



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 347 121**

② Número de solicitud: 200901179

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 5/0775** (2000.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **24.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2010**

Fecha de la concesión: **02.09.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **15.09.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**15.09.2011**

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: **Tinahones Madueño, Francisco José;**  
**El Bekay, Rajaa;**  
**Salas Millán, Julian y**  
**Mayas Torres, María Dolores**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Células madre multipotenciales obtenidas del timo de un adulto.**

㉑ Resumen:

Células madre multipotenciales obtenidas del timo de un adulto.

La presente invención se refiere a células madre multipotenciales obtenidas del timo de un adulto y, preferiblemente, del tejido adiposo, 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. Además, la presente invención se refiere al uso de las células adiposas del timo de mamíferos para inducir angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada así como al método para conseguir dicha inducción.

ES 2 347 121 B1

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

**DESCRIPCIÓN**

Células madre multipotenciales obtenidas del timo de un adulto.

5 La presente invención se refiere a células madre multipotenciales derivadas de timo y, preferiblemente, del tejido adiposo, 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. Además, la presente invención se refiere al uso de las células adiposas del timo de mamíferos para inducir angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada así como al método para conseguir dicha inducción.

**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 y células madre adultas. Las células madre embrionarias 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 (US 6.200.806).

30 A pesar de la alta pluripotencialidad de las células madre embrionarias, las terapias basadas en el uso de células madre adultas presentan una serie de ventajas técnicas sobre aquellas basadas en células madre embrionarias. 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. 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 madre embrionarias, la mayoría de ellas son multipotentes lo que significa que pueden diferenciarse a más de un tipo de tejido que proceda de la misma capa embrionaria.

40 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. Con las células multipotenciales derivadas de tejido adiposo, obtenidas de liposucciones y grasa subcutánea se han obtenido rendimientos de derivación más elevados que en el caso de las células procedentes 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 es variable.

45 Actualmente, las células madre multipotenciales tienen un gran potencial de éxito para su uso en terapias de reparación 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.

**50 Explicación de la invención**

55 La presente invención se refiere a células madre multipotenciales derivadas de timo y, preferiblemente, del tejido adiposo, 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. Además, la presente invención se refiere al uso de las células adiposas del timo de mamíferos para inducir angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada así como al método para conseguir dicha inducción.

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

## ES 2 347 121 B1

Los ensayos experimentales (ver ejemplos) demuestran la presencia de células multipotenciales en el tejido adiposo de timo. Por ejemplo, se determina la presencia del marcador PPAR gamma, un factor de transcripción que regula la diferenciación celular, el desarrollo y el metabolismo, relacionado con la diferenciación de células adiposas. Además, los inventores determinan la presencia de otros marcadores de diferenciación de células en adipocitos y de su aumento con la edad de la persona de la que se extrae la muestra, como por ejemplo C/EBPa, FABP4 a ADRP. Para que pueda producirse la diferenciación a células adiposas (adipocitos) debe haber células progenitoras o células multipotenciales. El análisis de los niveles de expresión de los genes que codifican para CD73, CD29 y Thy-1 indica que hay presencia de células multipotenciales.

Además, se demuestra que las células adiposas del timo de donde se extraen las células multipotenciales, son capaces de inducir angiogénesis en células endoteliales aisladas como por ejemplo células endoteliales del cordón umbilical humano. Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, las células adiposas de timo expresan el factor de transcripción relacionado con la angiogénesis VEGF.

Un primer aspecto de la presente invención, se refiere a una célula madre multipotencial aislada, obtenida del timo de un mamífero, caracterizada por expresar ARN mensajero de CD73, CD29 y Thy-1 con niveles superiores a los niveles de las células control. Las células control son células diferenciadas del timo de un mamífero.

La célula madre multipotencial aislada se obtiene del timo de un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano. El timo es un órgano linfóide, y constituye uno de los órganos más importantes del sistema inmunitario del organismo en el cual tiene lugar la diferenciación de los linfocitos indiferenciados procedentes de la médula ósea, convirtiéndolos de este modo en células T maduras. El timo también secreta hormonas y otros factores solubles, que además de controlar la producción y maduración de los linfocitos T en el timo, regulan la actividad y las interacciones de las células T en los tejidos periféricos.

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.*, 2001. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 387-403). Por tanto, el término “célula madre multipotencial” o “células madre multipotenciales”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a célula/s capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria.

El timo procede de la capa embrionaria llamada endodermo. Las células del endodermo dan lugar al aparato digestivo, excepto boca, faringe y la porción terminal del recto, y respiratorio. Forma también las células que tapizan las glándulas que drenan en el tubo digestivo, incluyendo las del hígado y páncreas, el epitelio del conducto auditivo y la cavidad timpánica. También da origen a la vejiga urinaria y parte de la uretra y el epitelio que reviste los folículos de la glándula tiroidea y el timo. Por tanto, una célula madre multipotencial que se obtenga del epitelio que reviste el timo puede dar lugar a cualquier tipo celular que proceda del endodermo.

En una realización preferida, la célula madre multipotencial se obtiene del estroma del tejido adiposo del timo de un mamífero. La célula madre multipotencial puede proceder, pero sin limitarse, de un primate o de un humano. Las células control son células diferenciadas del tejido adiposo del timo, es decir, adipocitos.

La célula madre multipotencial que se obtiene del estroma del tejido adiposo del timo de un mamífero procede del mesodermo. Esta célula madre multipotencial puede dar lugar a cualquier tipo celular que proceda del mesodermo. El tipo celular se selecciona de la lista de tejidos celulares, pero sin limitarse, tejido mesenquimático, conjuntivo o muscular. El tejido mesenquimático se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, tejido óseo, cartilaginoso, adiposo o vascular (células endoteliales, células linfáticas o células sanguíneas). El tejido muscular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, tejido muscular liso, estriado o cardíaco.

En adelante, para hacer referencia a las células madre pluripotenciales del timo o del tejido adiposo del timo de mamífero, se utilizarán los términos “célula/s madre/s multipotencial/es de la presente invención” o “célula/s madre/s multipotencial/es de la invención”.

Otra realización preferida se refiere a la célula aislada diferenciada derivada de la célula madre multipotencial que expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada. La célula especializada parcial o totalmente diferenciada incluye, pero no sin limitarse, linajes celulares propios de los siguientes tejidos y órganos: cartílago, hueso, grasa, músculo, tejido nervioso, piel, hígado o páncreas, por ejemplo la célula especializada se selecciona, pero sin limitarse de la lista que comprende condrocito, osteocito, adipocito, miocito, cardiomiocito, oligodendrocito, queratinocito, hepatocito o célula pancreática. Las células comprendidas en la lista anterior proceden o bien del endodermo o bien del mesodermo, por tanto, la célula madre multipotencial de la presente invención puede diferenciarse, pero sin limitarse, a cualquiera de las células de la lista anterior.

