

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 794**

21 Número de solicitud: 201030791

51 Int. Cl.:
C12N 5/077 (2010.01)
A61K 35/32 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **25.05.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2011**

Fecha de la concesión: **19.10.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **31.10.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
AVDA. AMERICO VESPUCIO, 5 BLOQUE 2 2
PLANTA, PARQUE TECNOLÓGICO CARTUJA 93
41092 SEVILLA, ES y
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

72 Inventor/es:
**CAMPOS MUÑOZ, Antonio;
ALAMINOS MINGORANCE, Miguel;
HERNANDEZ CORTES, Pedro y
MORALES VILLAESCUSA, Alvaro**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **BIOMARCADOR DE CÉLULAS CARTILAGINOSAS HUMANAS.**

57 Resumen:
Biomarcador de células cartilaginosas humanas.
La presente invención se refiere al uso de un biomarcador en la selección de células destinadas al trasplante, en concreto, un biomarcador de células precursoras del cartílago que comprende al menos un producto de expresión del gen *susd-2* y sus derivados.

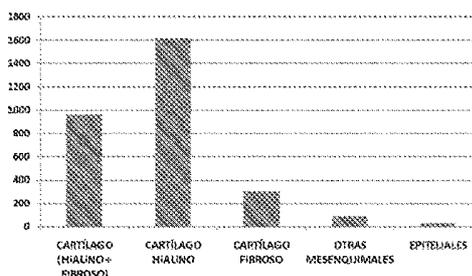


FIG. 1

ES 2 370 794 B1

DESCRIPCIÓN

Biomarcador de células cartilagosas humanas.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina y, más específicamente, de la ingeniería tisular y medicina regenerativa. En concreto, la presente invención se refiere al uso de un biomarcador en la selección de células destinadas al trasplante.

10

Estado de la técnica anterior

El cartílago es un tejido conectivo especializado, el cual posee una matriz flexible firme que resiste a las tensiones mecánicas. Participa en el sostén del cuerpo, por estar íntimamente asociado al sistema esquelético. El cartílago posee células llamadas condrocitos, que ocupan cavidades pequeñas llamadas lagunas dentro de la matriz extracelular que secretan. La matriz extracelular del cartílago no está vascularizada ni innervada, y no posee vasos linfáticos; sin embargo, las células reciben su nutrición a partir de los vasos sanguíneos de los tejidos conectivos circundantes y del líquido sinovial por difusión a través de la matriz. La matriz extracelular está compuesta por glucosaminoglucanos y proteoglucanos, íntimamente asociados con fibras de colágeno y elásticas embebidas en la matriz (Deiters y Prehm, *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(1):R8).

20

Según las fibras que se encuentren en la matriz extracelular, existen tres tipos de cartílago (Finn y Geneser, 3ª ed., 2000):

25

- *Cartílago Hialino*: La matriz extracelular es flexible y semitranslúcida, de color gris azulado, rica en colágeno tipo II. Es el más frecuente del cuerpo. Se encuentra en nariz, laringe, extremos ventrales de las costillas (en los sitios en los que éstas conectan con el esternón), y en los anillos traqueales y bronquiales. Este cartílago forma el modelo cartilaginoso de muchos de los huesos durante el desarrollo embrionario, y constituye las placas epifisarias de los huesos en crecimiento.
- *Cartílago Elástico*: El cartílago elástico se encuentra en orejas, conductos auditivos externo e interno, epiglotis y laringe (cartílago cuneiforme). En casi todos los aspectos, el cartílago elástico es idéntico al cartílago hialino, y frecuentemente se relaciona con él. La capa fibrosa externa de pericondrio (tejido conectivo denso irregular, encargado del crecimiento y la regeneración del cartílago) es rica en fibras elásticas. La matriz del cartílago elástico posee abundantes fibras elásticas ramificadas que varían entre finas y gruesas, interpuestas con haces de fibras colágenos de tipo II, aportando mayor flexibilidad que la matriz del cartílago hialino. Los condrocitos del cartílago elástico son más abundantes y de mayor tamaño que los del cartílago hialino.
- *Fibrocartílago*: Se encuentra en discos intervertebrales, sínfisis del pubis y discos articulares, e insertado en el hueso. Se encuentra asociado con cartílago hialino y con tejido conectivo denso. A diferencia de los otros dos tipos de cartílago, el fibrocartílago no posee pericondrio, tiene una cantidad escasa de matriz extracelular rica en condroitín sulfato y dermatán sulfato y presenta haces de colágeno tipo II. Los condrocitos suelen encontrarse alineados en filas paralelas alternativas con los haces gruesos de colágeno.

