



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 360 434**

⑯ Número de solicitud: **200930488**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 5/074** (2010.01)

**A61K 35/32** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑯ Fecha de presentación: **21.07.2009**

⑰ Solicitante/s:  
**Universitat Internacional de Catalunya**  
c/ Immaculada, 22  
08017 Barcelona, ES

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2011**

⑰ Inventor/es: **Ferrés Padró, Eduardo;**  
**Casals Farré, Núria;**  
**Al-Atari Abou-Asi, Maher y**  
**Jiner Tarrida, Lluis**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**06.06.2011**

⑰ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑯ Título: **Células madre pluripotenciales obtenidas a partir de la pulpa dental.**

⑰ Resumen:

Células madre pluripotenciales obtenidas a partir de la pulpa dental con capacidad de diferenciarse en tejidos de las tres capas embrionarias, endodermo, mesodermo y ectodermo.

## DESCRIPCIÓN

Células madre pluripotenciales obtenidas a partir de la pulpa dental.

5 La presente invención está relacionada con células madre pluripotenciales obtenidas de la pulpa dental de pacientes de diferentes edades y su aplicación en la regeneración de tejidos.

### Estado de la técnica

10 En los seres vivos, los tejidos sufren, a lo largo de la vida un desgaste, pero tienen capacidad de autorenovarse. De no existir esta renovación, se reduciría considerablemente la esperanza de vida de los seres vivos. En concreto son las células madre las que tienen esta capacidad de autorenovación de los tejidos. La capacidad de autorenovación se plasma, en la capacidad de producir más células madre y, por otro lado, de generar células de uno o más tipos celulares diferenciados.

15 El descenso replicativo de células madre implica la degeneración y muerte de los distintos tejidos, ya sea de manera aguda (infartos) o crónica (degeneración-envejecimiento).

20 Por la capacidad de autorenovación citada, actualmente se aplica la terapia celular con células madre, entre otras en: patologías cardíacas, patologías de la córnea, patologías del suelo pélvico. También se tratan fistulas especialmente en enfermos de Crohn.

25 Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en: totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales.

30 Las células madre totipotentes pueden crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares.

35 Las células madre multipotentes son aquellas que sólo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen (por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otras).

40 Las células madre pluripotenciales no pueden formar un organismo completo, pero pueden diferenciarse en células provenientes de los tres linajes embrionarios: (a) ectodermo, que es el origen del sistema nervioso, el sistema respiratorio, tubo digestivo superior (estomago), la epidermis y sus anexos (pelo y uñas) y las glándulas mamarias; (b) endodermo, que es el origen del intestino, el hígado, el páncreas, los pulmones y la mayor parte de los órganos internos; (c) y mesodermo, que es el origen del sistema esquelético, los músculos, y los sistemas circulatorio y reproductor. Igualmente, pueden formar cualquier otro tipo de célula proveniente del germinal y el saco vitelino.

45 El hecho de que las células pluripotenciales tengan la capacidad de diferenciarse en un número tan elevado de tejidos, las hace de especial interés para el diseño de nuevas terapias, en general, y de terapias regenerativas, en particular.

50 Actualmente, las células madre pluripotenciales en individuos adultos se obtienen principalmente de médula ósea.

55 Es bien conocido en el estado de la técnica, que cuando se lleva a cabo el aislamiento y caracterización de las células madre pluripotenciales a partir de la muestra de médula ósea extraída, existen diferentes criterios bien establecidos en el estado de la técnica que permiten clasificar de manera clara a una célula madre como célula pluripotencial.

60 Un primer criterio sería determinar la capacidad de diferenciación de la célula aislada a tejidos que proceden de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) usando medios de diferenciación disponibles comercialmente, (cfr. Prell *et al.*, “Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species, present status and future prospects”, *Cell Tissues Organs*, 1999, vol 165, pág. 220-236).

65 55 Un segundo criterio consistiría en identificar los marcadores que expresa la célula madre aislada.

60 Por ejemplo la expresión del gen OCT3/4 ha sido descrita como necesaria para que una célula madre sea pluripotencial (cfr. Niwa *et al.*, “Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells”, *Nature*, 2000 vol. 24, pág. 372-376). La expresión de SSEA4 en células pluripotenciales ha sido descrita en (cfr. Venable *et al.*, “Lectin binding profiles of SSEA-4 enriched, pluripotent human embryonic stem cell surfaces” *BMC Dev Biol.* 2005, vol 21, pág. 5-15), y la expresión de CD13 igualmente en células pluripotentes se cita en (cfr. Young *et al.*, “Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers cd10, cd13, cd56, and mhc class-I”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999 vol. 221, nº 1, pp. 63-7)

Jiang y colaboradores (cfr. Jiang *et al.*, “Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow”, *Nature*, 2002, vol 418, pág. 41-47), han descrito la caracterización de células madre pluripotenciales en una población

celular de la médula ósea. Esta población son las denominadas MAPC (Células progenitoras multipotenciales adultas). En este artículo se indica que las MAPCs expresan niveles altos de CD13, SSEA-4 y OCT3/4, marcadores propios de células pluripotenciales. Al igual que las células madre embrionarias, en las MAPCs se detecta la activación de los factores de transcripción OCT-4, NANOG y REX-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado.

Adicionalmente, se incluyen ensayos de clonación que demuestran que es una única célula la que es capaz de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo o ectodermo). A diferencia de las células de la invención, estas células no expresan el gen CD105 y sí expresan el gen CD44 y CD73.

10 El origen de estas células es mesodérmico, mientras que el origen de las células de la invención es ectodérmico.

La fuente de células madre pluripotenciales que describe este artículo es la médula ósea. En las extracciones de células madre de médula ósea es necesario una anestesia general o local. El método que se emplea para obtenerlas es el aspirado del contenido medular mediante la punción de un hueso. El material que se obtiene pasa por una serie de 15 procesos de cribado para separar las células. Todo esto hace que la obtención de estas células sea un proceso complejo y poco eficiente.

Por todo lo anterior existe la necesidad de encontrar fuentes alternativas a partir de las cuales se puedan extraer 20 células madre pluripotenciales.

## 20 **Explicación de la invención**

Los investigadores de la presente invención han descubierto que la pulpa dental es una fuente de células madre 25 pluripotenciales. Ventajosamente, las células de la invención están siempre presentes en los humanos, independientemente de la edad de los mismos, aunque la proporción disminuya. Tal y como se ilustra más abajo, las células madre obtenidas a partir de este tejido expresan preferiblemente los marcadores CD13, SSEA4 OCT3/4 y CD105, lo cual indica que dichas células son de tipo pluripotencial.

Además se ha comprobado que las células madre pluripotenciales aisladas a partir de pulpa dental tienen la capacidad 30 de diferenciarse a tejidos procedentes de cada una de las tres capas embrionarias. Esto las hace de interés en el campo de la cirugía, y en particular en el campo de la reconstrucción de tejidos, tales como óseo, neuronal y hepático.

Así, la presente invención se refiere en un primer aspecto a una célula madre pluripotente caracterizada porque se obtiene a partir de la pulpa dental y expresa al menos los genes NANOG, SOX2, y expresa los marcadores SSEA4, 35 OCT3/4 y CD105.

Entre las características ventajosas de las células de la invención es que la fuente de donde provienen, la pulpa dental, es de fácil extracción sin acarrear los problemas de extracción que presentan las células de la médula ósea.

40 La células de la invención tienen un tamaño pequeño entre 5 y 8 micras. Además no presentan anomalías de cromosomas o cambios estructurales durante el cultivo, elemento muy importante para su aplicación como terapia celular para la regeneración de tejidos.

45 Por otro lado, las células de la invención son células madre pluripotenciales adultas. Que sean adultas es de especial importancia ya que se evita el rechazo (cuando son transplantadas) al ser células que se extraen del mismo individuo que ha de recibir el tratamiento.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, las células madre pluripotenciales expresan, adicionalmente, CD13, CMyc y CD90, y no expresa los marcadores CD34, CD45, CD73 y CD44.

50 Los investigadores han realizado un depósito de las células de la invención en la institución DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen un Zellkulturen GmbH, con la identificación de referencia "Human dental pulp pluripotent stem cells (hDPPSC)" y con n° de acceso DSM ACC3002.

55 La posibilidad de extraer células madre pluripotenciales a partir de pulpa dental supone una alternativa a las fuentes de obtención conocidas hasta ahora de este tipo de células, con las siguientes ventajas: facilidad de extracción, no implica grandes riesgos frente a la intervención en médula ósea, ni costes elevados.

60 El diente está formado por dos componentes básicos: la corona y la raíz. Un diente maduro se compone de tejidos duros: esmalte, dentina y cemento, así como de un núcleo de tejido blando conocido como pulpa dental.