Una realización más preferida se refiere a la célula aislada diferenciada derivada de la célula madre multipotencial, donde la célula especializada se selecciona de la lista que comprende o bien condrocito, o bien osteocito o bien adipocito. La capacidad de diferenciación *in vitro* condrogénica, osteogénica o adipogénica se llevará a cabo mediante el uso de medios de cultivo adecuados. Por ejemplo, los medios de cultivo que favorecen la diferenciación de células

## ES 2 347 121 B1

madre multipotenciales pueden contener señales externas para la diferenciación de la célula como por ejemplo productos químicos secretados por otras células, el contacto físico con las células vecinas, y ciertas moléculas del micro ambiente en el que se encuentran los tipos celulares a los que se quieren diferenciar dichas células madre.

5 En adelante, para hacer referencia a la célula aislada diferenciada derivada de la célula madre multipotencial de la invención, se utilizarán los términos “célula/s diferenciada/s de la presente invención” o “célula/s diferenciada/s de la invención”.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una población celular aislada que comprende o bien células madre multipotenciales de la invención o bien células aisladas diferenciadas derivadas de la célula madre pluripotencial, caracterizadas por expresar ARN mensajero de CD73, CD29 y Thy-1 con niveles superiores a los niveles de las células control. Las células control son células diferenciadas. Preferiblemente, la población celular aislada comprende células madre multipotenciales procedentes de un primate y, más preferiblemente, de un humano. Por tanto, este aspecto de la presente invención se refiere o bien a una población celular de las células madre pluripotenciales de la invención, o bien a una población celular de las células diferenciadas (población celular diferenciada) derivadas de la célula madre pluripotencial de la presente invención.

15 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. Para llevar a cabo la diferenciación celular se emplean técnicas ampliamente conocidas como puede ser, pero sin limitarse, la que se describe en los ejemplos de la presente invención.

20 La célula madre multipotente de la invención, o la población celular de 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. Los 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*.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula/s madre/s multipotencial/es de la presente invención, célula/s diferenciada/s de la presente invención, o cualquiera de las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula/s madre/s multipotencial/es de la presente invención, célula/s diferenciada/s de la presente invención, o cualquiera de las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en terapia celular somática.

35 El término “terapia celular somática” tal como se entiende en la presente invención se refiere a 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 las composiciones farmacéuticas 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; células manipuladas y combinadas con componentes no celulares (por ejemplo, matrices o productos sanitarios biológicos o inertes); 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. En definitiva, el objetivo de la terapia celular somática es restaurar la función de órganos y tejidos dañados como consecuencia de lesiones traumáticas o enfermedades degenerativas. La terapia celular somática no sólo puede ser utilizada para la reparación de tejidos, sino también como un sistema innovador para el suministro de terapias, vehiculadas por las células implantadas en el paciente.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula/s madre/s multipotencial/es de la presente invención, célula/s diferenciada/s de la presente invención, o cualquiera de las poblaciones celulares descritas anteriormente en este documento para su uso en la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de un tejido celular que procede de la capa embrionaria endodermo o mesodermo que se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, tejido celular procedente de cartílago, hueso, músculo, corazón, piel, hígado o páncreas. Preferiblemente el tejido celular se selecciona de entre tejido cartilaginoso, tejido óseo o tejido adiposo.

45 Otra realización preferida se refiere a la composición farmacéutica que comprende, además, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción, distribución o adhesión de cualquiera de las células de la presente invención (sustancia activa), estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así

## ES 2 347 121 B1

pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

Otra realización preferida más se refiere a la composición farmacéutica que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de las células de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las células de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

En otra realización preferida la composición farmacéutica comprende, además, otro principio activo. Esta sustancia activa debe permitir la actividad de cualquiera de las células de la invención, es decir, debe ser compatible.

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

En cada caso la forma de presentación de la composición farmacéutica se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva.

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, spray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión, vía catéter, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. La composición farmacéutica de la presente invención puede ir asociada, por ejemplo, pero sin limitarse, con liposomas o micelas. Un liposoma es una vesícula esférica con una membrana fosfolipídica. El liposoma contiene un núcleo de solución acuosa. La micela es un lípido esférico que contiene material no acuoso. Tanto los liposomas como las micelas pueden utilizarse como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de una célula.

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 produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otros factores, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

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

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.

Una realización preferida 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. La terapia celular

## ES 2 347 121 B1

somática se lleva a cabo en un tejido celular que procede de la capa embrionaria endodermo o mesodermo que se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, tejido celular procedente de cartílago, hueso, músculo, corazón, piel, hígado o páncreas. Preferiblemente el tejido celular se selecciona de entre tejido cartilaginoso, tejido óseo o tejido adiposo.

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. Las lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas se producen en un tejido celular que procede de la capa embrionaria endodermo o mesodermo que se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, tejido celular procedente de cartílago, hueso, músculo, corazón, piel, hígado o páncreas. Preferiblemente el tejido celular se selecciona de entre tejido cartilaginoso, tejido óseo o tejido adiposo.

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.

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 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 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.

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 de células madre multipotenciales, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- a) obtener una muestra biológica aislada de tejido adiposo de timo de mamífero, y
- b) seleccionar la célula madre multipotencial procedente de la muestra biológica obtenida en (a).

Preferiblemente, la muestra biológica aislada procede de un primate y, más preferiblemente, de un humano.

## ES 2 347 121 B1

Es posible obtener una muestra biológica aislada del timo y, preferiblemente, del tejido adiposo del timo, 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 timo y, preferiblemente, de tejido adiposo de timo.

La selección de las células madre multipotentes de la presente invención 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 apartado de ejemplos de la presente invención.

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 de células madre multipotenciales, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- a) Obtener una muestra biológica aislada de tejido adiposo de timo de mamífero,
- b) seleccionar la célula madre multipotencial procedentes de la muestra biológica obtenida en (a); y
- c) cultivar la célula madre multipotencial de (b) en condiciones que favorezcan la inducción de su diferenciación a células especializadas.

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 el experto en la materia.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de al menos una célula adiposa del timo de un mamífero para inducir angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada. Preferiblemente el mamífero es un primate. Más preferiblemente el mamífero es un humano.

La angiogénesis es un proceso morfogenético en el que se generan nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos ya existentes. Para ello, las células endoteliales vasculares tienen que invadir el tejido que las rodea y proliferar en el ápice del nuevo capilar. Ambos procesos, invasión y proliferación, se repiten secuencialmente hasta que la nueva red capilar queda completamente establecida. Inicialmente, ciertas células endoteliales degradan su membrana basal y forman diminutas yemas que penetran en el tejido conectivo perivascular. Estas yemas se forman por migración de células endoteliales a su extremo y por proliferación de otras células endoteliales por debajo del extremo. Al mismo tiempo que las yemas se elongan, se va formando gradualmente en su interior un lumen. De esta forma se van generando tubos huecos que anastomosan unos con otros formando lazos capilares. De los capilares recién formados pueden surgir nuevas yemas dando lugar, eventualmente, a la formación de una red capilar completa.