30

35

40

45

Numerosas patologías pueden afectar al cartílago humano, siendo muy frecuentes las enfermedades de origen autoinmune, infeccioso, traumático o degenerativo, destacando por su elevada frecuencia la artrosis, la artritis y las úlceras de la superficie articular. Todas estas enfermedades presentan una altísima incidencia y suponen un gran gasto sanitario en nuestro medio.

50

Los tratamientos convencionales para la reparación del cartílago articular incluyen microfracturas, mosaicoplastias, y el uso de autoinjertos y trasplantes heterólogos. El trasplante autólogo de condrocitos ha surgido como una alternativa al tratamiento clínico convencional de los defectos cartilagosos, siendo posible en muchos casos reducir el dolor y mejorar la función articular del paciente mediante el implante autólogo de condrocitos. Hasta el momento, la investigación en este campo se basa en el cultivo de condrocitos para su aplicación clínica como células en suspensión (ACI, *autologous chondrocyte implant*) o, más recientemente, para su cultivo sobre membranas biocompatibles, aplicándose al paciente como una membrana sobre la cual se cultiva una monocapa de células cartilagosas (MACI, *membrane autologous chondrocyte implant*). Sin embargo no existe un tejido artificial óptimo para el crecimiento de dichos condrocitos.

55

60

Desde 1987, múltiples investigadores han desarrollado protocolos de cultivo e implante clínico de condrocitos cultivados en laboratorio en más de 12.000 pacientes (Marlovits *et al.*, *Eur J Radiol.* 2006, 57(1):24-31), siendo los resultados muy variables de un estudio a otro. Mientras algunos ensayos sugieren que el uso de estas técnicas puede resolver los problemas articulares de forma muy efectiva, la mayoría de los estudios, incluyendo metaanálisis y trabajos de revisión, demuestran que la utilidad del implante autólogo de condrocitos es muy limitada. Probablemente, esto se deba a la baja densidad del tejido cartilaginoso formado o la insuficiente cantidad y calidad de las células implantadas en el paciente. En general, el cartílago generado tras el implante autólogo de condrocitos es rico en

65

colágeno tipo I, con características bioquímicas y biomecánicas deficientes y muy distintas de las existentes en el cartílago nativo, rico en colágeno tipo II (Tuli *et al.*, *Arthritis Res Ther.* 2003, 5(5):235-238). Este hecho podría deberse, con elevada probabilidad, a que las células utilizadas para la terapia celular del cartílago podrían presentar bajos índices de viabilidad celular o bien por el uso de células diferentes a condrocitos bien diferenciados y funcionales.

5

Numerosos investigadores han demostrado que las células adultas humanas tienden a desdiferenciarse y a perder funcionalidad cuando se mantienen en cultivo durante tiempos prolongados (Rodríguez-Morata *et al.*, *Ann Vasc Surg.* 2008, 22(3):440-448; Alaminos *et al.*, *J Cell Physiol.* 2007, 211(3):692-698). Del mismo modo, es muy frecuente encontrar células mesenquimales o conectivas contaminantes de los cultivos de condrocitos, especialmente los fibroblastos procedentes del pericondrio. Por ese motivo, es importante desarrollar métodos que permitan controlar los niveles de diferenciación de las células cultivadas para asegurar el uso de células bien diferenciadas en la terapia celular del cartílago y evitar el uso de células contaminantes. A pesar de ello, hasta la fecha no se han descrito marcadores suficientemente específicos de los condrocitos humanos, utilizándose hasta el momento criterios puramente morfológicos junto con la expresión de colágeno II o agregán, compuestos existentes en la matriz extracelular del cartílago hialino maduro.