65 Los investigadores han utilizado preferentemente los terceros molares, a partir de los cuales han aislado las células que forman parte de la invención. Dado que el tercer molar es el último diente que se desarrolla en los humanos, está normalmente en una fase más temprana de desarrollo y es capaz de proporcionar una cantidad óptima de tejido de pulpa dental para el aislamiento de las células madre pluripotentes.

Noriaki y colaboradores (cfr. Noriaki *et al.* "Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells", J. Oral Maxillofac Surg, 2009, vol. 67, pág. 501-506), indican en este artículo que aíslan células pluripotenciales de pulpa

dental. Sin embargo, en dicha publicación los únicos ensayos incluidos demuestran la capacidad diferenciadora a tejidos cuyo origen es para todos, la misma capa embrionaria, el mesodermo. Como ya se ha indicado anteriormente, existen criterios bien establecidos que permiten clasificar a una célula como pluripotencial o multipotencial. El experto en la materia, a partir de los ensayos de diferenciación realizados por Noriaki *et al.*, únicamente podría concluir que se trata de células multipotenciales, ya que comprueba la diferenciación a adipocito, condrocito y osteocito (tejidos que proceden de la misma capa embrionaria) y no aporta datos que indiquen que las células aisladas tengan la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de las otras dos capas embrionarias (endodermo y ectodermo).

Por otro lado, no hay en el artículo de Noriaki y colaboradores ningún análisis de la presencia de marcadores que determinen la pluripotencialidad de la célula. Tampoco muestran otras características propias de las células pluripotenciales como su morfología, tamaño pequeño, alto potencial proliferativo, y alta clonogenicidad.

Por otro lado, el medio usado por Noriaki es un medio conocido en el estado de la técnica como específico de crecimiento de células multipotenciales (cfr. Gronthos *et al.* "Postnatal human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*" PNAS, 2000, vol. 97, pág 13625-13630).

Los inventores de la presente invención han tenido que optimizar un medio de crecimiento adecuado para conseguir cultivar las células madre pluripotenciales presentes en la muestra de pulpa dental. Dicho medio se caracteriza por incluir los siguientes factores: LIF, EGF y PDGF. En el documento de Noriaki, se utiliza un medio de cultivo propio de las células multiponteciales. En el ejemplo 8 de la presente invención se muestra como no es posible el crecimiento de células pluripotenciales en un medio inadecuado, como es el medio de Noriaki para células pluripotenciales.

Por todo lo anterior, el documento de Noriaki describe el aislamiento de células madre multipotenciales.

En el documento (CFR. Kerkis *et al.*, "Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers", Cell Tissues Organs, 2006, vol 184, 105-116) se dice que se extrae células pluripotenciales de la pulpa dental. Sin embargo el origen de las células no es la pulpa dental, porque se indican que la obtención se realiza en pacientes de cinco a siete años. En estas edades se presenta gérmenes dentales, la pulpa dental y la bolsa germinal están unidas y la separación de la pulpa del germen es inviable. El origen de las células de Kerkis son el germen y no la pulpa. El origen de las células de la invención es la pulpa dental, y se pueden obtener de adultos de cualquier edad. La fuente de células de Kerkis sólo se puede obtener de cinco a siete años. Por otro lado, el medio que utilizan para cultivar las células es propio de células mesenquimales, y la técnica de sembrado no es la adecuada para el cultivo de células pluripotenciales.

Con un sembrado de 10.000 células por  $\text{cm}^2$  es imposible el cultivo de células pluripotenciales por la diferenciación a fibroblastos. En la figura 1a del documento de Kerkis muestran las células cultivadas y su morfología no es propia de células pluripotenciales, sino que es una morfología propia de células multipotenciales (cfr. Todorov *et al.* "Multipotent progenitor cells isolated from adult human pancreatic tissue" TRAnsplant Proc., 2005 37(8), pág. 3420-1). El cariotipo que se muestra en la figura 1e del documento de Kerkis, se observa alterado a pesar de que se diga que es normal, porque el cromosoma 1 y 3, 4 no presentan el tamaño correcto. Esto implica que la aplicación a humanos podría generar tumores. Se observan cromosomas fragmentados.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo de células madre definidas en el primer aspecto de la invención, en un medio capaz de soportar la proliferación de dichas células, dicho medio incluyendo al menos un factor de transcripción.

En el estado de la técnica son bien conocidos medios que soporten la proliferación de células madre pluripotenciales, tales como el descrito en Smith y colaboradores (cfr. Smith *et al.* "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides", Nature 1988, vol 336, pág. 688-690).

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el medio de crecimiento comprende al menos los factores de crecimiento EGF y PDGF, y el factor de transcripción LIF.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere a un método para obtener células definidas según el primer aspecto de la invención, que comprende los pasos de:

a) disgregación del tejido de la pulpa dental aislada;

b) separación de las células del tejido de la pulpa de la etapa b)

c) obtención de las células DPPSC mediante cultivo en un medio adecuado y concentración de sembrado entre 40-60 células/ $\text{cm}^2$ .

Una ventaja que presenta el medio de cultivo, rico en factores de crecimiento, y con la presencia de al menos un factor de transcripción, y el protocolo de aislamiento es que no produce alteraciones genéticas en las células, lo cual permite la aplicación de estas células en terapia celular para la regeneración de tejidos.

La disagregación tisular consiste en romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que mantiene a las células, que forman parte del tejido, unidas. De esta manera, como consecuencia de la disagregación tisular, se acaba obteniendo una suspensión de células. Para llevar a cabo la disagregación se utilizan procesos que separan las proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, secuestrando los iones calcio que permiten la unión), o bien rompiendo 5 proteolíticamente dichas proteínas (mediante la acción de proteasas), consiguiendo así una suspensión de las células presentes en el tejido. Generalmente, los métodos empleados se pueden clasificar en tres categorías:

- 10 a) mecánicos (por ejemplo cortar, picar, cribar, rascar, etc.). En cultivos celulares se emplean con frecuencia los métodos de rascado (“scraping”) de la placa para arrancar las células adheridas.
- 15 b) químicos. Generalmente se trata de la adición de soluciones en las que no hay iones divalentes o bien de agentes quelantes de estos iones. En cualquier caso se reduce las concentraciones de los iones que estabilizan las uniones de las proteínas de la matriz extracelular y de éstas con los receptores celulares.
- c) enzimáticos. Tratamiento del tejido o del cultivo celular con soluciones de proteasas activas (colagenasa, dispasa, tripsina, elastasa, papaína, pronasa, hialuronidasa, etc.)

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la disagregación de tejido tiene lugar mediante digestión enzimática. Más preferiblemente, la disagregación del tejido tiene lugar mediante digestión con colagenasa tipo I. 20

Para llevar a cabo la separación de las células del tejido disgregado (etapa (b) del procedimiento de acuerdo con el tercer aspecto de la invención), se puede usar cualquiera de las técnicas estándar bien conocidas para el experto en la materia, tales como la flocculación, la flotación, la filtración y la centrifugación, entre otros. En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la separación tiene lugar mediante centrifugación del tejido disgregado resultante de la etapa (a). 25

Forma parte del trabajo rutinario del experto en la materia la elección de un método u otro para llevar a cabo tanto la disagregación del tejido como la separación de las células. 30

Para llevar a cabo la obtención de células DPPSC en el medio de cultivo adecuado, el sembraje debe ser de una concentración baja, entre 40-60 células/cm<sup>2</sup>. Se observó que con concentraciones mayores de sembraje las células se diferencian a fibroblastos, lo que se considera una contaminación. Tal y como se ha indicado anteriormente, el hecho de que las células aisladas de la pulpa dental sean pluripotenciales las hace de interés en la regeneración y/o transplante de tejidos. 35

Así, en un cuarto aspecto la presente invención se refiere a una composición terapéutica que comprende las células de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable, dichas células estando presentes en una cantidad efectiva para producir células de tejidos. 40

En realizaciones preferidas del cuarto aspecto de la invención, las células producidas son de tejido óseo, neuronal y hepático.

Para producir células de tejido óseo, hepático y neuronal se pueden usar técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, si se desea la diferenciación a tejido óseo se podría usar cualquiera de los medios de crecimiento celular que se describen en Haynesworth y colaboradores (cfr. Haynesworth *et al* “Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow”, Bone, 1992, vol. 13, pág. 81-88). Para producir células de tejido hepático se podría usar el medio de crecimiento celular que se describe en Jiang y colaboradores (cfr. Jiang *et al* “Multipotent adult progenitor cells from human bone marrow differentiate into hepatocyte-like cells induced by co-culture with human hepatocyte line”, Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, vol. 87, pág. 414-418). Para producir células de tejido neuronal se podría usar el medio de crecimiento celular descrito en Jiang y colaboradores (cfr. Jiang *et al* “Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain”, Exp. Hematol., 2002, vol. 30, 896-904).