Una realización preferida se refiere al uso de al menos una célula adiposa del timo de un mamífero, donde la célula endotelial aislada se obtiene de un vaso sanguíneo, capilar o corazón. Según una realización más preferida, la célula endotelial aislada procede de cordón umbilical.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos una célula adiposa del timo de mamíferos para evaluar *in vitro* la respuesta celular angiogénica de al menos una célula endotelial aislada a, al menos, un agente biológico o farmacológico. Los agentes biológicos o farmacológicos han sido descritos a lo largo de esta descripción.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos una célula adiposa del timo de un mamífero.

Una realización preferida se refiere a la composición farmacéutica para su uso en la inducción de angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada. Según una realización más preferida, la célula endotelial aislada se obtiene de un vaso sanguíneo, capilar o corazón. En una realización aún más preferida, la célula endotelial aislada procede de cordón umbilical. Preferiblemente el cordón umbilical es humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de un tejido celular que se selecciona de tejido vascular o tejido cardíaco. Por otra parte, existen muchas patologías dependientes de angiogénesis. La lesión, enfermedad degenerativa o genética se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, artritis reumática, retinopatía diabética, psoriasis, bartonellosis, rechazo de órganos trasplantados, hemorragias o neovascularización ocular.

Una realización preferida se refiere a la composición farmacéutica que comprende, además, un excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según otra realización más preferida, la composición farmacéutica comprende además otro principio activo. Los términos excipiente, vehículo o principio activo ya han sido definidos en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la inducción de angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada que comprende:

- a) Obtener una muestra biológica aislada de timo de mamífero,
- b) seleccionar al menos una célula adiposa procedente de la muestra biológica obtenida en (a), y
- c) cultivar al menos una célula endotelial aislada e incubarla con el producto obtenido en el apartado (b) en condiciones que favorezcan la migración y proliferación de dicha célula endotelial.

Preferiblemente, la muestra biológica aislada procede de un primate y, más preferiblemente, de un humano.

Una realización preferida se refiere al método para la inducción de angiogénesis, donde la célula endotelial aislada se obtiene de un vaso sanguíneo, capilar o corazón. Según una realización más preferida del método, la célula endotelial aislada procede de cordón umbilical.

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.

### Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra que el tejido adiposo del timo tiene una capacidad adipogénica similar o superior a la grasa visceral.

Fig. 2. Muestra que el tejido adiposo del timo de humanos incrementa su capacidad adipogénica a medida que se incrementa la edad del paciente.

Fig. 3. Muestra que un extracto de timo tiene capacidad de inducir la migración y la proliferación de las células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC).

Fig. 4. Muestra que el tejido adiposo del timo humano tiene marcadores de angiogénesis y linfangiogénesis similares a la grasa subcutánea y visceral.

Fig. 5. Muestra la identificación inmunohistoquímica de la expresión de VEGF en el tejido adiposo del timo humano.

Fig. 6. Muestra el crecimiento vascular en adipocitos del timo humano mediante análisis inmunohistoquímico.

### 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

*Caracterización y aislamiento de células multipotenciales obtenidas de tejido adiposo del timo humano. Detección de marcadores de diferenciación celular*

*1.1. Análisis por PCR a tiempo real de la expresión génica de los genes que codifican para diferentes marcadores de las células multipotenciales en el tejido adiposo del timo humano*

Se analizó la expresión génica del ARN mensajero (ARNm) de los siguientes marcadores:

- CD31: Marcador de células endoteliales y progenitores endoteliales.
- CD73 y CD29: marcadores de células multipotenciales de tejido adiposo.
- Thy-1 (también conocido como CD90): marcador de células multipotenciales y preadipocitos.

Se encontró que el tejido adiposo del timo expresa niveles considerables de todos estos marcadores, lo que indica claramente la presencia de células multipotenciales en dicho tejido.

## ES 2 347 121 B1

### 1.2. Aislamiento de células multipotenciales a partir del tejido adiposo del timo de un humano adulto

A pesar de los múltiples protocolos existentes para aislar y expandir células multipotenciales y de los diferentes enfoques para caracterizar las células, el Comité de Células Madre Mesenquimales y de Tejido de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular ha establecido unos criterios mínimos.

Primeramente, las células multipotenciales presentan adherencia al plástico de cultivo cuando se mantienen en condiciones estándar de cultivo. Además esta población expresa marcadores tales como CD105, CD73 y CD90 en un porcentaje superior al 95% y no expresan CD45, CD 34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 y moléculas de superficie HLA-DR, o no estar presentes en más del 2% de la población.

Una vez extraído el tejido del paciente, se procedió al procesamiento de este, que ya se ha optimizado en un breve periodo de tiempo ( $\leq 2$  horas).

Sobre placa de petri se lavó el tejido con una solución compuesta por *Hank's Balanceó Saline Solution* (HBSS) con el 2% de antibiótico/antimicótico (PAA) y se troceó minuciosamente con el fin de digerirlo y aislar el estroma, principal fuente de células madre multipotenciales de los adipocitos del tejido adiposo del timo. Tras un par de lavados con esta misma solución, la masa grasa de timo se incubó a 37°C durante 30 minutos con una solución de colagenasa I (GIBCO) al 0.075% que liberó el estroma.

Pasado este tiempo de incubación la acción de la colagenasa I se paralizó al añadir un medio de cultivo (*Dulbecco's Modified Eagle Media F12* - DMEM F12) suplementado con el 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) y el 1% de antibiótico/antimicótico (PAA). Al centrifugar todo ello a 1200 rpm durante 10 minutos se obtuvo un pellet, que correspondía al estroma.

El pellet se resuspendió en tampón de lisis de eritrocitos (GIBCO) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalizado el tiempo de incubación se filtró la suspensión de células con una malla de nylon de 100  $\mu\text{m}$  que eliminó los restos y se volvió a centrifugar a 1200 rpm, esta vez durante 5 minutos.

El pellet obtenido, que correspondió con las células multipotenciales, se resuspendió en un medio de cultivo constituido por DMEM F12 + 10% FBS + 1% antibiótico/antimicótico. En este caso se utilizó un medio sin glutamina que se suplementó con L-glutamina estable (PAA). Esta suspensión de células en medio de cultivo se sembró en frascos que se dejaron durante toda la noche a 37°C en estufa con un 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Pasado el tiempo indicado, se lavó con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) dos veces, con el fin de eliminar las células que no se adhirieron al plástico del frasco.

Cuando las células crecieron en el frasco y se vio que han alcanzado una confluencia mayor al 70% de la superficie y que tenían fenotipo típico, se procedió al pase o pasaje. En este caso se utilizó *Accutase-Solution* (PAA) para despegar las células del frasco. El medio de expansión multipotencial utilizado es *MesenCult Human Basal Medium* suplementado con *MesenCult Human Supplement* (PAA). De esta manera las células se mantuvieron durante los pases de cultivo posteriores.