10

15

El gen *sushi domain containing protein-2* (*susd-2*; número de acceso genbank AK026431), está conservado en mamíferos (chimpancé, perro, vaca, ratón, rata) aves (pollo) peces (pez cebra) e invertebrados (mosca de la fruta, mosquito y *C. elegans*). En humanos, el gen *susd-2* está localizado en el cromosoma 22q11-q12. La expresión de SUSD2 no ha sido determinada hasta la fecha en células del cartílago humano o animal. La predicción de los niveles de expresión se puede llevar a cabo utilizando programas informáticos como e-Northern (Northern-Blot virtual), el cual indica que los niveles de ARNm podrían ser elevados en riñón y pulmón, pero no en cartílago (Gene-Cards, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SUSD2&search=SUSD2>).

20

25

30

Para asegurar el éxito de la terapia celular con condrocitos autólogos, sería necesario contar con un marcador específico del condrocito humano que se exprese en la superficie o en el citoplasma de las células mantenidas en cultivo. Además, el campo de la técnica carece de una plataforma biocompatible que provea las condiciones óptimas para la regeneración del tejido cartilaginoso.

35

Explicación de la invención

La presente invención provee un nuevo biomarcador de condrocitos en cultivo que permite la identificación específica de las células de linaje cartilaginoso frente a otras células de estirpe mesenquimal o conectiva presentes en el cultivo. El uso del biomarcador de la presente invención junto con una plataforma de crecimiento específica para condrocitos optimiza la regeneración del tejido cartilaginoso.

40

45

Los inventores de la presente solicitud han descubierto que, sorprendentemente, el gen *susd-2* se expresa en condrocitos humanos mantenidos en cultivo y por lo tanto se puede utilizar para diferenciar éstos de otros tipos de células mesenquimales y conectivas también presentes.

50

Así, un primer objeto de la presente invención es un biomarcador de células precursoras del cartílago caracterizado porque comprende al menos un producto de expresión del gen *susd-2* o algún fragmento de al menos uno de ellos.

55

60

La presente invención facilita la selección de los condrocitos en cultivo mediante el análisis de los niveles de expresión del gen *susd-2*. Los productos de expresión de dicho gen pueden ser su ARN mensajero (ARNm; de ahora en adelante también SEQ ID No 1) o la proteína que codifica, denominada *sushi domain containing 2* (SUSD2; de ahora en adelante también SEQ ID No 2). Según esto, en una realización preferida, el biomarcador de la presente invención comprende la SEQ ID No 1 o algún fragmento de esta. Así mismo, en otra realización preferida, el biomarcador de la presente invención comprende la SEQ ID No 2 o algún fragmento de esta.

65

Para determinar la expresión del biomarcador de la presente invención, se utilizan técnicas ampliamente conocidas en el campo de la técnica. Por ejemplo, la expresión del gen *susd-2* en su forma de SEQ ID No1 se puede analizar mediante RT-PCR cuantitativa o microarrays de ARN. Mientras que para analizar la expresión en su forma de SEQ ID No 2 se utilizan técnicas de inmunohistoquímica, western-blot o microarrays de proteínas.

70

Tal como se ha mencionado anteriormente, la utilidad del biomarcador de la presente invención viene definida por proveer capacidad discriminatoria a la hora de seleccionar las células de un cultivo que realmente van a dar lugar a condrocitos maduros y funcionales una vez transplantados. Por esto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del biomarcador de la presente invención en la selección de células *in vitro* destinadas al trasplante. En una realización preferida, el biomarcador de la presente invención se utiliza en la selección de células *in vitro* para la preparación de un implante celular. En otra realización preferida, el biomarcador de la presente invención se utiliza en la selección de células *in vitro* para la preparación de un tejido artificial.

75

Más preferentemente, el biomarcador de la presente invención se utiliza en un método de preparación *in vitro* de un tejido artificial que comprende un paso de selección *in vitro* de células en cultivo que expresan el gen *susd-2*.

Descripción de las figuras

Figura 1. Cuantificación del ARNm del gen *susd-2* en diferentes tipos de cartílago así como en distintos tipos celulares. Los valores obtenidos se expresan en unidades de fluorescencia. Estos datos demuestran que la expresión del gen *susd-2* es significativamente mayor en todos los tipos de cartílago en comparación con células procedentes de tejido epitelial y células mesenquimales.