En un quinto aspecto la presente invención se refiere al uso de una célula pluripotencial definida en el primer aspecto de la invención, para la fabricación de un medicamento destinado a la regeneración, reparación de tejidos o transplante de tejidos en mamíferos. 55

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la regeneración del tejido es neuronal, hepático u óseo.

Son numerosos los protocolos existentes en el estado de la técnica para llevar a cabo la regeneración de tejido en general, y de tejido óseo, hepático y neuronal, en particular, a partir de células madre pluripotenciales.

La expresión “uso de una célula pluripotencial” incluye el uso de una población de células madre, la cual se obtiene mediante el cultivo en medios celulares adecuados. El número de células aplicado dependerá del tamaño de la lesión del tejido. La aplicación se puede llevar a cabo habitualmente mediante cirugía, de manera que las células de la invención se pueden aplicar directamente. 65

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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la 5 presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra en las Fig. 1A y Fig. 1B la morfología de las células pluripotentes de la pulpa dental (DPPSC) 10 vistas a a través de un microscopio óptico con objetivos de 20 (Fig. 1A) y 40 (Fig. 1B) aumentos y células obtenidas cuando el cultivo era a alta densidad vistas con objetivos de 40 (Fig. 1C) y 100 (Fig. 1D).

La Fig. 2 muestra una imagen por microscopio convencional (20X) donde se observa la morfología de células 15 seleccionadas o separadas en el ejemplo 3 de la invención después de cuatro días de cultivo.

La Fig. 3 muestra la expresión de los marcadores NANOG y SOX2 de las células DPSSC en los pasos 5, 10 y 15 y la expresión de los marcadores en las células MSC de la pulpa.

La Fig. 4 muestra una imagen por microscopio convencional (40x) donde se observa la morfología de las células 20 de la invención diferenciadas a osteoblastos en el día 4.

La Fig. 5 muestra la expresión de osteocalcina mediante Q-RT-PCR día 4 y día 10 respecto a los controles positivo y negativo. Los resultados se muestran en relación al control positivo (SAOS, células de osteoblastos), al que se le da un valor de 1000.

La Fig. 6 muestra una imagen por microscopio convencional (40x) donde se observa la morfología de las células 25 de la invención diferenciadas a neuronas en el día 4.

La Fig. 7 muestra la expresión de nestina mediante Q-RT-PCR día 4 y día 10 respecto a los controles positivo y negativo. Los resultados se muestran en relación al control positivo (Schwann), al que se le da un valor de 1000.

La Fig. 8 muestra una imagen por microscopio convencional (40x) donde se observa la morfología de las células de la invención diferenciadas a hepatocitos en el día 4.

La Fig. 9 muestra la expresión de HNF3 (Factor nuclear de hepatocitos) mediante Q-RT-PCR día 4 y día 10 respecto a los controles positivo y negativo. Los resultados se muestran en relación al control positivo (Ntera), al que se le da un valor de 1000.

La Fig. 10 muestra el estudio citogenético de las células DPPSC de la pulpa dental en el pase 15.

La Fig. 11 muestra una imagen por microscopio convencional donde se observan los resultados del ejemplo 8. Fig 40 11A Medio 2. Fig 11B Medio3.

### Exposición detallada de modos de realización

#### Medios de cultivo utilizados en los diferentes ejemplos

Medio 1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Médium) se utiliza para el mantenimiento y transporte de las muestras del quirófano al laboratorio.

Medio 2. Este medio se utiliza para el cultivo de las células de la invención DPPSC (células pluripotenciales de la pulpa dental). La composición del medio es 300 ml de DMEM, 200 ml de MCDB (105 Medio SIGMA), 5 ml de SITE (insulina, transferrina, selenito de sodio, etanolamina), 1 ml de LA-BSA (albúmina de suero bovino), 5 ml de Pen/Strep, 5 ml de ácido ascórbico, 10 ml de FBS (suero bovino fetal), 500  $\mu$ l de PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), 500  $\mu$ l de EGF (factor de crecimiento epidérmico), 50  $\mu$ l de LIF (factor inhibidor de leucemia), 0,4 g de BSA (albúmina de suero bovino), 5 ml de Chemically defined Lipid concentrante.

Medio 3 MSC (células madre mesenquimales). Medio de cultivo de las células de control. Se utiliza para el cultivo de MSC de la médula ósea y de MSC de la pulpa dental. La composición del medio es DMEM bajo en glucosa (DMEM-LG, Gibco Brl 11885-084), 1X Pen/Strep (Cellgro 30-002-CI), 1X (0.1 mM) L-Ácido ascórbico (Sigma A-8960), 2% FBS Hyclone.

Medio 4 Ntera. Se utiliza para el cultivo de la línea celular Ntera. La composición del medio es: DMEM alto en glucosa (DMEM-HG Gibco41966), 2% Suero de caballo (Gibco26050-070), 10% FBS (Biochrom S 0115), 10% Pen/Strep.

Medio 5 SAOS. Se utiliza para el cultivo de las células SAOS. La composición del medio es: DMEM-HG, (Gibco41966), 2% Suero de caballo (Gibco26050-070), 10% FCS (Biochrom S 0115), 10% Pen/Strep.

# ES 2 360 434 A1

Medio 6 Schwann. Se utiliza para el cultivo de células Schwann. La composición del medio es: DMEM-LG, (Gibco 41966), 2% Suero de caballo (Gibco 26050-070), 10% FCS (Biochrom S 0115), 10% Pen/Strep.

Medio 7. Medio de diferenciación basal. La composición del medio es: 60% DMEM-LG (GIBCO/BRL), 40% 5 MCDB-201 (Sigma) con 1X insulina-transferrina-selenio, 1X ácido linoleico BSA (albúmina modificada con linoleico),  $10^{-9}$  M dexametasona (Sigma), y  $10^{-4}$  M ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 100 unidades de penicilina y 1.000 unidades de estreptomicina (GIBCO).

## 10 Medios 8 de diferenciación.

10 A: Medio de hepatocitos: Medio de diferenciación basal con 10 ng/ml FGF-4 (R&D Systems), 10 ng/ml HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) (R&D Systems).

15 B: Medio de neuronas: los primeros 4 días se utilizó medio basal, 100 ng/ml factor de crecimiento de fibroblastos 15 básico (bFGF). En el día 5 se cambio el medio por el medio basal, FGF8 (10 ng/ml), SHH (100 ng/ml). El octavo día: basal media, BDNF (Factor neurotropico derivado del cerebro) (10 ng/ml), GDNF (Factor neurotropico derivado de célula glial) (10 ng/ml) + N2 (R & D Systems).

20 C: Medio osteogénico: DMEM-LG (GIBCO/BRL), Glutamina (100X), Antibiótico (100X), FBS 10%, 0,01  $\mu$ M 1,25 dihidroxivitamina D3(1000X), 50  $\mu$ M ascorbato-2-fosfato (1000X), 10  $\mu$  M B-Glicerolfosfato (32,67X).

## Preparación de la muestra para los diferentes ensayos

25 Inmediatamente después de la extracción de los terceros molares se procedió a realizar el lavado de los mismos utilizando una gasa mojada con etanol al 70% y posteriormente con agua destilada estéril.

30 Se realizó un corte entre el esmalte y el cemento utilizando una fresa cilíndrica de turbina sujetando el diente con fórceps de incisivos superiores.

35 Se realizó una fractura en la misma línea del corte mediante dos fórceps de incisivos superiores y se colocaron los dos fragmentos del diente en un frasco de Falcon con el Medio 1.

Se trasladaron las muestras al laboratorio. Una vez en la campana de flujo, se virtió el contenido en una placa de Petri.

35 Se procedió a aislar los tejidos de la pulpa dental mediante una lima de tiranervios del 15 y una pinza de estériles.

Posteriormente, utilizando una jeringa de insulina, se realizó un lavado de los conductos con DMEM y se descartaron los fragmentos dentarios.

40 El siguiente paso fue realizar la disgregación celular mediante la digestión de colagenasa tipo I (3 mg/ml) del tejido de pulpa durante 40 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugó la muestra durante diez minutos a 1.800 rpm para separar las células del tejido disgregado.

45 Se realizó un lavado de las células con PBS (tampón fosfato salino) estéril y se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 1.800 rpm, y se determinó la viabilidad celular mediante la tinción con trypan blue. El porcentaje de la viabilidad celular era alrededor del 95%.

50 Se resuspendieron las células en el medio 2. Se incubaron las células obtenidas a 37°C durante 2-3 días en frascos previamente tratados con fibronectina y se evaluó la aparición de clones o células pegadas al frasco del cultivo. Cuando se observaron suficientes células pegadas, se tripsinizaron y se expandieron manteniendo siempre una densidad baja.