### 1.3. Capacidad adipogénica del tejido adiposo del timo

En la Fig. 1 se muestra el análisis de la expresión del ARNm y de las proteínas de los receptores proliferativos activados por ligando (PPAR- $\gamma$ , de las siglas en inglés de *peroxisome proliferator activated receptor*) en tejido adiposo del timo (TAT) y comparada con la expresión en el tejido adiposo visceral (VAT) y subcutáneo (SAT) humanos. PPAR- $\gamma$  es un factor de transcripción que regula la diferenciación celular, el desarrollo y el metabolismo. Este factor se ha relacionado ampliamente con la diferenciación de células adiposas y, por ende, parece actuar de inhibidor de la angiogénesis.

En la Fig. 1A se representan los resultados de la PCR a tiempo real de las isoformas de PPAR- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ 1 & PPAR- $\gamma$ 2) en tejido adiposo humano tímico (TAT), subcutáneo (SAT) y visceral (VAT). La PCR a tiempo real se lleva a cabo usando sondas Taq Man. La expresión génica se ha normalizado con la expresión del gen endógeno ciclofilina (Cyc). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM de experimentos hechos por triplicado con una n=26. En la Fig. 1B se muestra el análisis de westerblotting de PPAR- $\gamma$ . La gráfica debajo del gel de proteínas representa los análisis densitométrico del ratio PPAR- $\gamma$  /  $\beta$ -actin. \* significa que p < 0,05.

### 1.4. Determinación de la presencia de marcadores de diferenciación de células en adipocitos y de su aumento con la edad

En la Fig. 2 se muestran los resultados de la PCR a tiempo real de los genes indicadores de la presencia de mecanismos de adipogénesis en el tejido adiposo del timo humano (c/EBPa, PPAR $\gamma$ , FABP4 y ADRP) procedente de tres grupos de pacientes separados por la edad. La expresión génica se normalizó con la expresión del gen endógeno ciclofilina (Cyc). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM de experimentos hechos por triplicado con una n=8 en cada grupo.

-C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  son dos factores de transcripción indicadores de la adipogénesis y la generación de nuevos adipocitos.

-FABP4 (*fatty acid binding protein 4, adipocyte*) es un marcador específico de preadipocitos y adipocitos

-ADRP (*Adipose Differentiation Related Protein*) Marcador indicador del principio de la diferenciación de los adipocitos.

En las gráficas Fig. 2A-D se demuestra que la adipogénesis va aumentando conforme se va avanzando en la edad. Lo que indica que la degeneración de la glándula tímica en el adulto provoca el reemplazamiento de las células inmunogénicas del timo por adipocitos. Para que pueda haber diferenciación celular debe haber células progenitoras o células multipotenciales.

## Ejemplo 2

### *Uso de células adiposas del timo para inducir angiogénesis*

Por definición, la angiogénesis es el proceso de extensión de vasos sanguíneos ya formados por gemación de nuevos capilares a través de la migración y proliferación de células endoteliales previamente diferenciadas.

#### *2.1. Demostración de que el extracto de timo induce la angiogénesis (migración y proliferación) de células endoteliales de cordón umbilical*

En la Fig. 3 se muestra la capacidad de un extracto de timo humano para inducir la proliferación y la migración de las células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*).

La Fig. 3A muestra la vista microscópica de las células HUVEC al comienzo del cultivo celular en las primeras 24 horas. La Fig. 3B muestra las células HUVEC cultivadas después de 72 horas. Las células semiconfluentes se utilizaron para el análisis de la migración y la proliferación. La Fig. 3C muestra el efecto de extracto de tejido adiposo del timo sobre la migración de las células HUVEC. A las células de la mitad superior de la cámara se les permitió emigrar a través de una membrana porosa hacia la cámara baja. El control corresponde a una muestra de células HUVEC con un medio de cultivo sin adición de extracto de tejido adiposo del timo. La muestra denominada "suero" corresponde con una muestra de células HUVEC con un medio de cultivo suplementado con suero. La Fig. 3D muestra el efecto de extracto de tejido adiposo de timo sobre la proliferación de las células HUVEC. Las células subconfluentes se mantuvieron en medio sin suero y se incubaron en ausencia o en presencia de cantidades crecientes de extracto de tejido adiposo de timo (T1, T2, T3). \*  $p < 0,05$  frente a control,  $p < 0,05$  frente a T2. \*\*  $p < 0,01$ .

#### *2.2. Determinación de los niveles de ARNm y proteína VEGF en el tejido adiposo del timo*

En la Fig. 4 se muestra la expresión del ARNm y de las proteínas de los diferentes subtipos del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) en el tejido adiposo del timo comparado con otros dos tipos de tejido adiposo, el visceral y el subcutáneo humanos.

En la Fig. 4A se muestran los resultados de la PCR a tiempo real de las isoformas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D en tejido adiposo humano del timo (TAT), subcutáneo (SAT) y visceral (VAT) usando sondas Taq Man. La expresión génica se normalizó con la expresión del gen endógeno ciclofilina (Cyc). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM de experimentos hechos por triplicado con una  $n=26$ . En la Fig. 4B se muestra el análisis de westerblotting de las isoformas del VEGF usando anticuerpos específicos. La gráfica debajo del gel de proteínas representa los análisis densitométrico del ratio VEGF /  $\beta$ -actin. \* significa que  $p < 0,05$ .

#### *2.3. Pruebas inmunohistoquímicas que demuestran la presencia de factores angiogénicos (VEGF) o el crecimiento vascular en adipocitos tímicos*

En la Fig. 5 se muestran los resultados de las pruebas inmunohistoquímicas que indican la presencia de factores VEGF tipo A, B, C o D en muestras de tejido adiposo de timo, tejido adiposo subcutáneo (SAT) o tejido adiposo visceral (VAT). Las células se marcaron con anticuerpos específicos frente a cada uno de los tipos de factor VEGF. El control negativo corresponde a los núcleos marcados con hematoxilina. Esta demostrado que los factores VEGF tipo A, B, C o D tienen capacidad angiogénica y linfangiógena.

En la Fig. 6 se muestra el crecimiento vascular en adipocitos del timo de humanos.

