



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 547**

51 Int. Cl.:
C12N 5/08 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61K 35/32 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97934171 .6**
86 Fecha de presentación : **21.07.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0954565**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.1999**

54 Título: **Diferenciación adipogénica de células madre mesenquimatosas humanas.**

30 Prioridad: **30.07.1996 US 700753**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **Osiris Therapeutics, Inc.**
2001 Aliceanna Street
Baltimore, Maryland 21231-2001, US

72 Inventor/es: **Pittenger, Mark, F.**

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro**

ES 2 274 547 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diferenciación adipogénica de células madre mesenquimatosas humanas.

5 Esta solicitud es una continuación parcial del documento US con número de serie 08/700.753, presentado el 30 de julio de 1996 (en trámite).

Esta invención se refiere a adipocitos, y más particularmente a producir adipocitos a partir de células madre mesenquimatosas humanas.

10 El tejido adiposo proporciona una reserva para almacenamiento de energía para el cuerpo en forma de triglicéridos, y este tejido puede liberar ácidos grasos libres cuando la ingesta calórica disminuye por debajo de las necesidades metabólicas. En respuesta a una ingesta alimenticia aumentada, el cuerpo normalmente aumentará automáticamente el consumo de energía mediante actividad para mantener un equilibrio energético. La energía también se puede liberar como calor. El tejido adiposo está íntimamente involucrado en el mantenimiento de la temperatura corporal por el tejido adiposo marrón y el almacenamiento de energía por el tejido adiposo blanco. Hay vías normales de regulación de la energía que equilibran la ingesta alimenticia con la actividad metabólica mediadas en gran parte por el hipotálamo. Actualmente es evidente que los adipocitos desempeñan un papel activo en este proceso, y que probablemente producen moléculas que sirven para retroalimentar y efectuar la regulación del metabolismo de los triglicéridos.

20 Los dos tipos de tejido adiposo, marrón y blanco, desempeñan papeles muy diferentes en el cuerpo. El adiposo blanco se estructura para almacenar el exceso de ingesta calórica, mientras que el tejido adiposo marrón usa un sistema único para desviar el exceso de calorías y usarlas para generar calor corporal. El calor se genera en la mitocondria del adiposo marrón, donde se utiliza la oxidación del sustrato para crear un gradiente de iones hidrógeno que después se colapsa de forma regulada generando calor en vez de ATP. Se ha demostrado que los animales transgénicos que carecen de adiposo marrón mantienen un metabolismo eficaz, son obesos y continúan comiendo en exceso (Lowell *et al.*, 1993). Otros estudios con roedores también han demostrado un vínculo entre obesidad, comida en exceso continuada y una sensibilidad al frío, sugiriendo una conexión con el sistema nervioso simpático (Friedman y Leibel, 1992).

30 El desequilibrio del metabolismo energético en el cuerpo conduce a varios estados de enfermedad, los más notables, obesidad y diabetes inducida por obesidad, y éstas se pueden describir como disfunciones de los tejidos de almacenamiento de energía. En 1950 (Ingalls *et al.*, 1950) se identificó una mutación en ratones que conduce a obesidad, y el gen se identificó recientemente por clonación posicional. El producto del gen ob es una proteína de 16.000 pm llamada leptina o proteína OB. La leptina solamente se produce por los adipocitos y es una hormona que regula el hipotálamo. Se ha identificado una mutación en ratón que resulta en la finalización prematura de la traducción de ARNm, de tal manera que no se produce una proteína leptina funcional (Zhang *et al.* 1994). El papel de la leptina en la regulación del metabolismo lipídico es un área de intensa investigación. Investigaciones recientemente publicadas incluyen estudios de elementos promotores secuencia arriba encontrados adyacentes al gen ob que se ha demostrado que se unen a C/EBP (o CCAAT/proteína de unión potenciadora) (Yeh *et al.*, 1995 y Hwang *et al.*, 1996). Tener un sistema experimental modelo para la adipogénesis *in vitro* de células humanas proporcionaría descubrimientos en este área.

45 Recientemente se ha informado de que la leptina puede servir como una hormona que regula la fertilidad, y que puede ser el vínculo entre el peso corporal apropiado y la fisiología reproductiva (Chehab *et al.* 1996). Las mujeres de peso insuficiente y las mujeres con sobrepeso tienen dificultades para concebir, y esto probablemente se asocia con el desequilibrio hormonal en el cuerpo de estos individuos. La conexión entre peso corporal, fertilidad y la leptina producida por los adipocitos se ha sospechado, y ahora ensayado en ratones. Cuando a los ratones obesos, que normalmente no producen descendencia si no se transplantan los ovarios a hembras sustitutas, se les inyectó leptina, disminuyó espectacularmente su peso corporal y fueron capaces de parir sus propias camadas (Chehab *et al.*, 1996).

50 Se demostró que una diversidad de tipos celulares producen vesículas que contienen lípidos en condiciones de cultivo específicas. Por ejemplo, las células de ratón 3T3-L1 obtenidas de NIH 3T3, una línea celular de ratón inmortalizada, se pueden hacer crecer y cultivar como una célula fibroblástica. Sin embargo, después de la exposición a dexametasona y a metil-isobutilxantina, las células experimentan diferenciación que resulta en la producción de vacuolas intracelulares que contienen lípidos (Spiegelman y Green, 1981). Se demostró que las células estromales de médula de rata experimentan diferenciación osteogénica y adipogénica cuando se cultivan con suero fetal de ternero y dexametasona, pero el tipo celular predominante varía dependiendo de las condiciones (Beresford *et al.*, 1992). Específicamente, cuando el análogo de esteroide dexametasona se presentaba durante todo el transcurso del cultivo, se favoreció la osteogénesis; pero cuando la dexametasona solamente se presentaba durante el cultivo secundario, predominaba la vía adipogénica, como se evidenció por marcadores específicos de linaje y observación citológica. Las células CH3 10T1/2 obtenidas de ratón son una línea celular multipotencial que, cuando se tratan con 5-azacitidina, experimentan diferenciación final a adipocitos, miocitos y condrocitos. La 5-azacitidina produce la inhibición de la metilación del ADN y, por tanto, produce la activación de unos cuantos genes responsables de la producción de estos linajes (Konieczny y Emerson, 1984).

