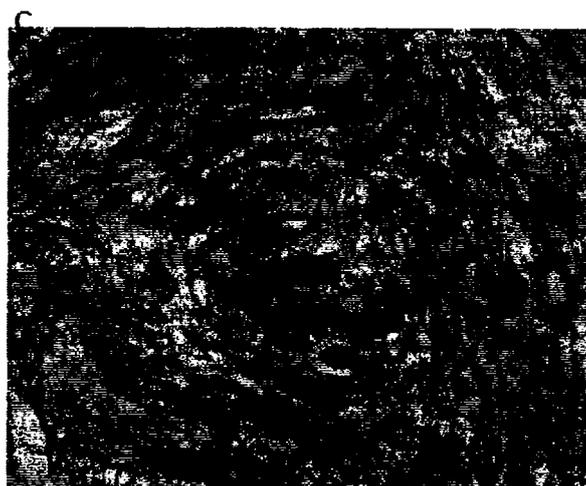


FIG.3





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 867

② Nº de solicitud: 200901046

③ Fecha de presentación de la solicitud: **03.04.2009**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 5/0775** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KEYSER, K.A., et al. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. Cell transplantation. 2007. Vol. 16, nº 5, páginas 55-562. ISSN 0963-6897. Ver todo el documento, especialmente resumen, discusión y figura 1.	1-18
X	BOQUEST, A.C., et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. Molecular biology of the cell. Marzo 2005. Vol. 16, nº 3, páginas 1131-1141. ISSN 1059-1524. Ver todo el documento, especialmente resumen, materiales y métodos (los tres primeros párrafos), y tabla 1.	1-18
X	BOQUEST, A.C., et al. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 2006. Vol. 325, páginas 35-46. ISSN 1064-3745. Ver todo el documento, especialmente resumen e introducción.	1-18
X	LIU, Z., et al. A study on the transdifferentiation of adipose mesenchymal stem cells into hepatocytes. Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology. Agosto 2007. Vol. 15, nº 8, páginas 601-604. ISSN 1007-3418. Resumen. Medline [on line]: United States National Library of Medicine. [recuperado el 16 de junio de 2010]. Recuperado de Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17711631?dopt=Abstract >	1-18
X	ZUK, P.A., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell. Diciembre 2002. Vol. 13, nº 12, páginas 4279-4295. ISSN 1059-1524. Ver todo el documento, especialmente resumen, resultados (primer párrafo) y tabla 2.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.06.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 867

② Nº de solicitud: 200901046

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.04.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 5/0775** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	THOLPADY, S.S., et al. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. Mayo 2003. Vol. 272A, nº 1 páginas 398-402. ISSN 1552-4884. Ver todo el documento, especialmente resumen, materiales y métodos (apartados 1 y 2) y discusión.	1-18
X	SHIMIZU, K., et al. Newly developed primary culture of rat visceral adipocytes and their in vitro characteristics. Cell biology international. Abril 2006. Vol. 30, nº 4, páginas 381-388. ISSN 1065-6995. Ver todo el documento, especialmente resumen, materiales y métodos y discusión.	1-18
X	PEIXING, W.U., et al. Differentiation of stromal-vascular cells isolated from canine adipose tissues in primary culture. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. Enero 2001. Vol. 63, nº 1, páginas 17-23. ISSN 0916-7250. Ver todo el documento, especialmente resumen, materiales y métodos y discusión.	1-18
A	ZUK, P.A., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Engineering. Abril 2001. Vol. 7, nº 2, páginas 211-228. ISSN 1076-3279. Ver todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.06.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/6

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

C12N

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-18	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KEYSER, K.A., et al.	2007
D02	BOQUEST, A.C., et al.	Marzo-2005
D03	BOQUEST, A.C., et al.	2006
D04	LIU, Z., et al.	Agost-2007
D05	ZUK, P.A., et al.	Dic-2002
D06	THOLPADY, S.S., et al.	Mayo-2003
D07	SHIMIZU, K., et al.	Abril-2006
D08	PEIXING, W.U., et al.	Enero-2001
D09	ZUK, P.A., et al.	Abril-2001

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica células madre multipotentes aisladas de mesenterio humano, concretamente de epiplón. Estas células tienen la morfología y las características generales de las células mesenquimales, y son capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares. Reivindica también las células diferenciadas obtenidas a partir de estas células multipotentes, los métodos de obtención de las células multipotentes y las diferenciadas, y su uso terapéutico.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue estas células tal y como están reivindicadas en la solicitud, por lo que ésta se considera nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, en numerosos documentos se describe el aislamiento y caracterización de células madre de tejido adiposo, mediante técnicas muy semejantes a la de la solicitud, y la diferenciación de esas células multipotentes hacia diferentes linajes celulares. Los datos aportados en la presente solicitud para la descripción de las células no permiten diferenciar las células madre reivindicadas de las descritas en los documentos del estado de la técnica, por lo que la obtención del objeto de la solicitud resultaría sería evidente para el experto en la materia, a la luz de lo divulgado en el estado de la técnica anterior. Por tanto, la solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes, como se explica a continuación.

Así, en el documento D01 se describe el aislamiento de células mesenquimales de diversos tejidos, incluyendo el tejido adiposo y el epiplón. Se realiza la caracterización fenotípica de estas células mediante el análisis de los marcadores celulares típicos de células mesenquimales. Del mismo modo que en la solicitud, las células aisladas en D01 expresan los marcadores de superficie característicos de células mesenquimales (CD29, CD105, o CD90, entre otros), y no expresan los marcadores típicos de células hematopoyéticas (CD14, CD34 o CD45) (ver figura 1).