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

Cuantificación de los niveles de expresión del gen susd-2 en condrocitos en cultivo

El análisis se ha realizado cuantificando la expresión de *susd-2* a nivel de ARNm utilizando microarrays comerciales de ARN de la casa comercial Affymetrix® (sistema *Human-Genome U133 plus 2.0*). Los resultados muestran que la expresión media de este gen en el cartílago humano es de 957,9 U.F. (unidades fluorescentes de la casa comercial Affymetrix®), siendo 1612,7 U.F. en el cartílago hialino humano y 303,1 U.F. en el cartílago fibroso (fibrocartílago). Estos valores son significativamente superiores ($p < 0.001$) a los encontrados en otros tipos de células mesenquimales, incluyendo los fibroblastos de la mucosa oral y de la piel y las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (media 85,6 U.F.) y en células epiteliales de la córnea y de la mucosa oral (media 29,6 U.F.) (Figura 1 y Tabla 1).

Estos resultados demuestran que los condrocitos mantenidos en cultivo expresan cantidades significativamente superiores de ARNm del gen *susd-2* a que otros tipos celulares tanto de tipo mesenquimal como de tipo epitelial, por lo que su cuantificación podría ser un útil biomarcador específico de condrocitos humanos para uso clínico.

TABLA 1	CARTÍLAGO O (HIALINO + FIBROSO)	CARTÍLAGO O HIALINO	CARTÍLAGO O FIBROSO	OTROS TIPOS DE CÉLULAS MESENQUIMALES	CÉLULAS EPITELIALES
SUSD2	957,9	1612,7	303,1	85,6	29,6

REIVINDICACIONES

- 5 1. Biomarcador de células precursoras del cartílago **caracterizado** porque comprende al menos un producto de expresión del gen *susd-2*.
2. Biomarcador según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende la SEQ ID No 1.
3. Biomarcador según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende la SEQ ID No 2.
- 10 4. Uso de un biomarcador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la selección de células *in vitro* destinadas al trasplante.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4 en la selección de células *in vitro* para la preparación de un implante celular.
6. Uso según la reivindicación 4 en la selección de células *in vitro* para la preparación de un tejido artificial.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

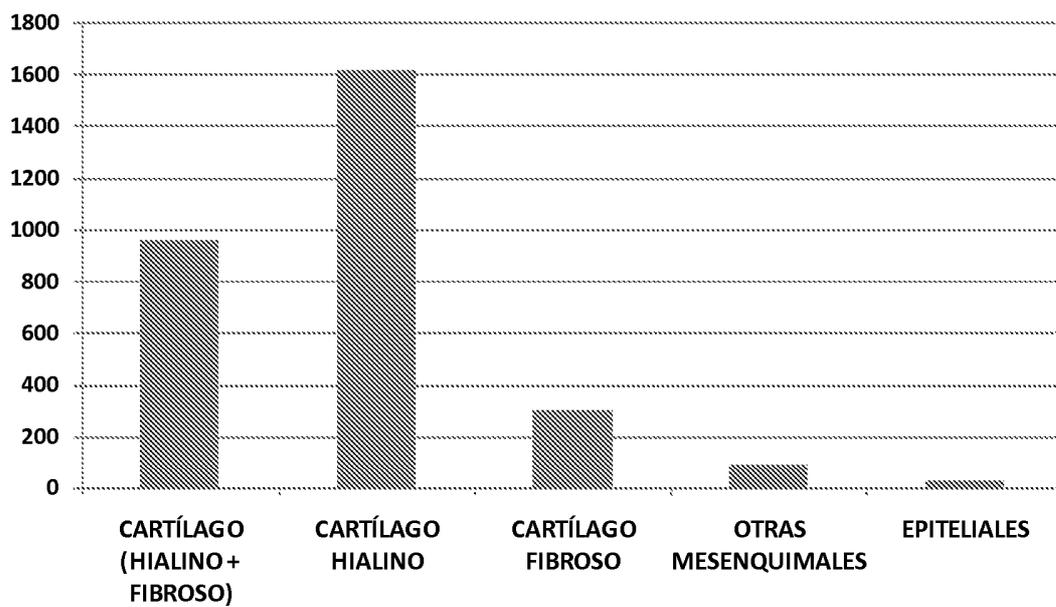


FIG. 1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Servicio Andaluz de salud