65 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1 y el método de acuerdo con la reivindicación 4 para inducir a células madre mesenquimatosas humanas a diferenciarse de manera preferente al linaje adipogénico, es decir, a diferenciarse a adipocitos.

El solicitante ha observado que las células madre mesenquimatosas, y en particular las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC), se pueden dirigir para diferenciarse a adipocitos tratando las células madre mesenquimatosas humanas con (i) un glucocorticoide y (ii) un compuesto que eleva los niveles de AMPc intracelulares regulando positivamente la producción de AMPc o inhibiendo la degradación de AMPc; en particular un compuesto que inhibe compuestos que degradan AMPc.

De acuerdo con la invención, las células madre mesenquimatosas humanas se tratan con una dexametasona y una metil isobutilxantina que inhiben la actividad de un compuesto que degrada el AMPc; en particular un inhibidor de la fosfodiesterasa. Las células se cultivan posteriormente en un medio que contiene insulina y suero fetal bovino.

Las células madre mesenquimatosas humanas, así como su aislamiento y expansión, se han descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.486.359. Como se conoce en la técnica, las células madre mesenquimatosas humanas son capaces de producir dos o más diferentes tipos (linajes) de células mesenquimatosas o tejidos, y en particular tejido conectivo. La presente invención proporciona un método para generar adipocitos a partir de células madre mesenquimatosas humanas primarias (hMSC) de forma predecible y reproducible. La invención es única porque implica células humanas en cultivos primarios y sometidos a pases en vez de líneas celulares transformadas o inmortalizadas que se predeterminan para seguir la vía adipogénica. Las hMSC son capaces de entrar en múltiples linajes incluyendo los linajes osteocíticos, condrocíticos, miocíticos, tendocíticos y estromogénicos, y la presente invención proporciona un método y una composición para inducir a las hMSC a diferenciarse a adipocitos. En un aspecto preferido, de acuerdo con la presente invención, se induce las hMSC a diferenciarse esencialmente solamente a adipocitos, es decir, no hay producción o elaboración esencial de células de otros linajes mesenquimatosos. El método también se puede usar para generar adipocitos de MSC de otras especies tales como conejo, perro, rata y ratón.

La invención también proporciona métodos para purificar los adipocitos para obtener una población altamente purificada.

El método de la invención para la diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimatosas humanas, preferiblemente obtenidas de médula ósea, a células adipoblásticas o adipocíticas, es útil para los investigadores que desean estudiar este programa de desarrollo en células humanas *in vitro*. También resultará un mejor entendimiento de las enfermedades del metabolismo energético, incluyendo obesidad y diabetes relacionada con la obesidad, por los estudios de la diferenciación de las células madre mesenquimatosas a adipocitos. Mientras que se ha sospechado durante mucho tiempo una base celular y bioquímica de la obesidad, los avances han sido lentos debido a una carencia de sistemas modelo con herramientas bioquímicas y moleculares para el estudio. Los adelantos espectaculares recientes en la base molecular de la adipogénesis han abierto nuevos caminos hacia la comprensión de esta vía de diferenciación de células mesenquimatosas, aunque se ha carecido de un sistema modelo humano tal como el que se describe en este documento. El método también tendrá utilidad en el aislamiento y preparación de adipocitos para el implante en un paciente con el propósito de aumentar el tejido después de una cirugía traumática o estética.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B muestran que, cuando se tratan MSC humanas de acuerdo con la invención, experimentan diferenciación al linaje adipogénico. La Figura 1A muestra hMSC (4x) cultivadas en medio hMSC normal durante el mismo periodo de tiempo que en la Figura 1B. No hay evidencia de vacuolas que contienen lípidos, y las células mantienen la apariencia de fibroblastos con densidad elevada. En la Figura 1B hay hMSC que se permiten confluir y que después se mantienen en un medio normal durante 10 días antes de añadir el medio de Inducción Adipogénico (que contiene metilisobutilxantina y dexametasona) durante 48 h, y después se cambian al medio de mantenimiento de adipocitos que contiene insulina durante 2 semanas adicionales. Las vacuolas lipídicas son evidentes por primera vez aproximadamente a los 5-7 días, pero con el tiempo aumentan en tamaño y abundancia.

La Figura 2A muestra un cultivo control similar al de la Figura 1A con un aumento mayor (20X). La Figura 2B muestra un cultivo de hMSC confluyente que se ha sometido a medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas y que después se ha mantenido en el medio de Mantenimiento Adipogénico durante 14 días. En una gran proporción de las células es evidente la gran cantidad de vacuolas que contienen lípidos de los adipocitos.