# ES 2 347 121 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula madre multipotencial aislada obtenida del estroma del tejido adiposo del timo de un mamífero, **carac-  
terizada** por expresar ARN mensajero de CD73, CD29 y Thy-1 con niveles superiores a los niveles de las células control.
2. Célula madre multipotencial según la reivindicación 1, donde el mamífero es un humano.
- 10 3. Célula aislada diferenciada derivada de la célula madre multipotencial según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que expresa, al menos, una característica propia de una célula especializada.
4. Célula aislada diferenciada derivada de la célula madre multipotencial según la reivindicación 3, donde la célula especializada se selecciona de la lista que comprende condrocito, osteocito o adipocito.
- 15 5. Población celular aislada que comprende células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Composición farmacéutica que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la población celular según la reivindicación 5.
- 20 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6 que comprende, además, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que comprende, además, otro principio activo.
- 30 10. Uso de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de la población celular según la reivindicación 5 para la elaboración de un medicamento.
11. Uso de la célula o de la población celular según la reivindicación 10 para la elaboración de un medicamento de terapia celular somática.
- 35 12. Uso de la célula o de la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde el medicamento se utiliza para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de tejido cartilaginoso, tejido óseo o tejido adiposo.
- 40 13. Uso de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de la población celular según la reivindicación 5 para evaluar *in vitro* la respuesta celular a, al menos, un agente biológico o farmacológico.
14. Método de obtención de la célula madre multipotencial según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende:
  - 45 a) Obtener una muestra biológica aislada de tejido adiposo de timo de mamífero, y
  - b) seleccionar la célula madre multipotencial procedente de la muestra biológica obtenida en (a).
- 50 15. Método de obtención de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 que comprende:
  - a) Obtener una muestra biológica aislada de tejido adiposo de timo de mamífero,
  - 55 b) seleccionar la célula madre multipotencial procedentes de la muestra biológica obtenida en (a); y
  - c) cultivar la célula madre multipotencial de (b) en condiciones que favorezcan la inducción de su diferenciación a células especializadas.
- 60 16. Uso de al menos una célula adiposa del timo de un mamífero para inducir angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada.
17. Uso según la reivindicación 16 donde la célula endotelial aislada se obtiene de un vaso sanguíneo, capilar o corazón.
- 65 18. Uso según la reivindicación 16, donde la célula endotelial aislada procede de cordón umbilical.

## ES 2 347 121 B1

19. Uso de al menos una célula adiposa del timo de mamíferos para evaluar *in vitro* la respuesta celular angiogénica de al menos una célula endotelial aislada a, al menos, un agente biológico o farmacológico.

20. Composición farmacéutica que comprende al menos una célula adiposa del timo de mamíferos.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20 que comprende, además, un excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21 que comprende, además, otro principio activo.

23. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 para la inducción de angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada.

24. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 23 donde la célula endotelial aislada se obtiene de un vaso sanguíneo, capilar o corazón.

25. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 23, donde la célula endotelial aislada procede de cordón umbilical.

26. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de lesiones, enfermedades degenerativas o genéticas de tejido vascular o tejido cardíaco.

27. Método para la inducción de angiogénesis en al menos una célula endotelial aislada que comprende:

a) Obtener una muestra biológica aislada de timo de mamífero,

b) seleccionar al menos una célula adiposa procedente de la muestra biológica obtenida en (a), y

c) cultivar al menos una célula endotelial aislada e incubarla con el producto obtenido en el apartado (b) en condiciones que favorezcan la migración y proliferación de dicha célula endotelial.

28. Método para la inducción de angiogénesis según la reivindicación 27, donde la célula endotelial aislada se obtiene de un vaso sanguíneo, capilar o corazón.

29. Método para la inducción de angiogénesis según la reivindicación 27, donde la célula endotelial aislada procede de cordón umbilical.

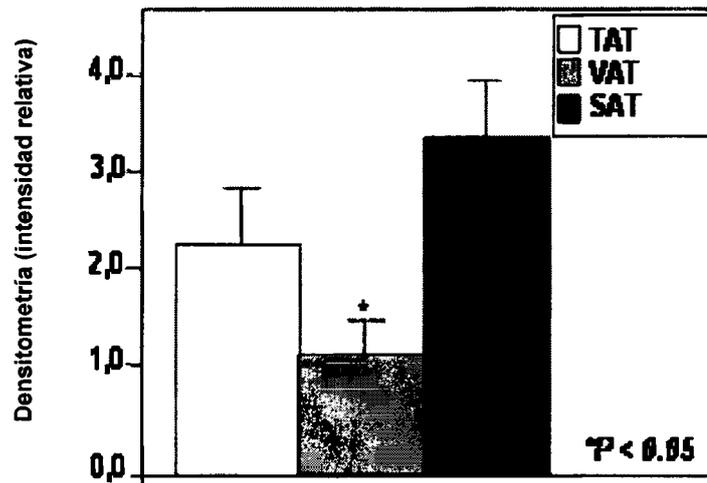
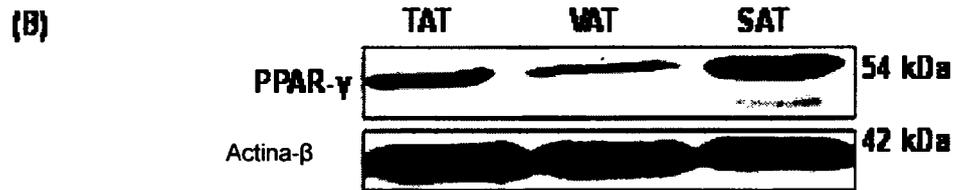
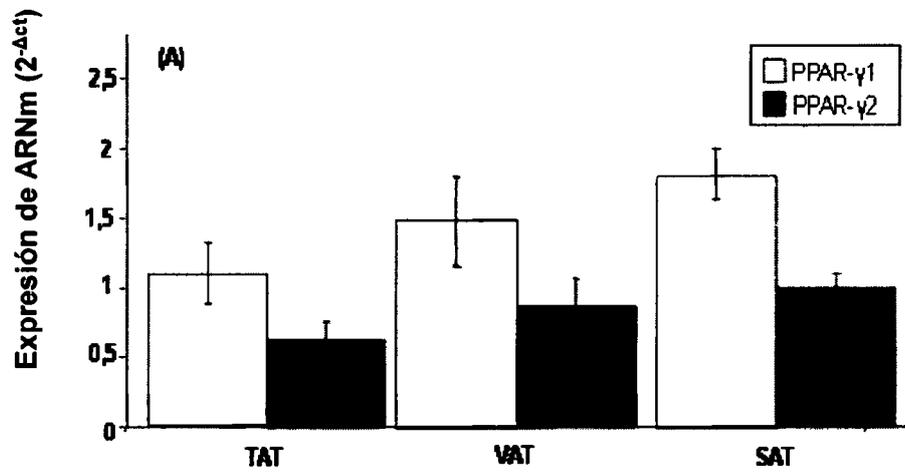