## Mantenimiento del cultivo celular

55 Las células fueron cultivadas en placas de seis pocillos tratadas con fibronectina humana al 10% en PBS (BD Bioscience) una hora antes de sembrar las células en la incubadora de CO<sub>2</sub>. En el segundo día se añadieron 2 ml de medio de cultivo y en el cuarto día se aspiraron 2 ml y se añadieron 2 ml de medio nuevo. A partir de la semana se cambió el medio cada tres días.

60 Análisis por citometría de flujo (Fluorescent Activated Cell Sorting - FACS). Anticuerpos utilizados para los diferentes ensayos

Para los diferentes análisis mediante citometría de flujo (FACS) fue necesario añadir a las células anticuerpos portadores de fluorocromo (Ver tabla 1).

## ES 2 360 434 A1

TABLA 1

*Anticuerpos monoclonales utilizados en el análisis por FACS*

|    | Anticuerpo            | Especie    | Casa comercial | Concentración |
|----|-----------------------|------------|----------------|---------------|
| 5  | CD13 FITC             | MS:MS, HUM | eBioscience    | 1:50          |
| 10 | SSEA4 PE              | MS:MS, HUM | eBioscience    | 1:50          |
| 15 | OCT3/4 FITC           | MS:MS, HUM | RD SYSTEMS     | 1:50          |
| 20 | CD45 PE-Cy5           | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 25 | CD14 PE               | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 30 | CD73 PE               | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 35 | CD29 PE-Cy5           | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 40 | NANOG FITC            | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 45 | CD90 FITC             | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 50 | CD34 PE-Cy5           | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
| 55 | CD44                  | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
|    | CD105 FITC            | MS:MS, HUM | BDPharmingen   | 1:50          |
|    | IgG1 de conejo de 595 | Conejo     | BDPharmingen   | 1:50/1.100    |
|    | IgG1 de ratón de FITC | Ratón      | RD SYSTEMS     | 1:50/1:100    |
|    | IgG1 de ratón PE-Cy5  | Ratón      | RD SYSTEMS     | 1:50/1:100    |

MS:MS, HUM (producido en ratón, reconoce ratón y humano)

60

Como control de fluorescencia se utilizaron anticuerpos IgG1 unidos a isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), PE-Cy5 (BD Pharmingen). La suspensión celular (células resuspendidas en PBS y 2% FBS) se dividió en fracciones de 1,5 millones de células y se incubaron con los respectivos anticuerpos durante 45 minutos a 4°C y en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS y 2% FBS, y se centrifugaron 6 minutos a 1.800 rpm. Esto evitó que quedaran restos del fluorocromo, ya que darían un falso porcentaje de fluorescencia.

# ES 2 360 434 A1

Dependiendo del número de células, estás se resuspendieron entre 300-600  $\mu$ l de PBS y 2% FBS.

Todas las medidas de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACScan y su análisis se llevó a cabo mediante el programa winMDI 2.8.

5

## Ejemplo 1

### *Caracterización de los cultivos celulares de la pulpa dental. Morfología celular*

10 Durante todo el proceso de cultivo, las células se controlaron y se observaron al microscopio para descartar la posible contaminación por levaduras, hongos o bacterias. Se intentó mantener una densidad baja teniendo en cuenta la proporción de células pequeñas (5-8 micras) respecto las grandes (10-25 micras), con el objeto de intentar aumentar el número de células pequeñas. Son estas células pequeñas las propias de la invención. En el análisis de la morfología de las células madre de la pulpa dental se realizó un seguimiento exhaustivo de los cultivos para que tuvieran capacidad 15 adherente, hasta alcanzar la subconfluencia de estas células. En la Fig. 1 (A y B) se observa el aspecto de la morfología de las células pluripotentes de la pulpa dental (DPPSC) vistas a través de un microscopio óptico con objetivos de 20 y 40 aumentos, respectivamente. Es importante que la densidad de siembra sea baja preferentemente entre 40-60 células por  $\text{cm}^2$ . En la Figura 1 (B, C) se observa el aspecto de la morfología de las células cuando la densidad de siembra es alta 80-100 células por  $\text{cm}^2$ . A estas densidades de siembra las células pluripotenciales se diferencian y se observan 20 un tipo diferente de célula, grande y con morfología fusiforme.

## Ejemplo 2

25 *Análisis de fenotipo de células cultivadas en diferentes pasos a partir de la pulpa dental. Análisis por citometría de flujo (FACS)*

Este análisis se realizó al cabo de una, dos y tres semanas de cultivo. En este estudio se analizó el fenotipo de 30 células de distintos clones obtenidos a partir de una muestra de pulpa dental de un donante de 14, 17, 18, 28, 38 años de edad cultivadas a baja densidad, 80 a 100 células por  $\text{cm}^2$ , y expandirlas cuando el cultivo llegó a una confluencia de cultivo al 70%.

35 El análisis por FACS se realizó en cada semana de cultivo de las células de todos los clones (14, 17, 18, 28, 38 años) durante tres semanas de cultivo para ver el cambio de porcentaje de marcadores específicos de pluripotencialidad. Se utilizaron los anticuerpos CD13 FITC, SSEA4 PE, OCT3/4 FITC. Se analizaron más de 200.000 células por cada muestra para detectar uniones inespecíficas o autofluorescencia. No se detectaron uniones inespecíficas. También se observó una disminución de la presencia de marcadores específicos de DPPSC con el aumento de la edad, pero se veían aumentados durante el cultivo (Ver Tabla 2).

40

TABLA 2

### *Análisis por FACS para determinar el fenotipo de las células cultivadas en diferentes pasos a partir de pulpa dental*

45

|    | PACY   | PAC 14         | PAC 17 | PAC 18 | PAC 28 | PAC 38 | MEDIA |       |
|----|--------|----------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| 50 | CD13   | Primera semana | 16,9   | 15,2   | 20     | 22,1   | 21,7  | 19,18 |
|    | SSEA-4 |                | 15,7   | 6,3    | 5,7    | 2,8    | 2,1   | 6,52  |
|    | OCT3/4 |                | 0,9    | 0,7    | 0,2    | 0,08   | 0,08  | 0,392 |
| 55 | CD13   | Segunda semana | 18,4   | 30     | 27     | 52,2   | 48,75 | 35,27 |
|    | SSEA-4 |                | 15,9   | 7,1    | 6,3    | 5,4    | 5,15  | 7,97  |
|    | OCT3/4 |                | 1,1    | 0,9    | 0,5    | 0,8    | 0,6   | 0,78  |
| 60 | CD13   | Tercera semana | 98     | 30,9   | 38,7   | 54,2   | 51,2  | 54,6  |
|    | SSEA-4 |                | 51,7   | 55,6   | 25,    | 8      | 10,6  | 30,22 |
|    | OCT3/4 |                | 16,3   | 8,2    | 2,3    | 1,2    | 0,9   | 5,78  |

65

PAC Y: paciente con edad Y.

# ES 2 360 434 A1

Se observa un aumento del porcentaje de marcadores específicos de células DPPSC, cultivadas a baja densidad celular, respecto al tiempo de cultivo. También se observa una disminución de la presencia de marcadores específicos de DPPSC con el aumento de la edad aunque, como se ha indicado anteriormente, se vea aumentado el porcentaje de marcadores durante el tiempo de cultivo.

5

Se realizó también un análisis adicional por FACS utilizando la muestra del donante de 14 años en la tercera semana de cultivo. Además de los anticuerpos CD13, SSEA4, OCT3/4, se utilizaron los marcadores CD45, CD73, CD105, CD34. La tabla 3 muestra los resultados.

10

TABLA 3

*Fenotipo de las DPPSC de muestra paciente 14 años*

15

| Muestra 14 años |       |
|-----------------|-------|
| CD105           | 93,3% |
| CD45            | 0%    |
| CD73            | 0%    |
| CD14            | 8%    |
| CD44            | 0%    |
| CD90            | 42%   |
| CD13            | 98%   |
| SSEA4           | 51%   |
| OCT3/4          | 16%   |
| CD34            | 0%    |

20

25

30

35

Según se desprende de la tabla 3 las células DPPSC de la invención expresan los marcadores CD105, CD14, CD90, CD13, SSEA4, OCT3/4 y no expresan los marcadores CD45, CD73, CD44 y CD34, por ser la mayoría marcadores de células pluripotenciales, queda demostrado la pluripotencialidad de las mismas.

40

## Ejemplo 3

*Análisis de fenotipo de células positivas al SSEA4 separadas por el citómetro de flujo (cell sorter)*

45

Se extrajo una muestra de pulpa dental de un paciente de 18 años.

50

Seguidamente, se aislaron por FACS las poblaciones positivas al CD13 FITC (eBioscience) y SSEA4 PE (eBioscience), y se aisló también la población doble positivas al CD13 y SSEA4. Se recogieron las células en placas de cultivos de 24 pocillos. La separación por FACS se realizó en un Coulter, EPICS ELITE-ESP®.