La Figura 3 muestra los resultados de cultivar hMSC en una diversidad de condiciones, de las cuales solamente una muestra un alto grado de diferenciación adipogénica. Todas las fotografías presentan un aumento de 10X. La Figura 3A muestra un cultivo de hMSC aislado mantenido en un medio de cultivo hMSC normal. Las células crecen con una morfología fibroblástica. La Figura 3B muestra un cultivo similar que se ha tratado con medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas, y después con medio de Mantenimiento Adipogénico durante 14 días adicionales con cambios de medio cada 3 días. Las células adipogénicas, tal vez hasta un 30-35% de las células, son evidentes ya que contienen las grandes vacuolas lipídicas refringentes. La Figura 3C muestra un cultivo de hMSC que se mantuvo en el medio de Mantenimiento Adipogénico durante 14 días, pero que nunca se sometió al tratamiento dexametasona/metil isobutilxantina. Las células mantienen una apariencia morfológica plana sin vacuolas evidentes. La Figura 3D muestra un cultivo de hMSC que se trató con un medio hMSC normal que contenía 1 μ M de dexametasona durante 48 horas, y que después se cultivó durante 14 días en el medio de Mantenimiento Adipogénico. Las células están desorganizadas, pero muestran muy pocas o ninguna vacuola lipídica. La Figura 3E muestra un cultivo de hMSC que se trató con medio hMSC normal que contenía 0,5 μ M de metilisobutilxantina durante 48 horas y después se mantuvo durante 14 días en el medio de Mantenimiento Adipogénico. Las células mantienen un fenotipo fibroblástico plano. La Figura 3F

ES 2 274 547 T3

muestra un cultivo de hMSC que se trató con un medio que induce las células a diferenciarse por una vía osteogénica. Este medio contiene dexametasona 0,1 μ M, fosfato de β -glicerol 10 mM y 2-fosfato de ácido ascórbico 50 μ M. Es evidente la presencia de material osteoide refringente, pero no grandes vacuolas lipídicas.

5 La Figura 4A muestra un cultivo de hMSC sometido al medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas y cultivado después durante 14 días en el medio de Mantenimiento Adipogénico. Las grandes vacuolas lipídicas son evidentes en esta imagen de campo brillante. Los lípidos también se pueden poner de manifiesto usando un colorante liposoluble fluorescente, tal como Rojo Nilo, y visualizándolo por iluminación epifluorescente como se muestra en la Figura 4B. Por tanto, las células adipogénicas también se pueden identificar usando colorantes vitales y tinciones
10 histológicas que marquen las vacuolas lipídicas.

La Figura 5A muestra hMSC en cultivo que no se han tratado con medio de Inducción Adipogénico, pero que se han cultivado, fijado y teñido al mismo tiempo que los cultivos adipogénicos mostrados en 5B y 5C.

15 La Figura 5B muestra hMSC que se trataron una vez durante 48 horas con medio de Inducción Adipogénico, y que después se cultivaron durante tres semanas adicionales en medio de Mantenimiento Adipogénico, y que después se fijaron en formalina tamponada neutra y se tiñeron con Rojo Aceite O, un colorante liposoluble que se acumula en las gotas de grasa.

20 La Figura 5C muestra una placa de hMSC que se volvió a tratar con medio de Inducción Adipogénico nuevo durante un segundo y un tercer periodo de 48 horas para inducir a más hMSC a transformarse en adipogénicas. Hasta un 30-40% de las células se habían convertido en adipocitos por los tres tratamientos de inducción cuando se observaron dos semanas después del tercer tratamiento. Los paneles 5A-5C se tiñeron todos con Rojo Aceite O.

25 En la Figura 5D, el factor de transcripción CAAT/proteína de unión potenciadora (o C/EBP α) se expresa a niveles elevados en las hMSC adipogénicas, como se ve en esta transferencia de western, usando un anticuerpo específico para la isoforma α de 34 kd de C/EBP.

30 En la Figura 5E, la proteína de unión de ácidos grasos aP2 muestra elevados niveles de expresión en las hMSC adipogénicas, como se muestra en esta transferencia de western, usando un anticuerpo específico para la forma de P2 específica de adipocitos de 14 kd.

35 La Figura 6A muestra las hMSC adipogénicas aisladas que se unen a la superficie superior. La población se compone de más del 99% de células adipogénicas, como se evidencia por las gotitas lipídicas en cada célula.

40 La Figura 6B muestra las hMSC no adipogénicas que se asientan sobre la superficie inferior del matraz. En la superficie inferior se presentan muy pocas células que contienen gotitas lipídicas. Estas células no adipogénicas podrían tratarse con tripsina/EDTA y volverse a sembrar en otra placa y demostrar que mantienen el potencial adipogénico (datos no mostrados), indicando que se mantienen como células madre mesenquimatosas, capaces de progresión de linaje.

45 La Figura 7 muestra un ejemplo de hMSC que han crecido en una matriz de gel de colágeno estabilizado y que después se han inducido a diferenciarse a adipocitos. Las células se han teñido con colorante Rojo Nilo fluorescente que se acumula en las vacuolas lipídicas, que se visualizan mediante iluminación ultravioleta. Solamente se visualizan los depósitos lipídicos en las células, y muchos de los adipocitos están fuera del plano del enfoque de la matriz tridimensional.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

50 Como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una población aislada, homogénea de células madre mesenquimatosas humanas que tienen el potencial de diferenciarse a células de más de un tipo de tejido mesenquimatoso, y una sustancia que induce las células de la población de células madre mesenquimatosas a diferenciarse al linaje adipogénico.

55 De acuerdo con la invención, las células madre mesenquimatosas se inducen a diferenciarse al linaje adipogénico mediante el uso de dexametasona y metil isobutilxantina, un compuesto que inhibe la degradación del AMPc, en particular un inhibidor de la fosfodiesterasa.

60 Los ejemplos preferidos de la sustancia que eleva los niveles intracelulares de AMPc o que son análogos del AMPc incluyen dibutilil-AMPc, 8-CPT-AMPc (8-(4)-clorofeniltio)-adenosina 3', 5' monofosfato cíclico, 8-bromo AMPc, dioctanoil-AMPc, Forskolin, etc.

65 La sustancia que inhibe la degradación del AMPc inhibiendo la actividad de la fosfodiesterasa es metil isobutilxantina.