5 <120> Biomarcador de células cartilaginosas humanas

<130> FIBAO-69

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 3201

<212> DNA complementario a ARN mensajero

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 1

	gcctcggagc cactgcaactg ctggctgcag acacaggctg caccatgaag ccagccctcc	60
25	tgccctgggc cctgctgctg ctggcgacag ccctcggccc gggccccgga cccacagcag	120
	atgcccaga gagctgctcc atgcgctgtg ggcgcttga cgggcatgt tcctgccacc	180
	cgacgtgctc tggccttggc acctgctgct tggatttccg ggacttctgc ctggagatat	240
30	tgccctactc aggatccatg atggcgaggc aggactttgt ggtgcggcac ttcaagatgt	300
	ccagccccac agacgccagt gtgatctgca ggtttaagga cagcatccag accctcggcc	360
	atgtggactc ctccgggcaa gtgcaactgt tgtcacctct gctctatgag agcggccgca	420
35	tccccctcac tgtgtcactg gacaacggcc actccttccc tcgtgcgggc acctggctgg	480
	ctgtgcaccc caacaaagtg tcaatgatgg agaagagcga gttggtgaac gagacgcgtt	540
	ggcaatacta cggcaccgcc aacacctcag gcaacctcag cctgacctgg catgtcaagt	600
40	cgctgcccac gcagaccatc accatcgaac tgtggggcta cgaggagaca ggaatgccct	660
	actcacagga gtggactgca aagtggctgt acctgtacct cctggccaca cacatcccca	720
45	actccggctc tttcactttc accccaaaac ctgctcctcc cagctaccag agatggcgag	780
	tgggtgcact tcggatcatc gacagcaaaa attacgcagg gcagaaggac gtgcaggcgc	840
	tctggaccaa cgaccagca ctggcctggc acctgagcga tgacttccga gaggacctg	900
50	tggcctgggc acgaactcag tgccaggcct gggaggagct ggaggatcag ctgcccact	960
	tcctggagga gctgcccggc tgcccctgca ccctgacctc gggccgggct gactccggcc	1020
	gcttcttcac ggactacggc tgtgacatgg agcagggcag cgtgtgcacc taccaccccg	1080
55	gggccgtgca ctgtgtgcgt tctgtgcagg ccagcctccg gtacggctca ggtcagcagt	1140
	gctgctacac agcggacggg acgcagctcc tgacagctga ctccagcggc ggcagcactc	1200
60	ccgaccgagg ccatgactgg ggcgcacccc cgttccgcac gccaccccga gtgcccagca	1260
	tgtcccactg gctctacgat gtcctcagct tctattactg ctgcctctgg gcacccgact	1320
	gccccgcta catgcaacgg cggccctcca atgactgccg caactaccgg cccccaagac	1380
65	tggcctccgc cttcggagac ccacactttg tgaccttcca cggcaccaac ttcacattca	1440
	atgggcgagg agagtacgtg ctgctggagg cagcgtgac cgacctgagg gtgcaggcgc	1500