55

Se realizó la separación, mediante citometría de flujo, de la población de células SSEA4 positivas (SSEA4+) contenidas en la muestra original de la pulpa dental obtenida el mismo día de la extracción. De estas células se estudió su fenotipo y se comparó con el de las células DPPSC cultivadas pero no seleccionadas por citometría de flujo.

La citada separación o el aislamiento se realizó en un citómetro de flujo con un dispositivo separador de células, EPICS ELITE-ESP®.

60

Se consiguieron separar 250 células positivas a SSEA4 (SSEA4+), se cultivaron estas células en una placa de 90 pocillos tratadas con fibronectina humana (BD Bioscience) una hora antes de sembrar las células en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En cada pocillo se sembraron 10 células con 150 ml de Medio 2.

65

Las células así separadas sobrevivieron al proceso y fueron proliferando hasta obtener los pocillos subconfluentes. También presentaban una morfología muy similar a las DPPSC de la pulpa dental no separadas por citometría (ver Fig. 2).

También se determinó el fenotipo de estas células mediante marcadores siendo similar a las células de la pulpa dental no separadas por citometría (ejemplo 2). Ver tabla 4.

# ES 2 360 434 A1

TABLA 4

*Análisis fenotipo por FACS de las células positivas a SSEA4  
aisladas por el citómetro (cell sorter)*

5

10

| CD105 | CD45 | CD13 | SSEA4 | OCT3/4 | CD34 |
|-------|------|------|-------|--------|------|
| 95%   | 0%   | 95%  | 51%   | 12%    | 0%   |

De esta tabla se desprende que el proceso de aislamiento celular mediante citómetro (cell-sorter) no mejora la pureza o homogeneidad de las DPPSC obtenidas mediante el cultivo *in vitro* durante distintos pases.

15

## Ejemplo 4

*Análisis de la expresión de marcadores NANOG, SOX2, de pluripotencialidad en células DPPSC de la pulpa dental mediante Q-RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa y cuantitativa)*

20

Para determinar la expresión de genes mediante Q-RT-PCR se utilizó el sistema Syber-Green.

25

En este sistema la reacción se llevó a cabo en un volumen de 22  $\mu$ l totales: 20  $\mu$ l de mezcla (Syber-Green subermix) y 2  $\mu$ l de muestra de ADN complementario (cDNA). Las muestras se sometieron a 40 ciclos tras un ciclo de desnaturación de 2 min. A 50°C. Se utilizaron en todos los casos un control positivo y negativo para cada muestra, así como un control de carga GAPDH (Gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa).

30

Mediante Q-RT-PCR se demostró la expresión NANOG, SOX-2, en las células DPPSC de la pulpa dental del clon del paciente con 14 años, y se realizó la comparación de expresión de estos genes en pase 5, 10, 15, utilizando la células NTERA como control positivo y MSC de la pulpa como control negativo.

Se observó que la expresión del NANOG y SOX-2 aumentaba entre los pases 5, 10 y el pase 15. Ver Fig. 3.

35

Anteriormente se realizó la eficiencia de amplificación de cada gen en las células NTERA en diferentes concentraciones (1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001) del cDNA. Se observó que la amplificación del cDNA resulta lineal entre 19.98 a 28.46 ciclos para GAPDH, entre 24.15 a 30.73 ciclos para NANOG, y entre 25.30 a 31.27 ciclos para SOX-2. Las pendientes de amplificación de los genes fueron: GAPDH  $y = 3,0196x + 14,412$ ,  $R^2 = 0,97$ . NANOG  $y = 3,2878x + 20,841$ ,  $R^2 = 0,9999$ . Sox2  $y = 2,9832x + 22,563$ ,  $R^2 = 0,9802$ . Las secuencias de los cebadores y sondas utilizadas se describen a continuación:

40

Detección de GADPH por Syber-Green:

Cebador directo (SEC ID NO 1): TGGTATCGTGGAAAGGACTCATGAC

45

Cebador reverso (SEC ID NO 2): ATGCCAGTGAGCTTCCGTTCA

Detección SOX-2 sistema Syber-Green:

50

Cebador directo (SEC ID NO 3): GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG

Cebador reverso (SEC ID NO 4): TTGCGTGAGTGTGGATGGATTGGTG

55

Detección NANOG sistema Syber-Green:

Cebador directo (SEC ID NO 5): AAAGAATCTTCACCTATGCC

Cebador reverso (SEC ID NO 6): GAAGGAAGAGGAGAGACAGT

60

## Ejemplo 5

*Diferenciación de células de la pulpa dental*

65

Con el objetivo de determinar la pluripotencialidad de las DPPSC de la pulpa dental analizamos el potencial de diferenciación *in vitro* hacia tejidos de cada una de las tres capas embrionarias, mesodermo, endodermo y ectodermo.

# ES 2 360 434 A1

## *Diferenciación mesodérmica. Diferenciación a osteoblastos*

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo a una densidad de  $3 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$  en medio basal. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación DMEM-LG, 10% FBS, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma), 50  $\mu\text{M}$  de ácido L-ascórbico (Sigma), 0,01  $\mu\text{M}$  1,25 dexametasona y 1% penicilina y streptomicina. Se cambió el medio cada 3 días durante 10 días. Mediante técnicas de Q-RT-PCR se demostró que estas células se habían diferenciado a tejido óseo, expresando genes específicos de este tejido, como osteocalcina. Para determinar la presencia de osteocalcina en Q-RT-PCR se utilizó como cebador directo la secuencia (SEC ID NO 7) GGTGCAGAGTCCAGCAAAGG y como cebador reverso la secuencia (SEC ID NO 8) AGCGCCTGGGTCTTCCCTA.

Se utilizaron células de SAOS como control positivo y células DPPSC de pulpa dental indiferenciadas como control negativo y GAPDH como gen constitutivo (HK). Como se observa en la Fig. 5 la concentración de osteocalcina se ve aumentada en el día 4 respecto al día 0.

En la Fig. 4 se observa también la diferenciación a osteoblastos por microscopio convencional, mostrando las células la morfología propia de dicho tipo celular.

## *Diferenciación ectodérmica. Diferenciación a neuronas*

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo a una densidad de 25-30 células por  $\text{cm}^2$  en medio basal. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación; en los primeros 4 días medio basal 100 ng/ml (bFGF); el octavo día, medio basal m, FGF8 (10 ng/ml), SHH (100 ng/ml), BDNF (10 ng/ml), GDNF (10 ng/ml) + N2 (R&D Systems). Se cambió el medio cada 3 días durante 10 días. En la Q-RT-PCR se utilizaron células de Schwann como control positivo y GAPDH como control de carga (HK). Como se observa en la Fig. 7 la concentración de NESTINA aumentó en el día 4 respecto al día 0.

Para determinar la NESTINA en Q-RT-PCR se utilizó como cebador directo la secuencia (SEC ID NO 9) CAGGA GAAACAGGGCCTACA y como cebador reverso la secuencia (SEC ID NO 10) TGGGAGCAAAGATCCAAGAC.

En la Fig. 6, se observa también la diferenciación a neuronas por microscopio convencional, mostrando las células la morfología propia de las neuronas.

## *Diferenciación endodérmica. Diferenciación a hepatocitos*

Se sembraron las células a diferenciar en placas de 24 pocillos en el medio de cultivo a una densidad de  $25 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$  en medio basal. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación: medio basal sin FBS, 10 ng/ml HGF, 10 ng/ml FGF-4 (R&D Systems). Se cambió el medio cada 3 días durante 10 días. Mediante técnicas de Q-RT-PCR se determinó que estas células se habían diferenciado a tejido hepático, expresando genes específicos de este tejido como HNF3 (Factor nuclear de hepatocitos). Se utilizaron células Ntera como control positivo y GAPDH como control de carga (HK). Como se observa en la Fig. 9 la concentración de HNF3 se ve aumentada en el día 4 respecto al día 0.

Para determinar la presencia de HNF3 en Q-RT-PCR se utilizó como cebador directo la secuencia (SEC ID NO 11) CAGGAGAACAGGGCCTACA y como cebador reverso la secuencia (SEC ID NO 12) TGGGAGCAAAGATC CAAGAC.

En la Fig. 8 se observa también la diferenciación a hepatocitos por microscopio convencional, mostrando las células la morfología propia de este tipo de células.

50

## Ejemplo 6

### *Estudio citogenético y de microscopía electrónica de las DPPSC*

Se realizó un estudio cada semana de citogenética y microscopía electrónica de barrido (SEM) para ver si había anomalías de cromosomas o cambios de estructuras celulares de cultivo. Esto se realizó con el objetivo de aplicar estas células a nivel clínico en el futuro como terapia celular para la regeneración de tejidos.