El compuesto que eleva los niveles de AMPc y dexametasona se usa en cantidades que son eficaces para inducir a las hMSC a diferenciarse a adipocitos. El compuesto que regula el AMPc y la dexametasona se puede añadir a las hMSC de forma separada o mezclándolas entre sí.

ES 2 274 547 T3

En general, la dexametasona se usa en una concentración de aproximadamente 0,1 a 10 micromolar, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 2 micromolar.

5 La metil isobutilxantina, que inhibe la degradación del AMPc, se emplea generalmente en una concentración de aproximadamente 0,1 a 10 milimolar, y preferiblemente de aproximadamente 0,2 a 2 milimolar.

10 Cuando se emplea un compuesto que regula positivamente la producción de AMPc, tal compuesto se emplea generalmente en una concentración de aproximadamente 0,1 a 100 micromolar, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 10 micromolar.

Se debe entender que las cantidades anteriores son representativas y que el alcance de la invención no se limita por las mismas.

15 Aunque uno de los compuestos que se emplean para inducir a las hMSC a diferenciarse a adipocitos es uno que regula el AMPc (uno que se conoce que regula positivamente la producción de AMPc o uno que evita la degradación del AMPc), el alcance de la invención no se limita a ningún mecanismo de acción en particular. Por tanto, por ejemplo, incluso aunque uno de los compuestos que se pueden usar en la presente invención es un inhibidor de la fosfodiesterasa, que se conoce que inhibe la degradación del AMPc inhibiendo la degradación por fosfodiesterasa del AMPc, la invención no se limita a un mecanismo de acción que es dependiente de que se evite la degradación del AMPc.
20 Por tanto, por ejemplo, el inhibidor de la fosfodiesterasa puede ser eficaz para inducir la diferenciación de hMSC a adipocitos mediante un mecanismo de acción diferente que la inhibición de la degradación del AMPc.

Se pueden usar compuestos además de la (i) dexametasona y la (ii) metil isobutilxantina, un regulador de AMPc, para inducir a las hMSC a diferenciarse a adipocitos. Por tanto, de acuerdo con la invención, también se emplea
25 insulina junto con metil isobutilxantina y dexametasona.

En una realización preferida, se proporciona una composición para inducir a las hMSC a diferenciarse a adipocitos que comprende (i) dexametasona, (ii) un compuesto que regula el AMPc y metil isobutilxantina, un compuesto que
30 inhibe la degradación del AMPc tal como un inhibidor de la fosfodiesterasa, (iii) insulina o un factor de crecimiento parecido a la insulina y (iv) glucosa.

La adición de los compuestos que se ha descrito anteriormente en este documento para inducir la diferenciación de hMSC a adipocitos de acuerdo con la invención no requiere que todas las hMSC tratadas se induzcan a diferenciarse a
35 adipocitos. Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se produce una composición que comprende células madre mesenquimatosas humanas y adipocitos que se basa en los dos componentes. Los adipocitos se presentan en una cantidad de al menos 5% en peso y preferiblemente al menos 15% en peso. La cantidad de adipocitos puede llegar hasta 50% en peso o más, basándose en los dos componentes.

De acuerdo con una realización preferida, la composición que se genera está esencialmente libre de células elaboradas del linaje mesenquimatoso diferentes de los adipocitos. En una realización particularmente preferida, hay menos
40 de un uno por ciento de células elaboradas del linaje mesenquimatoso diferentes de los adipocitos, y más preferiblemente, menos del 0,1% y mucho más preferiblemente no hay células elaboradas del linaje mesenquimatoso diferentes de los adipocitos.

45 Aunque el tratamiento de hMSC de acuerdo con la invención produce una mezcla de adipocitos y hMSC indiferenciadas, los adipocitos producidos se pueden recuperar de la mezcla para producir una población aislada de adipocitos. Los procedimientos representativos para recuperar adipocitos se describen en los ejemplos que forman parte de esta solicitud.

50 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las hMSC se pueden tratar para inducir la diferenciación a adipocitos de manera que tal diferenciación se efectúa *in vitro* o *in vivo*.

Por tanto, por ejemplo, las hMSC se pueden mezclar como se ha descrito anteriormente en este documento con compuestos que inducen la diferenciación a hMSC, y la mezcla resultante se emplea *in vivo* para inducir la diferen-
55 ciación a adipocitos *in vivo*. Por tanto, por ejemplo, la mezcla sin cultivar *in vitro* durante un periodo de tiempo para inducir la diferenciación *in vitro* se puede emplear en una matriz adecuada (por ejemplo del tipo que se describirá en este documento a continuación) para inducir la diferenciación de las hMSC a adipocitos *in vivo*.

60 Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende células madre mesenquimatosas humanas, dexametasona, metil isobutilxantina e insulina. Tal composición se puede emplear para producir adipocitos *in vitro* o se puede emplear para inducir la diferenciación de hMSC *in vivo*.

La capacidad de generar grandes porcentajes de células adipogénicas de una población de hMSC permitirá tener grandes cantidades de células para implantes o para estudios de investigación. Se necesitarían menos hMSC como
65 material de inicio. Repitiendo más veces la etapa de inducción adipogénica, debe ser posible inducir a la mayoría de las hMSC a adipocitos. En el caso de que haya una mezcla de células, las hMSC adipogénicas se pueden aislar fácilmente por su densidad que les permite flotar. El aislamiento de una población altamente enriquecida de adipocitos a partir de hMSC cultivadas también permitirá una caracterización detallada del fenotipo del adipocito.