FIG. 1

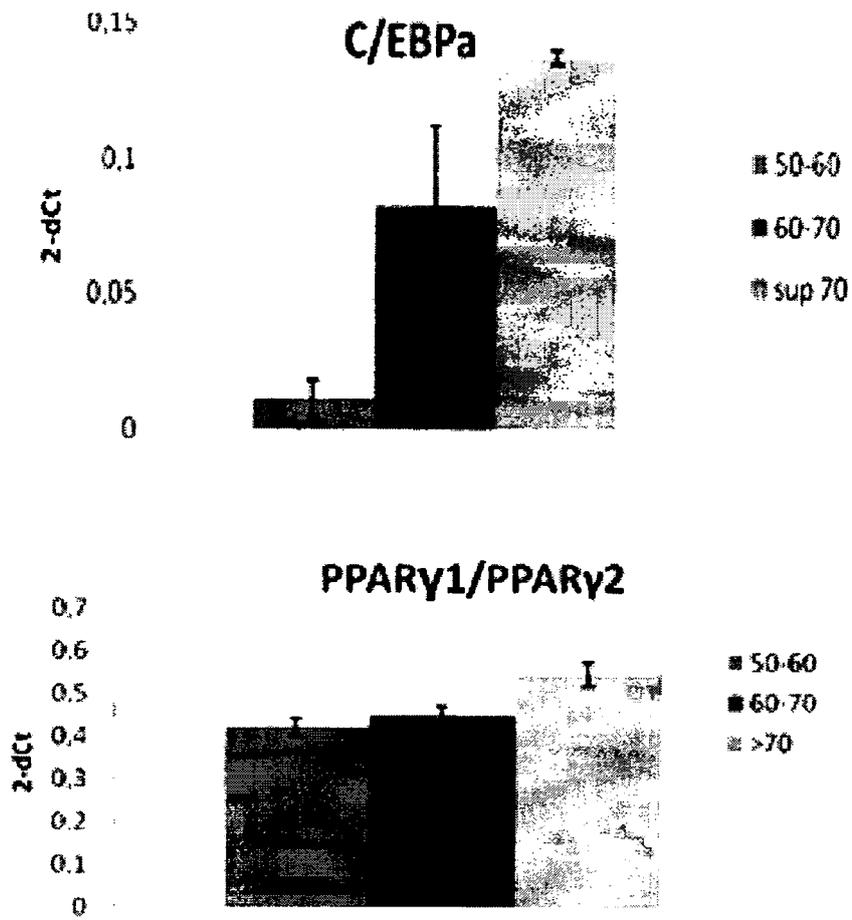
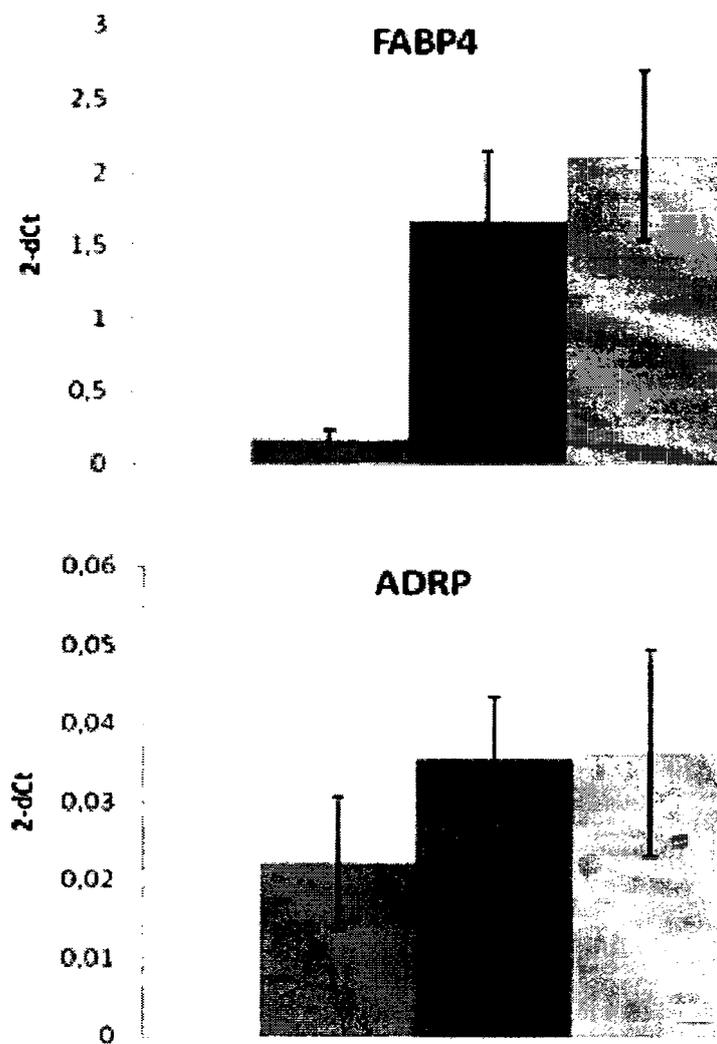


FIG. 2 (A)