En la Fig. 10 se muestra el citado estudio citogenético y SEM y puede apreciarse que no se observan ni anomalías ni fragmentación de cromosomas o de estructuras celulares. Para este estudio se analizaron 200 metafases y se observó más del 85% de las células sin anomalías o fragmentaciones. En 15% de las metafases restantes, se observaron roturas cromosómicas, las cuales son habituales como consecuencia de la técnica utilizada.

65

# ES 2 360 434 A1

## Ejemplo 7

*Comparación del fenotipo por la expresión de diferentes marcadores de diferentes tipos de células*

5 Se comparó la expresión o no de los genes mostrados en la tabla 5, mediante FACS de las células de las invención DPPSC, MAPSC (células madre adultas multipotentes progenitoras), MSC (Células madre mesenquimales), IPS (induced pluripotent stem) y Ntera.

10

TABLA 5

*Muestra la expresión (+) o no (-) de los distintos marcadores en los diferentes tipos de células estudiadas. La “?” muestra marcadores no ensayados*

15

20

25

30

35

|        | DPPSC | MAPSC | MSC | IPS | Ntera |
|--------|-------|-------|-----|-----|-------|
| OCT3/4 | +     | +     | +/- | +   | +     |
| SSEA4  | +     | +     | -   | +   | +     |
| CD13   | +     | +     | +   | +   | +     |
| SOX-2  | +     | ?     | -   | +   | +     |
| NANOG  | +     | ?     | -   | +   | +     |
| C-Myc  | +     | ?     | -   | +   | +     |
| CD44   | -     | +     | +   | ?   | ?     |
| CD90   | +     | +     | +   | ?   | ?     |
| CD105  | +     | -     | -   | ?   | ?     |
| CD73   | -     | +     | +   | ?   | ?     |
| CD45   | -     | -     | +   | ?   | ?     |

## Ejemplo 8

40 *Ensayo comparativo de medios de cultivo*

45 Se realizó una comparativa entre el Medio 2, el Medio para DPPSC, el Medio 3, y el Medio MSC con la finalidad de determinar cuál de ellos permitía obtener las células madre pluripotenciales de la presente invención. Para ello, se utilizó una muestra de la pulpa dental del mismo paciente. En el mismo día la muestra fue repartida en dos partes; una parte en medio de MSC y la otra parte en medio de DPPSC. Se mantuvo con la misma concentración de sembraje durante 3 semanas y se observó la gran diferencia de morfología y de fenotipo. Esto demuestra que las células DPPSC solo pueden vivir en su medio escrito. La Fig. 11 muestra las células que se cultivaron en el medio 2 a la izquierda (Fig. 11A) y las células que se cultivaron en el medio 3 a la derecha (Fig. 11B).

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Célula madre pluripotente **caracterizada** porque se obtiene a partir de la pulpa dental y expresa al menos los genes NANOG, SOX2, y muestra los marcadores, SSEA4, OCT3/4 y CD105.
- 10 2. Célula madre según reivindicación 1 **caracterizada** porque expresa los marcadores CD13, CMyc y CD90 y no expresa los marcadores CD34, CD45, CD73 y CD44.
- 15 3. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que tiene la identificación de referencia “Human dental pulp pluripotent stem cells (hDPPSC)” en la institución DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen un Zellkulturen GmbH con nº de acceso DSM ACC3002.
- 20 4. Célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizada** porque es una célula humana.
- 25 5. Cultivo de células madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio capaz de soportar la proliferación de dichas células, dicho medio incluyendo al menos un factor de transcripción.
6. Cultivo según reivindicación 5 **caracterizada** porque el medio comprende al menos los factores de crecimiento EGF y PDGF, y al menos el factor de transcripción LIF.
7. Método para obtener células madre pluripotenciales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende los pasos de: (a) disgregación del tejido de la pulpa dental aislada de un ser mamífero; y (b) separación de las células madre del tejido disgregado resultante de la etapa (a) c) cultivo de las células en un medio que presente al menos un factor de transcripción.
- 30 8. Composición terapéutica que comprende una célula madre pluripotente según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable, dichas células estando presentes en una cantidad efectiva para producir células de tejidos.
9. Composición terapéutica según reivindicación 8 para producir células del tejido oseo.
10. Composición terapéutica según reivindicación 8 para producir células del tejido neuronal.
- 35 11. Composición terapéutica según reivindicación 8 para producir células del tejido hepático.
12. Uso de una célula pluripotencial según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la fabricación de un medicamento destinado a la regeneración, reparación de tejidos o transplante de tejidos en mamíferos.
- 40 13. Uso según reivindicación 12, para la regeneración de tejido oseo.
14. Uso según reivindicación 12, para la regeneración de tejido neuronal.
15. Uso según la reivindicación 12, para la regeneración de tejido hepático.