ES 2 274 547 T3

Los adipocitos se pueden usar con una diversidad de materiales para formar una composición para propósitos tales como la cirugía de reconstrucción. Las células se pueden combinar con una biomatriz para formar un material bidimensional o tridimensional según se necesite. Los cirujanos usan rutinariamente almohadillas de grasa y tejidos grasos de localizaciones lejanas para aumentar un área del que se ha retirado tejido. Esto implica a menudo un procedimiento separado con sus riesgos inherentes. Como alternativa, las hMSC se podrían aislar del paciente y hacer crecer en un cultivo. Después, las hMSC se podrían mezclar con un material biocompatible tal como colágeno, esponja de colágeno, alginato, material de ácido poliláctico, etc., para formar un compuesto. Después, el compuesto se trataría para inducir la diferenciación adipogénica de las MSC *in vitro* durante 1-3 semanas, después se implantaría como se necesita. Por ejemplo, las MSC adipogénicas se podrían mezclar con un colágeno solubilizado u otro biomaterial que después se permite gelificar para formar un compuesto tridimensional que se podría usar para el aumento de pecho después de una mastectomía. Tal compuesto se podría formar o esculpir con el tamaño y forma adecuados. Otro compuesto incluye el cultivo de hMSC en la matriz acelular de piel que está actualmente en el mercado tal como el producto de LifeCell Corporation. En este formato, las células se cultivarían para poblar la matriz y entonces se produciría la diferenciación como se ha descrito. Después se podría cortar la matriz con las células adipogénicas por el cirujano para fijar el tamaño de la reconstrucción. Como alternativa, las hMSC se podrían inducir para convertirse en adipocitos antes de su introducción en los materiales biocompatibles. Como otra alternativa, las hMSC, en combinación con compuestos que promocionan la diferenciación a adipocitos, se podrían usar con una biomatriz como la descrita durante un periodo de tiempo para inducir la diferenciación, por lo cual la diferenciación se induce *in vivo* en su totalidad o en parte.

De forma similar a su uso en cirugía reconstructiva, las hMSC adipogénicas serán de elección en cirugía estética opcional de una forma muy parecida; para aumentar el tejido subyacente debajo de la piel con un compuesto de células autólogas y material biocompatible.

La invención además se describirá con referencia a los siguientes ejemplos, sin embargo, el alcance de la invención no se limita por los mismos. A menos que se especifique de otra forma, los porcentajes y las partes descritas son en peso.

Marcadores Bioquímicos de Adipocitos

En la bibliografía se han descrito varias moléculas que son marcadores específicos de adipocitos que serán útiles para caracterizar los adipocitos obtenidos de hMSC. Estos incluyen enzimas implicadas en la interconversión de ácidos grasos a triglicéridos tal como la esteroil-CoA-desaturasa (SCDI) o el transportador de glucosa sensible a insulina (GLUT4). El producto del gen *ob*, leptina, es un polipéptido de peso molecular 16.000 que solamente se expresa en células preadiposas o en tejido adiposo. Se ha demostrado que la expresión de la proteína de unión potenciadora de CCAAT, C/EBP precede a la expresión de varios marcadores de diferenciación adipogénica, y se piensa que desempeña un papel clave en el desarrollo de adipocitos. Otro marcador es P2 adiposa 422 (422/aP2), una proteína cuya expresión se potencia durante la diferenciación de adipocitos (Cheneval, *et al.*, 1991). Esta vía de diferenciación se piensa que también implica al receptor γ 2 activado por proliferación de peroxisomas (PPAR γ 2), que está implicado en la iniciación de la transcripción de los genes de adipocitos (Tontonoz, *et al.*, 1994). Los estudios que usan estos marcadores y los métodos descritos permitirán un análisis más detallado de la progresión del linaje de las células madre mesenquimatosas a la diferenciación a adipocitos.

Colorantes liposolubles como marcadores de diferenciación de adipocitos

Se dispone de colorantes liposolubles para teñir vacuolas lipídicas en adipocitos. Estos incluyen Rojo Nilo, Azul Nilo, Negro Sudán y Rojo Aceite O, entre otros. Cada uno de estos colorantes hidrófobos tiene una propensión a acumularse en las vacuolas que contienen lípidos de los adipocitos en desarrollo, y pueden identificar fácilmente las células adipogénicas en poblaciones de MSC que se están diferenciando. Al menos uno de estos colorantes se pueden usar para aislar adipocitos de células no diferenciadas usando un separador celular activado por fluorescencia (FACS). En la Figura 4 se muestra un ejemplo del uso del Rojo Nilo para identificar hMSC adipogénicas

Ejemplo 1

Generación de Adipocitos de MSC Humanas

Las MSC humanas se aíslan de la médula ósea roja de donantes voluntarios, como se describe en el documento US 5.486.359.

Las células se hacen crecer hasta que las colonias estén bien establecidas, y en este punto las células se subcultivan (1 a 3) o se pueden recoger para un ensayo de adipogénesis *in vitro*. Para el ensayo de adipogénesis, las hMSC se subcultivan en placas para cultivo tisular de 35 mm con 100.000 células por placa y se alimentan con 2 mililitros de Medio hMSC normal (Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Suero Fetal Bovino (FBS) seleccionado al 10% y una mezcla de antibióticos/antimicóticos (1X) (Life Technologies, Inc.)) y las células se mantienen a 37°C, CO₂ al 5% y 90% de humedad. Las células se vuelven a alimentar con el medio nuevo cada tercer día y se permite que se multipliquen y que confluyan. Las células se mantienen después de alcanzar la confluencia alimentándolas de nuevo cada tercer día, y este periodo de tiempo de cultivo después de la confluencia mejora la respuesta adipogénica en la siguiente etapa 8 (al menos hasta 14 días). La diferenciación a adipocitos se inicia cambiando el medio a 2 ml de Medio de Inducción Adipogénico (DMEM con suero fetal bovino al 10% que contiene 10 μ g/ml de insulina

(recombinante humana, Boehringer Mannheim Corp.), metil isobutilxantina 0,5 mM (MIX) (Sigma Chemical Co.)). Este medio se deja sobre las células durante 48 horas con las células mantenidas a 37°C, CO₂ al 5% y 90% de humedad, y después se sustituye por Medio de Mantenimiento Adipogénico (DMEM que contiene FBS al 10% y 10 µg/ml de insulina). El medio se cambia cada 3-4 días. Las hMSC comienzan a mostrar pequeñas vacuolas lipídicas a los 3-7 días, y éstas aumentan y se hacen más numerosas con el tiempo, hasta al menos 30 días. Hay varias variaciones que se han ensayado exitosamente.