ES 2 370 794 B1

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

gggcccagcc cgggacgatg tccaacggca cggagacccg tggcactggg ctgaccgcag 1560
 tggccgtcca ggagggcaac tcagatgtgg tggaaagtcag gctggccaac aggaccggag 1620
 gtctggaggt gctgctgaac caggaggtgc tgagcttcac cgagcagagc tggatggacc 1680
 tгаааgгаат gttcctgtcg gtggctgccg gggacagggc ctccatcatg ctggcatcag 1740
 gggccggcct ggaggtcagc gtgcagggcc cgttcctgag tgtgtccgtc ctgctgcctg 1800
 agaagttcct caccacacacc cacggcctcc tcgggacact caacaacgac cccaccgcag 1860
 acttcaccct gcacagcggg cgcgtcctgc cccagggcac cagtccccag gagctgttcc 1920
 tgtttggggc caactggacc gtgcacaatg cgtcctccct gctcacctac gattcctggt 1980
 tcctgggtcca caacttctg taccaacca agcacgaccc caccttcgag cccctcttcc 2040
 ccagtггagac caccctcaac cccagcctgg cacaagaggc agccaaacta tgtggggagc 2100
 atcattttctg caactttgat gtggcagcca ctgggagcct gagcacgggc actgccactc 2160
 ggggtggcca ccagctgcac cagcgtcgca tgcagagcct gcagccagtg gtgtcctgtg 2220
 gctggctggc cccacctccc aacggacaaa aggagggcaa caggtagctg gcgggttcca 2280
 ccatctactt cactgtgac aacggctaca gcctggccgg ggсagagacc agcacctgcc 2340
 aggctгacgg cacctggctc tcaccaccc cгаагtgcca gccaggacgc agctacgcgg 2400
 tgctgtttggg catcatcttt gggggcctcg cggtgggtggc ggсggttgcg ctcgtctatg 2460
 tgctgctgcg ccgсaggaag ggcaacacgc acgtctgggg tgcacagccc tgatgggagc 2520
 agcttggtctg tgagcaccag gccaaгactc ctгagaacag gcagcccagt cctгcгactc 2580
 ccgсatcccc aggaccagac acctgggacc tggatacttg atacctgggc atttaacccc 2640
 ctactctgtc atctcagacc ccaggcagga ggcccagtgt tccaacaccc aagccccgtg 2700
 ctagcagcgc tccgtgctct tccccaaata ctcacggctc taattcccc aacctgaaac 2760
 ttcataccct gggattctaa tacctatgtc ctгagccctg aсactcccac acctгagcct 2820
 cagattccaa tagctcactc cctagagcct гacгccgggg cccctгacc ctгagcctca 2880
 gattccaata cctcactccc cagagcctга tgccggggcc cctгaccct gatctacgga 2940
 ggсctгctcc cggaccgtgc gggcaccagt gcagtgctgc cttggttcct ggaccctгg 3000
 gcccatcctg ggaccцcaga tggggtaagg agaggcccc gaaccцcaa gcagacagcg 3060
 agaccцccag cggcagaggc ctccctгggc actccaggct tataatttcg aactcttctg 3120
 gaaggctact caggaaсacc ctccctгcct gtgcaaagag aaaacaagcg cctгgtttcc 3180
 ttcaaaaaa aaaaaaaaa a 3201

<210> 2

<211> 822

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 370 794 B1

<400> 2

5 Met Lys Pro Ala Leu Leu Pro Trp Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ala
 1 5 10
 Leu Gly Pro Gly Pro Gly Pro Thr Ala Asp Ala Gln Glu Ser Cys Ser
 20
 10 Met Arg Cys Gly Ala Leu Asp Gly Pro Cys Ser Cys His Pro Thr Cys
 35 40 45
 15 Ser Gly Leu Gly Thr Cys Cys Leu Asp Phe Arg Asp Phe Cys Leu Glu
 50 55 60
 20 Ile Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Met Met Gly Gly Lys Asp Phe Val Val
 65 70 75 80
 Arg His Phe Lys Met Ser Ser Pro Thr Asp Ala Ser Val Ile Cys Arg
 85 90 95
 25 Phe Lys Asp Ser Ile Gln Thr Leu Gly His Val Asp Ser Ser Gly Gln
 100 105 110
 30 Val His Cys Val Ser Pro Leu Leu Tyr Glu Ser Gly Arg Ile Pro Phe
 115 120 125
 35 Thr Val Ser Leu Asp Asn Gly His Ser Phe Pro Arg Ala Gly Thr Trp
 130 135 140
 40 Leu Ala Val His Pro Asn Lys Val Ser Met Met Glu Lys Ser Glu Leu
 145 150 155 160
 Val Asn Glu Thr Arg Trp Gln Tyr Tyr Gly Thr Ala Asn Thr Ser Gly
 165 170 175
 45 Asn Leu Ser Leu Thr Trp His Val Lys Ser Leu Pro Thr Gln Thr Ile
 180 185 190
 50 Thr Ile Glu Leu Trp Gly Tyr Glu Glu Thr Gly Met Pro Tyr Ser Gln
 195 200 205
 Glu Trp Thr Ala Lys Trp Ser Tyr Leu Tyr Pro Leu Ala Thr His Ile
 210 215 220
 55 Pro Asn Ser Gly Ser Phe Thr Phe Thr Pro Lys Pro Ala Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 60 Tyr Gln Arg Trp Arg Val Gly Ala Leu Arg Ile Ile Asp Ser Lys Asn
 245 250 255
 65 Tyr Ala Gly Gln Lys Asp Val Gln Ala Leu Trp Thr Asn Asp His Ala
 260 265 270