45

50

55

60

65

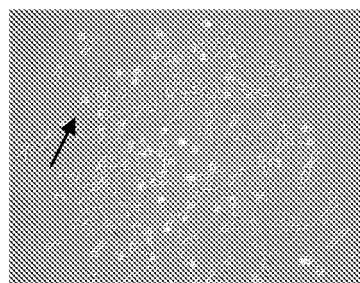


FIG. 1A

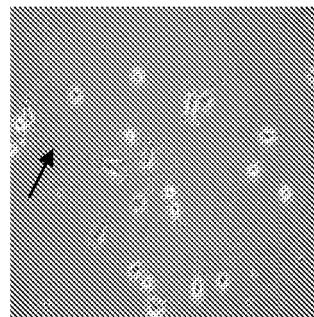


FIG. 1B

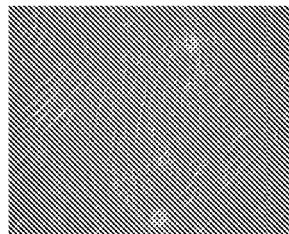


FIG. 1C

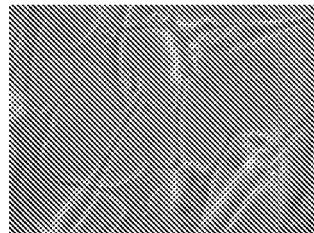


FIG. 1D

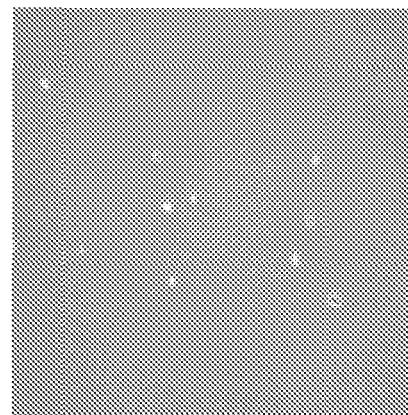


FIG.2

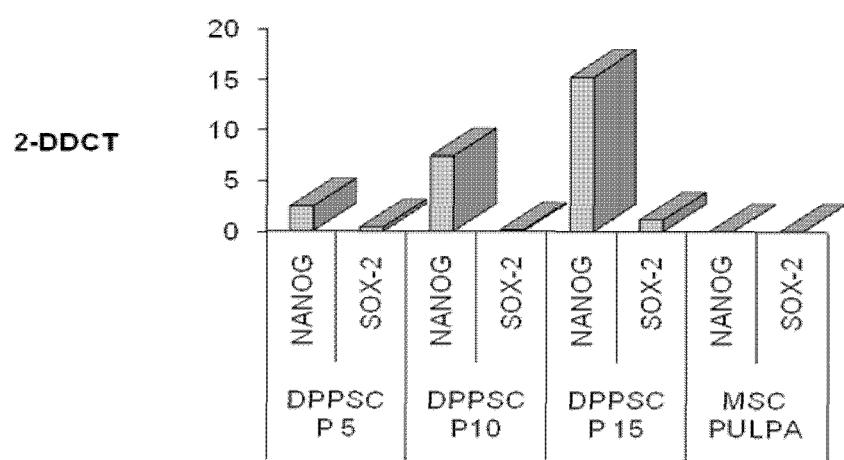


FIG.3

# ES 2 360 434 A1



FIG.4

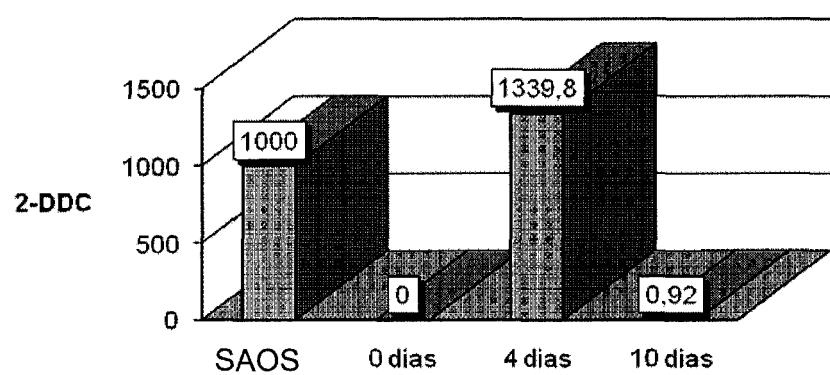


FIG.5

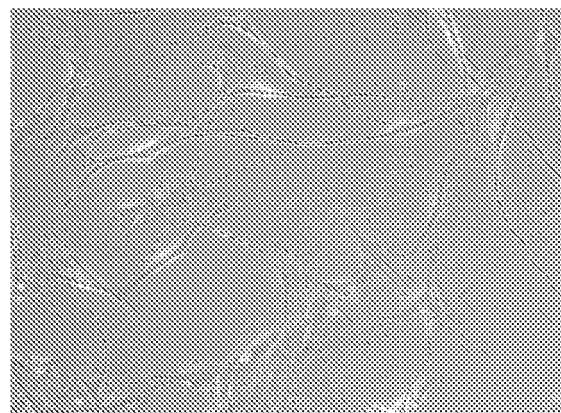


FIG.6

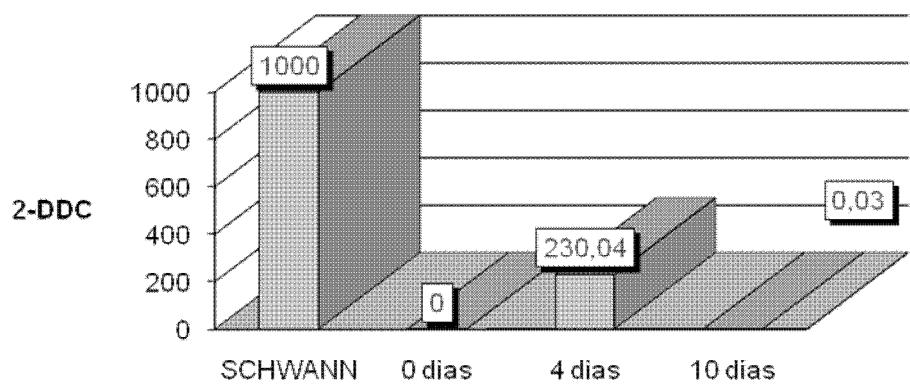


FIG.7

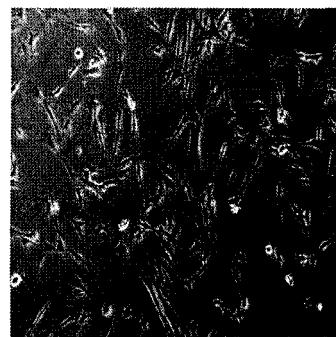


FIG.8

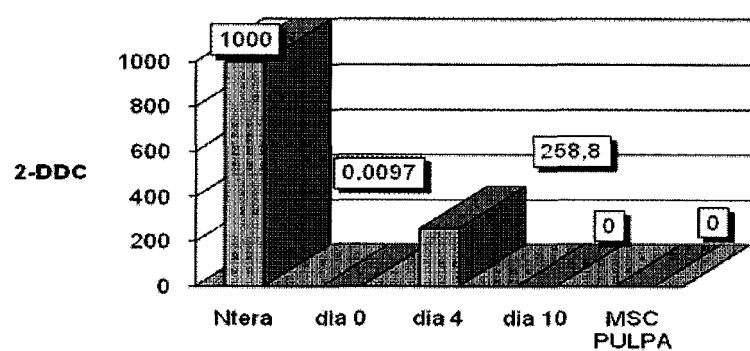


FIG.9

ES 2 360 434 A1

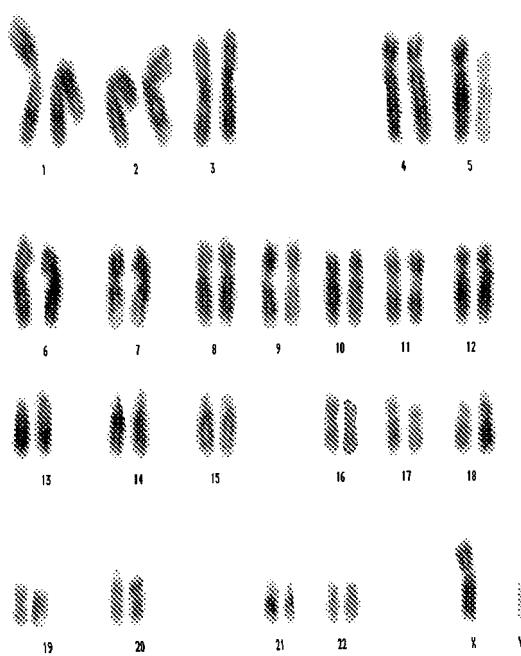


FIG.10

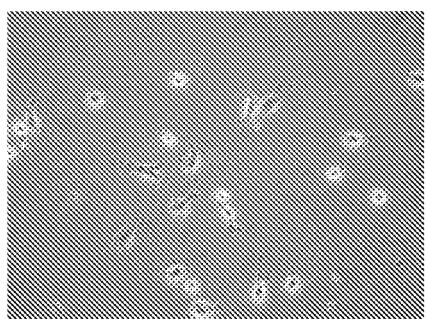


FIG.11A

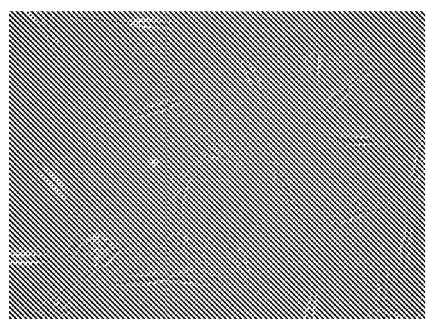


FIG.11B

# ES 2 360 434 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UIC Universidad Internacional de Cataluña

5 <120> Células madre pluripotenciales obtenidas a partir de la pulpa dental

<130> P1454ES00

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 24

<212> DNA

20 <213> artificial

<220>

<223> Cebador directo detección gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa (GADPH)

25 <400> 1

tggtatcgtg gaaggactca tgac 24

30 <210> 2

<211> 24

<212> DNA

35 <213> artificial

<220>

<223> Cebador reverso detección gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa (GADPH)