Cuando se tratan hMSC como se ha descrito anteriormente, éstas experimentan diferenciación hacia el linaje adipogénico, como se muestra en la Figura 1. La Figura 1A muestra hMSC (4X) cultivadas en medio hMSC normal durante el mismo periodo de tiempo que en la Figura 1B. No hay evidencia de vacuolas que contienen lípidos, y las células mantienen la apariencia de fibroblastos con densidad elevada. En la Figura 1B hay hMSC que se han permitido confluir, y que después se han mantenido durante 10 días antes de añadir el Medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas, y después se han cambiado al Medio de Mantenimiento Adipogénico durante 2 semanas adicionales. Las vacuolas lipídicas son evidentes por primera vez aproximadamente a los 3-7 días, pero aumentan en tamaño y abundancia con el tiempo. La Figura 2A muestra un cultivo control similar al de la Figura 1A con un aumento mayor (20X). La Figura 2B muestra un cultivo de hMSC confluyente que se ha sometido a Medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas y después se ha mantenido en Medio de Mantenimiento Adipogénico durante 14 días. La gran cantidad de vacuolas que contienen lípidos de los adipocitos son evidentes en una gran proporción de las células.

La Figura 3 muestra los resultados de cultivar hMSC en una diversidad de condiciones, de las cuales solamente una muestra un alto grado de diferenciación adipogénica. Todas las fotografías tienen un aumento de 10X. La Figura 3A muestra un cultivo de hMSC mantenido en medio de cultivo hMSC normal sin aditivos. Las células crecen con una morfología fibroblástica. La Figura 3B muestra un cultivo similar que se trató con Medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas y después con Medio de Mantenimiento Adipogénico durante 14 días adicionales con cambios de medio cada 3 días. Las células adipogénicas, tal vez hasta el 30-35% de las células, son evidentes ya que contienen las grandes vacuolas lipídicas refringentes. La Figura 3C muestra un cultivo de hMSC que se mantuvo en el Medio de Mantenimiento Adipogénico durante 14 días, pero que nunca se sometió al tratamiento de dexametasona/metil isobutilxantina. Las células mantienen una apariencia de morfología plana sin vacuolas evidentes. La Figura 3D muestra un cultivo de hMSC que se trató con medio hMSC normal que contenía 1µM de dexametasona durante 48 horas y después se cultivó durante 14 días en el Medio de Mantenimiento Adipogénico. Las células están desorganizadas, pero muestran unas pocas, o ninguna, vacuola lipídica. La Figura 3E muestra un cultivo de hMSC que se trató con hMSC normal que contenía 0,5 ml de metil isobutilxantina durante el periodo de inducción y después se mantuvo durante 14 días en el Medio de Mantenimiento Adipogénico. Las células mantienen un fenotipo fibroblástico plano. La Figura 3F muestra un cultivo de hMSC que se trató con un medio que induce las células por una vía osteogénica. Este medio contiene dexametasona 0,1 µM, fosfato de β-glicerol 10 mM y 2-fosfato de ácido ascórbico 50 µM. Es evidente la presencia de material osteoide refringente, pero no grandes vacuolas lipídicas.

Las células adipogénicas también se pueden identificar usando colorantes vitales y tinciones histológicas que marquen las vacuolas lipídicas. La Figura 4A muestra un cultivo de hMSC sometido al tratamiento adipogénico y cultivado durante 14 días en el Medio de Mantenimiento Adipogénico. En esta imagen de campo brillante son evidentes las grandes vacuolas lipídicas. Pero los lípidos también se pueden poner de manifiesto usando un colorante liposoluble fluorescente tal como Rojo Nilo (Greenspan, *et al.* 1985) y se pueden observar por iluminación epifluorescente como se muestra en la Figura 4B.

Los resultados mostrados se han reproducido varias veces con hMSC obtenidas de diferentes donantes, y se describe información adicional sobre el método en este documento. Se han obtenido resultados similares con hMSC de todos los individuos ensayados (4 o más donantes). El porcentaje de células que se han convertido en adipocitos que contienen lípidos varía dependiendo de los aspectos concretos del cultivo. Específicamente, aquellas células que se permitió que confluyeran completamente y que se mantuvieron de este modo hasta 2 semanas antes de la inducción adipocítica, mostraron un porcentaje mucho mayor de adipocitos a lo largo del tiempo que los cultivos que se indujeron antes de la confluencia o durante la confluencia. Hasta el 30-35% de las hMSC parecen adipogénicas 2 semanas después de la inducción cuando se tratan como se describe en este documento, como se muestra en la Figura 1B. Las hMSC se pueden cultivar en diversos tamaños de recipientes para cultivos con éxito similar, de forma que obtener grandes cantidades de células no presenta ningún problema.

Ejemplo 2

Mejora de la Diferenciación Adipogénica

Estos experimentos se realizaron para determinar si una población de células madre mesenquimatosas humanas que crecen en un cultivo se puede tratar para inducir diferenciación adipogénica (que induce un porcentaje del 5-10% de las células a convertirse en adipocitos), y después volver a tratarla posteriormente para inducir más de las hMSC a diferenciarse. También se realizaron experimentos para examinar si es posible purificar una población de células adipogénicas inducidas del cultivo mezclado de hMSC y MSC adipogénicas que resulta del tratamiento con agentes adipogénicos. Ambos conjuntos de experimentos fueron exitosos como se describe a continuación y en las figuras adjuntas.