ES 2 370 794 B1

Leu Ala Trp His Leu Ser Asp Asp Phe Arg Glu Asp Pro Val Ala Trp
 275 280 285
 5 Ala Arg Thr Gln Cys Gln Ala Trp Glu Glu Leu Glu Asp Gln Leu Pro
 290 295 300
 10 Asn Phe Leu Glu Glu Leu Pro Asp Cys Pro Cys Thr Leu Thr Gln Ala
 305 310 315 320
 15 Arg Ala Asp Ser Gly Arg Phe Phe Thr Asp Tyr Gly Cys Asp Met Glu
 325 330 335
 20 Gln Gly Ser Val Cys Thr Tyr His Pro Gly Ala Val His Cys Val Arg
 340 345 350
 25 Ser Val Gln Ala Ser Leu Arg Tyr Gly Ser Gly Gln Gln Cys Cys Tyr
 355 360 365
 30 Thr Ala Asp Gly Thr Gln Leu Leu Thr Ala Asp Ser Ser Gly Gly Ser
 370 375 380
 35 Thr Pro Asp Arg Gly His Asp Trp Gly Ala Pro Pro Phe Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 40 Pro Arg Val Pro Ser Met Ser His Trp Leu Tyr Asp Val Leu Ser Phe
 405 410 415
 45 Tyr Tyr Cys Cys Leu Trp Ala Pro Asp Cys Pro Arg Tyr Met Gln Arg
 420 425 430
 50 Arg Pro Ser Asn Asp Cys Arg Asn Tyr Arg Pro Pro Arg Leu Ala Ser
 435 440 445
 55 Ala Phe Gly Asp Pro His Phe Val Thr Phe Asp Gly Thr Asn Phe Thr
 450 455 460
 60 Phe Asn Gly Arg Gly Glu Tyr Val Leu Leu Glu Ala Ala Leu Thr Asp
 465 470 475 480
 65 Leu Arg Val Gln Ala Arg Ala Gln Pro Gly Thr Met Ser Asn Gly Thr
 485 490 495
 70 Glu Thr Arg Gly Thr Gly Leu Thr Ala Val Ala Val Gln Glu Gly Asn
 500 505 510
 75 Ser Asp Val Val Glu Val Arg Leu Ala Asn Arg Thr Gly Gly Leu Glu
 515 520 525
 80 Val Leu Leu Asn Gln Glu Val Leu Ser Phe Thr Glu Gln Ser Trp Met
 530 535 540