**FIG. 2 (B)**

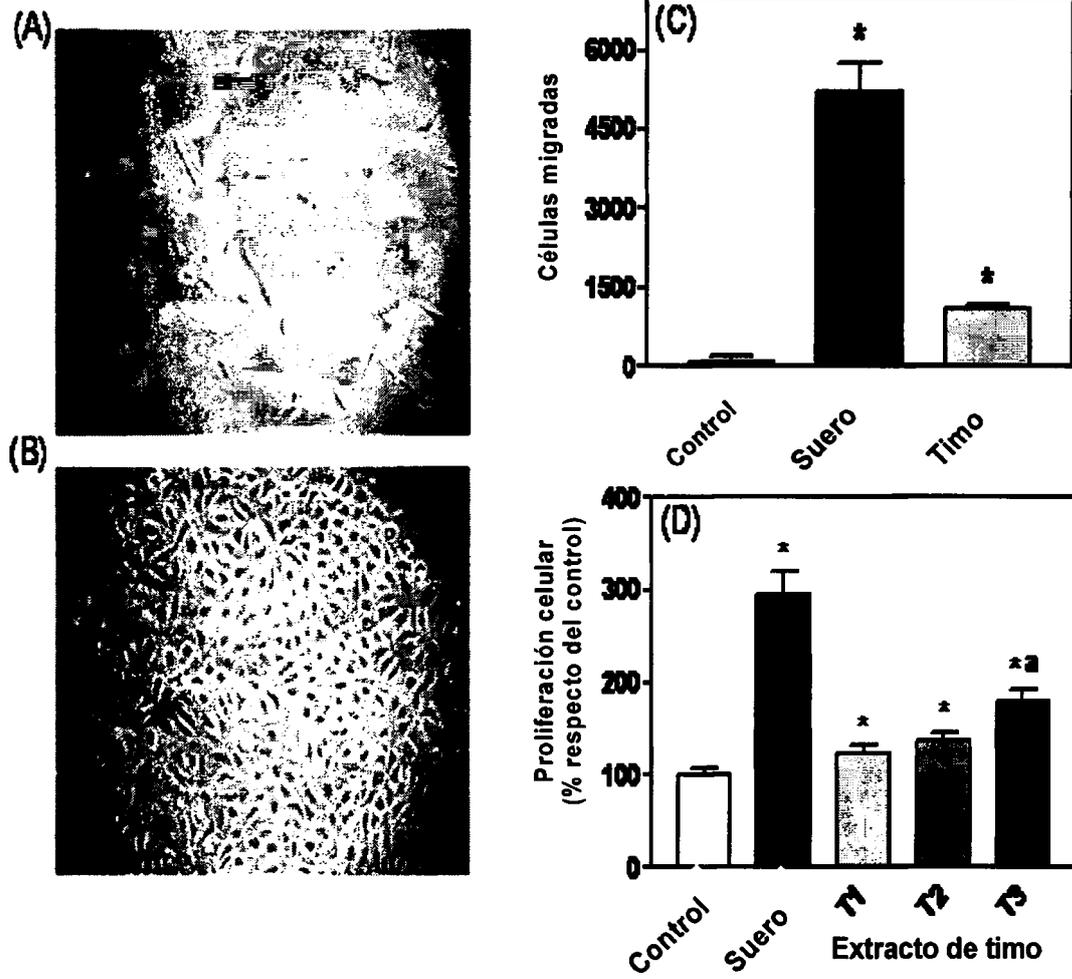
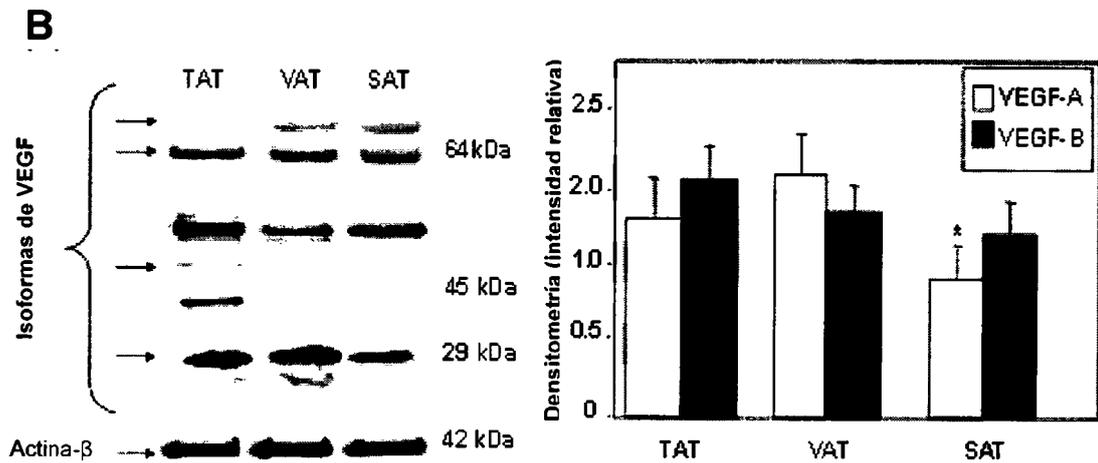
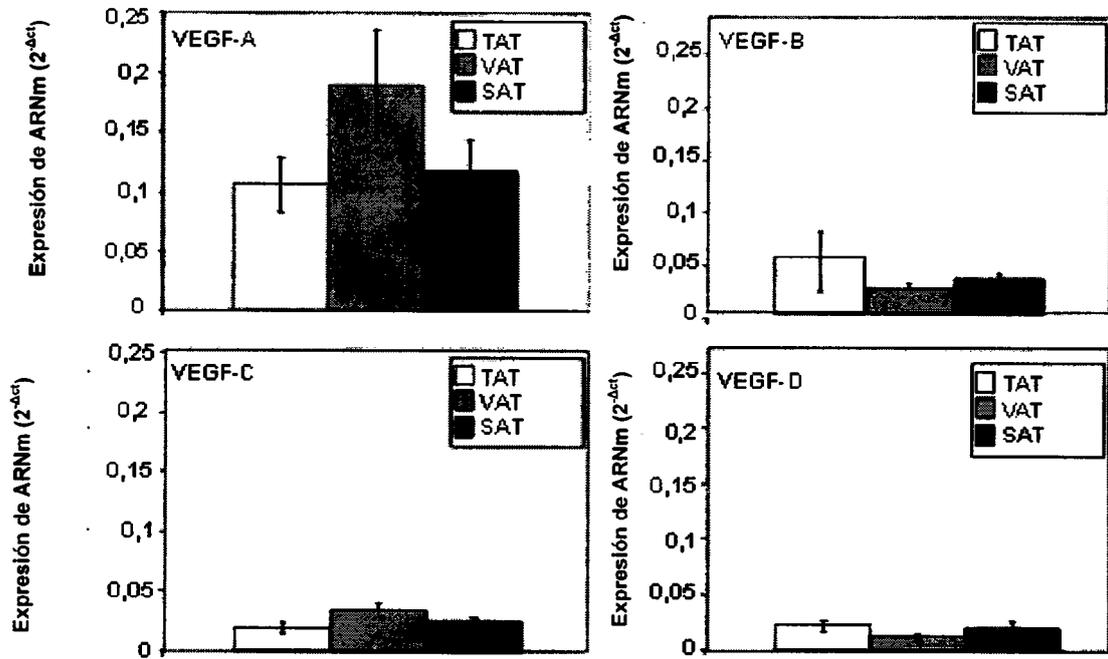
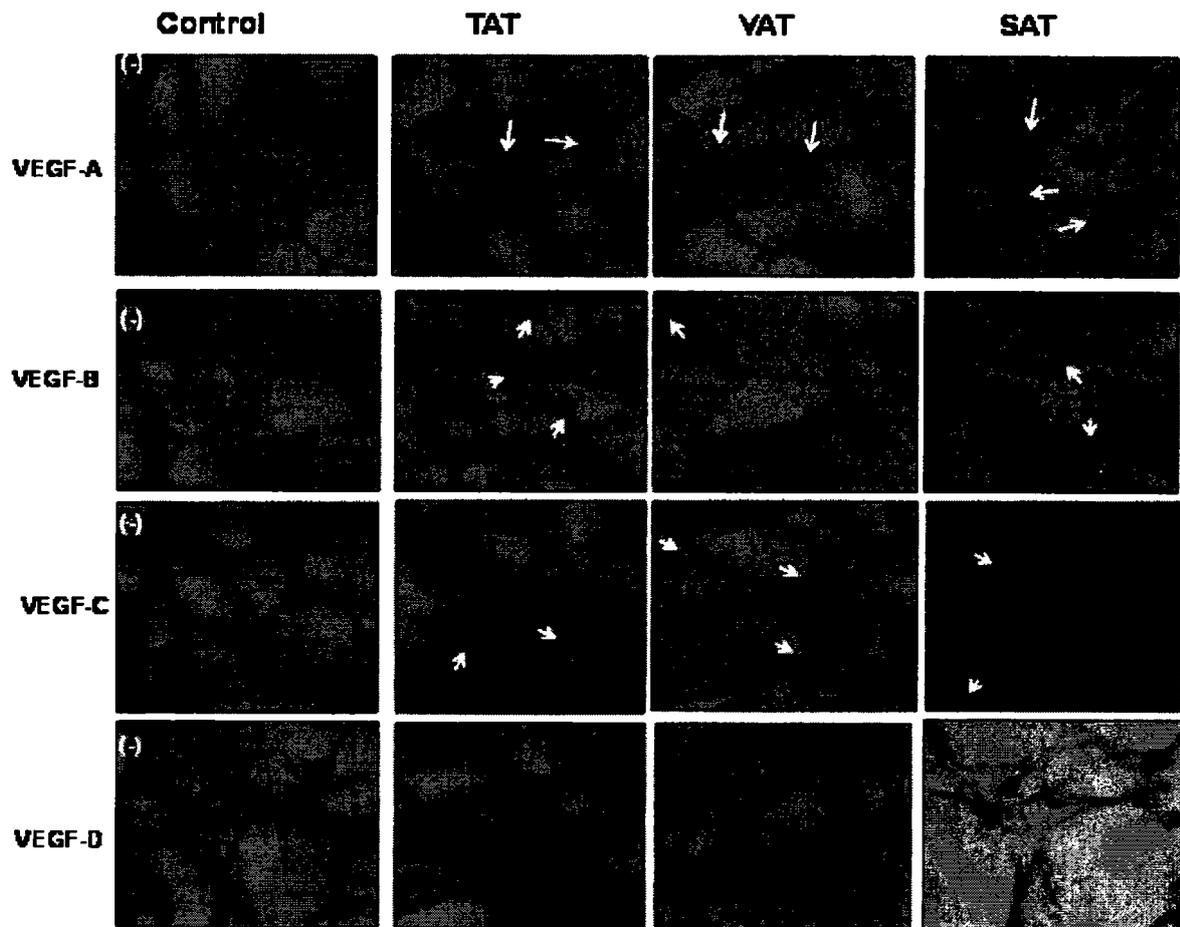