ES 2 274 547 T3

Las hMSC se indujeron al fenotipo adipogénico cultivándolas en el Medio de Inducción Adipogénico durante 48 horas como se ha descrito. Después se cambió el medio al Medio de Mantenimiento Adipogénico y las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 3 a 6 días hasta que había gotitas lipídicas perceptibles dentro de las células. Aproximadamente el 5-10% de las células se transformaron en adipogénicas, como se ve en la Figura 5. La Figura 5A muestra hMSC en cultivo que no se trataron con ningún medio adipogénico, pero que se cultivaron, fijaron y tiñeron al mismo tiempo que los cultivos adipogénicos mostrados en 5B y 5C. La Figura 5B se trató una vez con Medio de Inducción Adipogénico, y después se cultivó en Medio de Mantenimiento Adipogénico durante tres semanas adicionales y después se fijó en formalina tamponada neutra y se tiñó con Aceite Rojo O, un colorante liposoluble que se acumula en las gotitas de grasa. También se volvió a tratar una placa de hMSC con Medio de Inducción Adipogénico nuevo durante un segundo y un tercer periodo de 48 horas para inducir a más hMSC a convertirse en adipogénicas, como se muestra en la Figura 5C. Hasta el 30-40% de las células se habían convertido en adipocitos por los tres tratamientos de inducción cuando se observaron dos semanas después del tercer tratamiento. Los paneles 5A-5C se tiñeron todos con Rojo Aceite O.

15 *Expresión de las proteínas adipogénicas en la diferenciación de hMSC*

Las hMSC expresan proteínas específicas de adipocitos después de la diferenciación. En las Figuras 5D y 5E, 10 g del total del lisado proteico se puso de manifiesto por SDS-PAGE, se transfirió a nitrocelulosa y se sondó con anticuerpos para C/EPB α o aP2. En la Figura 5D, el factor de transcripción CAAT/proteína de unión potenciadora (o C/EPB α) se expresa a altos niveles en las hMSC adipogénicas, como se muestra en esta transferencia de western, usando un anticuerpo específico para la isoforma α de 34 kd de C/EBP. En la Figura 5A, la proteína de unión de ácidos grasos aP2 muestra elevados niveles de expresión en las hMSC adipogénicas, como se muestra en esta transferencia western, usando un anticuerpo específico para la forma de P2 específica de adipocitos de 14 kd.

25 *Expresión de genes adipogénicos en la diferenciación de hMSC*

La expresión de los factores de transcripción que se conoce que están implicados en la diferenciación adipogénica también indica que las hMSC se han transformado en adipocitos. Una clase de compuestos conocidos como proliferadores de peroxisomas, que incluyen algunos agentes hipolipidémicos usado clínicamente, pueden activar receptores nucleares asociados con diferenciación adipogénica. El receptor γ 2 activado por el proliferador de peroxisomas (o PPAR γ 2), en particular, se ha demostrado que se asocia con adipogénesis. El análisis de transferencia de ARN (transferencia Northern) se usó para identificar la elevada expresión de ARN de PPAR γ 2 en hMSC que experimentaban diferenciación adipogénica. El ARN total se aisló de las hMSC control y de las hMSC adipogénicas, poniéndose de manifiesto por electroforesis en gel desnaturalizante y se transfirió a nitrocelulosa y se sondó para la expresión de de PPAR γ 2 del cultivo de hMSC (carril 1, 10 μ g) o de hMSC adipogénicas (carril 2, 10 μ g; carril 3, 20 μ g). Como se muestra en la Figura 5F, el ARNm de PPAR γ 2 se detecta a 1,7 kb como se indica por la flecha, y su expresión se eleva aproximadamente 5 veces en el ARN de las hMSC adipogénicas.

La elevada expresión de ARN para la lipoproteína lipasa, una enzima responsable de la hidrólisis del núcleo de los triglicéridos a monoacilglicerol y ácidos grasos libres, indica la diferenciación adipogénica de hMSC, como se muestra en la Figura 5G. Como en 5F, se pusieron de manifiesto 10 μ g del ARN total de las hMSC control (carril 1) o de las hMSC adipogénicas (carril 2) o 20 μ g del ARN de hMSC adipogénicas mediante electroforesis en gel desnaturalizante, se transfirió a nitrocelulosa y se sondó para la expresión de ARN LPL. El ARNm de LPL se observó como dos bandas de 3,3 y 3,7 kb en los carriles 2 y 3 (las bandas en 3 están ligeramente desplazadas debido a la elevada carga).

Ejemplo 3

Aislamiento de Adipocitos de hMSC

La generación de adipocitos de células madre mesenquimatosas humanas en las condiciones que se han descrito anteriormente produce grandes cantidades de adipocitos, tal vez hasta el 30-40% de las células presentes. Para los usos que requieren una población pura, los adipocitos se pueden aislar de las hMSC no adipogénicas mediante varios métodos, como se enumeran a continuación.