ES 2 370 794 B1

Asp Leu Lys Gly Met Phe Leu Ser Val Ala Ala Gly Asp Arg Val Ser
 545 550 555 560

5 Ile Met Leu Ala Ser Gly Ala Gly Leu Glu Val Ser Val Gln Gly Pro
 565 570 575

10 Phe Leu Ser Val Ser Val Leu Leu Pro Glu Lys Phe Leu Thr His Thr
 580 585 590

15 His Gly Leu Leu Gly Thr Leu Asn Asn Asp Pro Thr Asp Asp Phe Thr
 595 600 605

20 Leu His Ser Gly Arg Val Leu Pro Pro Gly Thr Ser Pro Gln Glu Leu
 610 615 620

25 Phe Leu Phe Gly Ala Asn Trp Thr Val His Asn Ala Ser Ser Leu Leu
 625 630 635 640

30 Thr Tyr Asp Ser Trp Phe Leu Val His Asn Phe Leu Tyr Gln Pro Lys
 645 650 655

35 His Asp Pro Thr Phe Glu Pro Leu Phe Pro Ser Glu Thr Thr Leu Asn
 660 665 670

40 Pro Ser Leu Ala Gln Glu Ala Ala Lys Leu Cys Gly Asp Asp His Phe
 675 680 685

45 Cys Asn Phe Asp Val Ala Ala Thr Gly Ser Leu Ser Thr Gly Thr Ala
 690 695 700

50 Thr Arg Val Ala His Gln Leu His Gln Arg Arg Met Gln Ser Leu Gln
 705 710 715 720

55 Pro Val Val Ser Cys Gly Trp Leu Ala Pro Pro Pro Asn Gly Gln Lys
 725 730 735

60 Glu Gly Asn Arg Tyr Leu Ala Gly Ser Thr Ile Tyr Phe His Cys Asp
 740 745 750

65 Asn Gly Tyr Ser Leu Ala Gly Ala Glu Thr Ser Thr Cys Gln Ala Asp
 755 760 765

70 Gly Thr Trp Ser Ser Pro Thr Pro Lys Cys Gln Pro Gly Arg Ser Tyr
 770 775 780

75 Ala Val Leu Leu Gly Ile Ile Phe Gly Gly Leu Ala Val Val Ala Ala
 785 790 795 800

80 Val Ala Leu Val Tyr Val Leu Leu Arg Arg Arg Lys Gly Asn Thr His
 805 810 815

85 Val Trp Gly Ala Gln Pro
 820



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030791

22 Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Int. Cl. : **C12N5/077** (2010.01)
A61K35/32 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20030109038 A1 (R. SCOTT THIES) 12.06.2003, todo el documento.	1-6
A	US 20030235813 A1 (FRANK LUYTEN; COSIMO DE BARI; FRANCESCO DELL'ACCIO) 25.12.2003, todo el documento.	1-6
A	WO 0125402 A1 (TIGENIX N.V.) 12.04.2001, todo el documento.	1-6

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
07.11.2011

Examinador
M. M. García Coca

Página
1/4

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)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	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	US 20030109038 A1 (R. SCOTT THIES)	12.06.2003
D02	US 20030235813 A1 (FRANK LUYTEN; COSIMO DE BARI; FRANCESCO DELL'ACCIO)	25.12.2003
D03	WO 0125402 A1 (TIGENIX N.V.)	12.04.2001

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-6 es un biomarcador de células precursoras del cartílago que comprende al menos un producto del gen *susd2* (reiv. 1-3). Es también objeto de la invención el uso de dicho biomarcador para la selección de células destinadas al trasplante, para la preparación de un implante celular y para la preparación de un tejido artificial (reiv. 4-6).

Novedad y Actividad Inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga un sistema para la obtención de células de primate que se han diferenciado de células pluripotentes a células precursoras de condrocitos. Estas últimas son identificadas por su habilidad de sintetizar colágeno tipo II y agregan de forma endógena. Este documento también divulga un método para la obtención de estas células mediante un cultivo con factores que promueven la diferenciación a condrocitos de las células pluripotentes. En este documento también se describe un método para la producción de cartílago a partir de dichas células precursoras y una composición farmacéutica, que contiene dichas células, para la producción, la reparación, reconstrucción, o el mantenimiento del cartílago *in vivo*.

El documento D02 divulga marcadores de células con fenotipo estable de condrocitos, que son utilizados para seleccionar y aislar dichas poblaciones celulares para la elaboración de composiciones terapéuticas útiles para la reparación de tejidos.

El documento D03 divulga un método para aislar células precursoras y su uso para la reparación de tejidos. En este documento las células que son aisladas e identificadas son células precursoras de esqueleto, para lo que se usan distintos marcadores moleculares, como el CDMP-1. Las células que expresan dicho marcador pueden ser diferenciadas para dar lugar a cualquier tipo de tejido conectivo, incluido el cartílago (ver página 21 línea 4-página 22 línea 5). En este documento también se divulga el uso de estas células como implantes celulares para la reparación de cartílago (ver página 22 línea 6-página 23 línea 1).

En ninguno de los documentos mencionados del estado de la técnica, se relaciona el gen *susd-2* con las células precursoras del cartílago. En dichos documentos se utilizan células pluripotentes o distintos tipos de células precursoras (no únicamente células precursoras de cartílago) que son cultivadas en medios que favorecen la diferenciación hacia condrocitos, para posteriormente utilizar dichas células para la regeneración de tejidos, o para implantes celulares en reparación de cartílago.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados (D01-D03), tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-6. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-19 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).