40 <400> 2

atgccagtga gcttcccggtt cagc 24

45 <210> 3

<211> 26

50 <212> DNA

<213> artificial

<220>

55 <223> Cebador directo detección gen SOX2 humano

<400> 3

60 gggaaatggg aggggtgcaa aagagg 26

<210> 4

65 <211> 26

<212> DNA

<213> artificial

# ES 2 360 434 A1

<220>

<223> Cebador reverso detección gen SOX2 humano

5 <400> 4

ttgcgtgagt gtggatggga ttggtg

26

10 <210> 5

<211> 20

<212> DNA

15 <213> artificial

<220>

<223> Cebador directo detección gen NANOG humano

20 <400> 5

aaagaatctt cacctatgcc

20

25

<210> 6

<211> 20

30 <212> DNA

<213> artificial

<220>

35 <223> Cebador inverso detección gen NANOG humano

<400> 6

40 gaaggaagag gagagacagt

20

<210> 7

<211> 20

45 <212> DNA

<213> artificial

<220>

50 <223> Cebador directo detección del gen osteocalcina

<400> 7

55 ggtgcagagt ccagcaaagg

20

<210> 8

60 <211> 20

<212> DNA

<213> artificial

65 <220>

<223> Cebador inverso detección gen osteocalcina

# ES 2 360 434 A1

<400> 8  
agcgccctggg tctcttccta 20

5 <210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
10 <213> artificial

<220>  
<223> Cebador directo detección del gen nestina

15 <400> 9  
caggagaaac agggcctaca 20

20 <210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
25 <213> artificial

<220>  
<223> Cebador inverso detección del gen nestina

30 <400> 10  
tgggagcaaa gatccaagac 20

35 <210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
40 <213> artificial

<220>  
<223> Cebador directo gen (HNF3) Factor nuclear de hepatocito

45 <400> 11  
caggagaaac agggcctaca 20

50 <210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
55 <213> artificial

<220>  
<223> Cebador inverso gen (HNF3) Factor nuclear de hepatocito

60 <400> 12  
tgggagcaaa gatccaagac 20



②1 N.º solicitud: 200930488

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.2009

③2 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12N5/074** (2010.01)  
**A61K35/32** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X         | IKEDA, E., et al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. Differentiation. Junio 2008. Vol. 76, nº 5, páginas 495-505. ISSN 0301-4681. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00245.x. Ver todo el documento.   | 1-4,8-15                   |
| Y         |  | 5-7                        |
| Y         | ULLOA-MONTOYA, F., et al. Culture systems for pluripotent stem cells. Journal of bioscience and bioengineering. Julio 2005. Vol. 100, nº 1, páginas 12-27. ISSN 1389-1723 (Impreso). doi:10.1263/jbb.100.12. Ver todo el documento, especialmente página 16.   | 5-7                        |
| X         | KERKIS, I., et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells, tissues, organs. 2006. Vol. 184, nº 3-4, páginas 105-116. ISSN 1422-6421 (Electrónico). Ver todo el documento.                     | 1-4,8,10,12,14             |
| Y         |  | 5-7,9,11,13,15             |
| Y         | WO 2005001076 A2 (ETHICON, INCORPORATED [US/US]) 06.01.2005, página 19, ejemplos 14,15,22,30.  | 5-7,9,11,13,15             |
| X         | KOYAMA, N., et al. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Marzo 2009. Vol. 67, nº 3, páginas 501-506. ISSN 1531-5053 (Electrónico). Ver todo el documento. | 1-4,8,9,12,13              |
| Y         |  | 5-7,10,11,14,15            |
| Y         | JIANG, Y., et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Experimental hematology. Agosto 2002. Vol. 30, nº 8, páginas 896-904. ISSN 0301-472X (Impreso). Ver todo el documento, especialmente resumen, páginas 897, 900 y 901 y figura 3.  | 5-7,10,11,14,15            |
| X         | WO 2008080200 A1 (KERKIS, I. [BR/BR], et al.) 10.07.2008, páginas 5,15-18, ejemplos 1,2,5; reivindicaciones 1-5,19,20,22,24,25,31.   | 1-4,8,10,12,14             |
| Y         |  | 5-7,9,13                   |
| Y         | US 20080152629 A1 (EDINGER, J. [US], et al.) 26.06.2008, párrafos [0166]-[0170],[0196]-[0198],[0206]-[0208],[0355]-[0360],[0369]-[0376].   | 5-7,9,13                   |

#### 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<br>20.05.2011 | Examinador<br>B. Pérez Esteban | Página<br>1/5 |
|--|--------------------------------|---------------|

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

C12N, A61K

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2011

**Declaración**

|   |   |          |
|---|---|----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-15<br>Reivindicaciones | SI<br>NO |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones<br>Reivindicaciones 1-15 | SI<br>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 se publica.

**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       | IKEDA, E., <i>et al.</i> Differentiation. Junio 2008. Vol. 76, nº 5, páginas 495-505. ISSN 0301-4681. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00245.x.   | Junio 2008        |
| D02       | ULLOA-MONTOYA, F., <i>et al.</i> Journal of bioscience and bioengineering. Julio 2005. Vol. 100, nº 1, páginas 12-27. ISSN 1389-1723 (Impreso). doi:10.1263/jbb.100.12.   | Julio 2005        |
| D03       | KERKIS, I., <i>et al.</i> Cells, tissues, organs. 2006. Vol. 184, nº 3-4, páginas 105-116. ISSN 1422-6421 (Electrónico).  | 2006              |
| D04       | WO 2005001076 A2 (ETHICON, INCORPORATED [US/US])  | 06.01.2005        |
| D05       | KOYAMA, N., <i>et al.</i> Journal of oral and maxillofacial surgery; official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Marzo 2009. Vol. 67, nº 3, páginas 501-506. ISSN 1531-5053 (Electrónico). | Marzo 2009        |
| D06       | JIANG, Y., <i>et al.</i> Experimental hematology. Agosto 2002. Vol. 30, nº 8, páginas 896-904. ISSN 0301-472X (Impreso).  | Agosto 2002       |
| D07       | WO 2008080200 A1 (KERKIS, I. [BR/BR], <i>et al.</i> )   | 10.07.2008        |
| D08       | US 20080152629 A1 (EDINGER, J. [US], <i>et al.</i> )  | 26.06.2008        |

**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 pluripotentes obtenidas de pulpa dental, un medio de cultivo de estas células, el método de obtención de las mismas, y su uso en la fabricación de medicamentos destinados a regeneración de tejidos, concretamente de tejido óseo, neuronal y hepático.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue células madre de pulpa dental con las mismas características técnicas de las células reivindicadas en la invención, por lo que la solicitud tiene novedad según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Sin embargo, se han encontrado en numerosos documentos del estado de la técnica células madre aisladas de pulpa dental, que tienen la misma capacidad pluripotente de las células reivindicadas, y documentos que divulgan el medio de cultivo de la solicitud, por lo que ésta no cumple el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la mencionada Ley de Patentes.

Así, en el documento D01, se describe el aislamiento de células madre pluripotentes a partir de muestras de pulpa dental, y se demuestra su capacidad de diferenciación a células de las líneas germinales (osteoblastos, neuronas y hepatocitos). A pesar de que el análisis de los marcadores de superficie de las células aisladas en D01 no coincide exactamente con los marcadores reivindicados en la solicitud de patente, en ambos casos las células expresan marcadores de pluripotencia (Oct-4 y Nanog) y marcadores típicos de células mesenquimales (como CD90 o CD105), y no expresan marcadores hematopoyéticos (CD34 o CD45). No se considera que esta diferencia en los marcadores confiera actividad inventiva a la solicitud, pues no existe un criterio claro acerca de la asociación de cada uno de los marcadores con un determinado tipo celular; además, el hecho de que expresen unos marcadores u otros no está relacionado de forma inequívoca con la capacidad pluripotente de las células, ni con el uso que se reivindica para ellas. Por todo esto, se considera que las reivindicaciones 1 a 4 y 8 a 15 no tienen actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el documento D01.

Por otro lado, en el documento D02 se divulga un medio de cultivo de células multipotentes que, como el medio de cultivo de la solicitud, contiene los factores de crecimiento EGF y PDGF y el factor de transcripción LIF. El experto en la materia no tendría que realizar ningún esfuerzo inventivo para combinar los documentos D01 y D02 y, a partir de la información contenida en ellos, utilizar el medio de D02 para cultivar células madre pluripotentes de pulpa dental, por lo que las reivindicaciones 5 a 7 de la solicitud tampoco tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D03 también se obtienen células madre pluripotentes de pulpa dental humana. Como las células madre de la solicitud, las células aisladas en el documento D03 expresan, entre otros, los marcadores Oct-4, Nanog, SSA-4 (características de células madre embrionarias y, por tanto, pluripotentes), CD105 (específico de células mesenquimales), y CD13, y no expresan los marcadores propios de células hematopoyéticas (como CD34 o CD45). La pluripotencialidad de las células de D03 se demuestra, además, por su capacidad de diferenciación a tejidos derivados de diferentes capas embrionarias (condrocitos y neuronas). La información divulgada en el documento D03 afecta, por tanto, la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4, 8, 10, 12 y 14.

En el documento D04, el experto en la materia encontraría un medio para cultivar células pluripotentes que contiene los factores EGF, PDGF y LIF (ver página 19 del documento), y una gran cantidad de protocolos para conseguir la diferenciación de estas células a tejidos de los tres linajes embrionarios, concretamente, y en lo que afecta a la solicitud, a hepatocitos (ejemplo 14), a células osteogénicas (ejemplo 15), y a células neurales (ejemplo 22) y nervio (ejemplo 30). Esta información, junto con la divulgada en D03, se emplearía de forma evidente para cultivar las células madre de la solicitud en el medio de las reivindicaciones 5 y 6, para deducir el método de la reivindicación 7, y para diferenciar las células a tejido óseo, neuronal y hepático. Por ello, la combinación de los documentos D03 y D04 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 5 a 7, 9, 11, 13 y 15.

Como en los documentos anteriores, en D05 encontramos el aislamiento de células madre pluripotentes de pulpa dental, y su diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, y en el documento D06, un medio de cultivo para células pluripotentes similar al reivindicado en la solicitud de patente, y la diferenciación de células pluripotentes a tejido neural y hepático. Por tanto, el documento D05 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4, 8, 9, 12 y 13, y la combinación de los dos documentos, la de las reivindicaciones 5 a 7, 10, 11, 14 y 15.

Igualmente, en la patente WO 2008/080200 A1 (documento D07) se describe el aislamiento y caracterización de células madre de pulpa dental humana. Son células pluripotentes, que expresan marcadores similares a los de las células de la solicitud (ver ejemplos 1 y 2), y capaces de diferenciarse a linaje ectodérmico (neuronas) y mesodérmico (músculo esquelético y cartílago) (ver ejemplo 5). Por otra parte, en la patente US 2008/0152629 A1 (documento D08), encontramos el medio de cultivo de la solicitud (en los párrafos [0166]-[0170]), y la diferenciación neuronal y osteogénica de células pluripotentes (párrafos [0196]-[0198], [0206]-[0208], [0355]-[0360] y [0369]-[0376]). Como en los casos explicados anteriormente, el documento D07 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4, 8, 10, 12 y 14, y la combinación de los documentos D07 y D08, afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 5 a 7, 9 y 13.