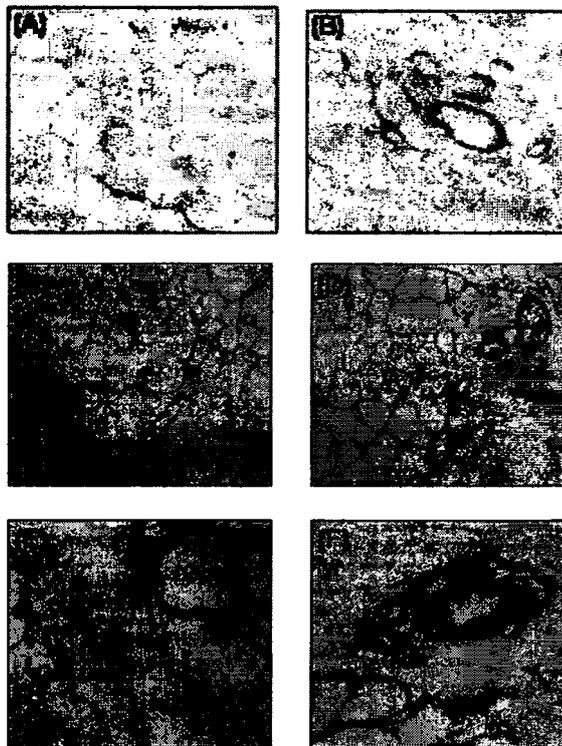
FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 121

② Nº de solicitud: 200901179

③ Fecha de presentación de la solicitud: **24.04.2009**

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
A	KRAMPERA, M., et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. Bone. Feb 2007. Vol. 40, nº 2, páginas 382-390. ISSN 8756-3282. Ver todo el documento, especialmente resumen, materiales y métodos, resultados (primer apartado) y figura 2.	1-15
A	COVAS, D.T., et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. Experimental hematology. May 2008. Vol. 36, nº 5, páginas 642-654. ISSN 0301-472X. Ver todo el documento, especialmente resumen, introducción y resultados (apartados 1 y 2).	1-15
A	MÜLLER, S.M., et al. Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. Journal of immunology. 15-04-2008. Vol. 180, nº 8, páginas 5344-5351. ISSN 0022-1767. Ver resumen y páginas 5357 y 5348.	16-29

#### 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

01.07.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/4

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: 01.07.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-29	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-29	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	KRAMPERA, M., et al.	Febr-2007
D02	COVAS, D.T., et al.	Mayo-2008
D03	MÜLLER, S.M., et al.	15-04-08

**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 una célula madre multipotencial aislada del estroma de tejido adiposo de timo de mamífero, concretamente de humano, que expresa los antígenos de superficie CD73, CD29 y Thy-1 a niveles superiores que los de las células control. La solicitud reivindica también las células diferenciadas obtenidas a partir de dicha célula madre, y los métodos de obtención de las células madre y las diferenciadas, además de las composiciones farmacéuticas que contienen cualquiera de estas células, y su uso en terapia celular somática. La solicitud reivindica asimismo el uso de una célula adiposa de timo de mamífero para inducir angiogénesis en células endoteliales aisladas, las composiciones farmacéuticas que contienen estas células adiposas, y su uso terapéutico.

No se ha encontrado ningún documento del estado de la técnica que divulgue células madre obtenidas de estroma de tejido adiposo de timo de mamíferos, ni el uso de células adiposas de timo para favorecer la angiogénesis, por lo que el objeto de la solicitud de patente, tal y como está reivindicado, se considera nuevo y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Los tres documentos citados en este informe se consideran relacionados con el objeto de la invención, pero no afectan los requisitos de patentabilidad mencionados anteriormente.

Así, en el documento D01 se aíslan células madre mesenquimales de muestras de timo humano (entre otros tejidos). Puesto que no se describe claramente si las células se aíslan concretamente del estroma del tejido adiposo del timo, este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, aunque las células obtenidas expresan los marcadores de la reivindicación 1 de la solicitud, y, como las células de la solicitud, son capaces de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

En el documento D02 se divulga también la obtención de células madre mesenquimales a partir de timo fetal, y se estudia su capacidad de diferenciación a adipocitos, condrocitos y osteocitos. Puesto que en la presente solicitud las células reivindicadas proceden del estroma de tejido adiposo de timo de adulto, el documento D02 no tampoco afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Por último, en el documento D03 se demuestra que las células mesenquimales aisladas del estroma de timo de ratón expresan el factor de crecimiento endotelial A (VEGF-A) y, por consiguiente, estimulan la vascularización del timo. De nuevo, al no coincidir exactamente el tejido de partida, no se puede considerar que las células empleadas en D03 sean las mismas que las de la solicitud, por lo que no se considera que el documento D03 afecte la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 16 a 29 de la solicitud.