Aunque no se analizan los mismos marcadores en la solicitud y en D01, la expresión de los marcadores analizados coincide en ambos casos, y, en cualquier caso, se trata de marcadores generales de células mesenquimales ampliamente conocidos en el estado de la técnica, que no aportarían actividad inventiva a la solicitud.

Como en la presente solicitud, también en el documento D01 las células madre aisladas son capaces de diferenciarse a osteoblastos y adipocitos.

Aunque en D01 las células se aíslan de epiplón de ratón, el aislamiento de esas células del mismo tejido en humanos resultaría obvio para el experto en la materia, por lo que se considera que la información contenida en D01 afecta la actividad inventiva de la presente solicitud. La diferenciación a otros tipos celulares no confiere actividad inventiva a la solicitud, pues, como el propio solicitante indica, los procedimientos y factores necesarios para inducir la diferenciación de células madre a cualquier linaje celular son ampliamente conocidos en el campo técnico de la solicitud.

Hoja adicional

En el documento D02 se describe igualmente el aislamiento de células madre a partir de tejido adiposo humano. El estudio de los marcadores de superficie de estas células aisladas muestra que son células similares a las reivindicadas en la solicitud, ya que, si bien los marcadores de superficie analizados en la solicitud no coinciden en su totalidad con los estudiados en D02, esto no confiere actividad inventiva a la solicitud, como ya se ha explicado en el caso de D01. Se aprecia una diferencia en la expresión del marcador CD34: las células de la solicitud son negativas para este antígeno y las del documento D02 son positivas en el momento del aislamiento, pero tras el 4º pase pierden este marcador. Ya que en la solicitud no se especifica en qué momento se analiza la presencia de los marcadores, no se ha tenido en cuenta este matiz a la hora de juzgar el efecto que la información divulgada en D02 tiene en la actividad inventiva de la solicitud. Aunque en el documento D02 no se explicita que las células madre se obtengan de epiplón, sí se expone claramente que el tejido adiposo de partida es tejido abdominal, y se obtienen las células de la fracción vascular del estroma del tejido, como en la solicitud (ejemplo 1); por tanto, no supondría un esfuerzo inventivo obtener las células de la solicitud partiendo del tejido adiposo del epiplón humano a partir de lo divulgado en D02, y, en consecuencia, la solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva de la Ley de Patentes.

El documento D03 divulga las mismas células que las descritas en D02, incluyendo, además, protocolos detallados para su aislamiento, caracterización y diferenciación. Por tanto, D03 afecta la solicitud de la misma manera que lo hace D02.

En el documento D04 se aíslan células madre mesenquimales de tejido adiposo de epiplón humano, y se emplea para ello un procedimiento muy semejante al descrito en la solicitud. Además, la expresión de los marcadores de superficie analizados en D04 coincide con la obtenida en la solicitud. Aunque en D04 las células madre obtenidas se diferencian únicamente a hepatocitos, la diferenciación a otros tipos celulares no supone un esfuerzo inventivo, pues son procesos conocidos en el estado de la técnica (ver más arriba). Por tanto, la presente solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en D04.

El documento D05 divulga también la obtención de células madre a partir de estroma de tejido adiposo humano procedente de tratamientos de liposucción, y la diferenciación de las mismas a adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos y células nerviosas. Aunque no se especifica la procedencia exacta de las muestras, las células obtenidas coinciden casi en su totalidad en cuanto a los antígenos de superficie con las células reivindicadas en la solicitud (ver tabla 2 en D05). Por tanto, resultaría obvio para el experto en la materia aplicar el procedimiento de D05 para obtener la población celular de la solicitud a partir de muestras de tejido adiposo de epiplón humano, con unas altas probabilidades de éxito. En consecuencia, D05 afecta la actividad inventiva de la presente solicitud.

En los documentos D06 y D07 las células mesenquimales se obtienen de muestras de tejido adiposo de rata. En D06 se parte de estroma del tejido adiposo visceral que rodea el estómago y el intestino, y en D07, del estroma del tejido adiposo mesentérico. En ningún caso se realizan estudios de los marcadores de superficie, aunque sí se muestra que las células obtenidas tienen características de células mesenquimales, y son capaces de diferenciarse a varios linajes celulares. A pesar de que las muestras no son humanas, la semejanza del tejido de obtención de las células (tejido graso mesentérico) y del procedimiento empleado, implica que resultaría evidente para el experto en la materia llegar al método y a las células de la invención. Por tanto, también los documentos D06 y D07 afectan la actividad inventiva de la solicitud.

En el documento D08 el tejido a partir del cual se obtienen las células madre no es humano, sino canino. Pero, puesto que se parte de estroma de epiplón, como en la solicitud, resultaría evidente para el experto en la materia aplicar esa técnica para la obtención de células madre de epiplón humano. Por ello, la información divulgada en D08 afecta la actividad inventiva de la solicitud.

Por último, en el documento D09 también se describe el aislamiento y diferenciación de células madre a partir de tejido adiposo. Dado que no se define la fuente exacta del tejido, ni los marcadores de superficie de las células obtenidas, no se considera que afecte la actividad inventiva de la solicitud, sino que se trata, más bien, de un documento que divulga conocimientos generales del estado de la técnica.