El Método uno para aislar hMSC adipogénico usa la centrifugación en gradiente de densidad y saca partido de la mayor capacidad de flotación de las células adipogénicas que contienen lípidos. En este método, los cultivos que contienen hMSC y adipocitos obtenidos de hMSC se tratan con tripsina al 0,05%/EDTA 0,53 mM para retirar las células de la placa de cultivo, y las células se lavan añadiendo 10 ml de medio hMSC normal y se centrifugan durante 10 minutos a 1000 rpm en la centrífuga GS-6R (Beckman Instruments, Inc.) a 20°C. Las células sedimentadas que contienen adipocitos y hMSC se resuspenden en 2 ml del Medio de Mantenimiento Adipogénico y se colocan cuidadosamente sobre 8 ml de Percoll con una densidad de 1,045 g/ml. Los tubos se centrifugan a 2.200 rpm (1100 xg) en una centrífuga Beckman GS-6R durante 20 minutos a 37°C. Los adipocitos se recuperan de los 2 ml superiores y en la interfaz con el Percoll de densidad 1,045. (Las MSC no adipogénicas entran en el Percoll de densidad 1,045 y se pueden recuperar del fondo del tubo). Los adipocitos recuperados se lavan por adición de 10 ml del Medio de Mantenimiento Adipogénico y se centrifugan a 1000 rpm durante 10 min a 20°C en la centrífuga GS-6R. Los adipocitos se vuelven a sembrar en placas con una densidad de 150.000 células por placa de 35 mm en Medio de Mantenimiento Adipogénico y se devuelven al incubador.

El Método dos para aislar hMSC adipogénicas usa la separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las hMSC que se diferencian a adipocitos en un cultivo se pueden aislar usando un colorante fluorescente liposoluble, tal como Rojo Nilo (10-100 $\mu\text{g/ml}$) para teñir los adipocitos que contienen vacuolas lipídicas. Después, el cultivo se trata con tripsina/EDTA como anteriormente para liberar las células del recipiente de cultivo y para someter la población mezclada a la separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los parámetros de la máquina se ajustan para seleccionar y recuperar células adipogénicas de la población, y éstas se pueden usar directamente o se pueden volver a sembrar en placas y cultivarse en el incubador.

Como se describe a continuación, el Método tres para aislar las células adipogénicas de una población mezclada es tratar las células con tripsina/EDTA y lavarlas como anteriormente. Después, las células se colocan en un matraz de cultivo tisular y el matraz se llena con medio. El matraz se cierra firmemente y se voltea de forma que la superficie tratada para la adhesión celular queda en la parte superior. Los adipocitos con capacidad de flotación, que contienen gotitas de lípidos, ascienden a la superficie y se unen a la superficie del matraz. Al día siguiente se retira el medio y el matraz se enjuaga con medio nuevo y el matraz se gira para tener el lado correcto hacia arriba. El matraz, ahora solamente con suficiente medio para cubrir la capa de células, se devuelve al incubador para su posterior mantenimiento.

Las hMSC adipogénicas acumulan gotitas lipídicas que disminuyen la densidad de capacidad de flotación de las células. Después, las hMSC adipogénicas se aíslan como se explica a continuación. La placa de células que contiene adipocitos y hMSC no adipogénicas de un cultivo que se ha tratado durante solamente un periodo de 48 h de inducción y que después han crecido durante tres semanas, se trató con tripsina al 0,05% y EDTA 5 mM durante 3-5 minutos para liberar las células de la placa. Después, las células se lavaron de la placa con 10 ml de medio nuevo y se colocaron en un matraz de 25 cm^2 , y el matraz se llenó hasta el borde con medio nuevo. El matraz se volteó de forma que la superficie de cultivo habitual estaba en la parte superior, y el matraz se colocó en el incubador de 37°C durante una noche. Las células adipogénicas con mayor capacidad de flotación ascendieron a la parte superior y se unieron a la superficie, mientras que las hMSC no adipogénicas se asentaron sobre la superficie del fondo y se unieron a ella. Durante los días siguientes se tomaron fotografías de las células en cada superficie como se muestra en la Figura 6. La Figura 6A muestra las hMSC adipogénicas que se han unido a la superficie superior. La población se compone de más del 99% de células adipogénicas, como se evidencia por las gotitas lipídicas en cada célula. La Figura 6B muestra las hMSC no adipogénicas que se asientan sobre la superficie inferior del matraz. Había muy pocas células que contenían gotitas lipídicas en la superficie inferior. Estas células no adipogénicas se podrían tratar con tripsina/EDTA y se volver a sembrar en otra placa y demostrar que mantienen el potencial adipogénico (datos no mostrados), indicando que éstas se mantienen como células madre mesenquimatosas, capaces de progresión de linaje.

Ejemplo 4

MSC Adipogénicas en Cirugía Reconstructiva

Los adipocitos se pueden usar con una diversidad de materiales para formar una composición para propósitos específicos tal como la cirugía reconstructiva. Las MSC se pueden combinar con una biomatriz para formar un material bidimensional o tridimensional según se necesite. Los cirujanos usan rutinariamente almohadillas grasas y tejidos grasos de localizaciones alejadas para aumentar un área del que se ha retirado tejido. Esto a menudo implica un procedimiento separado con sus riesgos inherentes. Como una alternativa, las hMSC se aíslan del paciente y se hacen crecer en un cultivo. Después, las hMSC se mezclan con material biocompatible tal como colágeno, esponja de colágeno, alginato, material de ácido poliláctico, etc., para formar un compuesto. Después, el compuesto se trata para inducir la diferenciación adipogénica de las MSC *in vitro* durante 1-3 semanas, entonces se implanta según se necesite. Por ejemplo, las MSC adipogénicas se mezclan con colágeno solubilizado o con otro biomaterial que después se permite gelificar para formar un compuesto tridimensional que se podría usar para el aumento de pecho después de una mastectomía. Tal compuesto se podría formar o esculpir con el tamaño y la forma adecuados. La Figura 7 muestra un ejemplo de hMSC que han crecido en una matriz de gel de colágeno estabilizado y que después se ha inducido a diferenciarse a adipocitos. Las células se han teñido con colorante fluorescente Rojo Nilo que se acumula en las vacuolas lipídicas, que se visualizan mediante iluminación ultravioleta. Solamente se ven los depósitos lipídicos, y muchos de los adipocitos están fuera del plano del enfoque de la matriz tridimensional.

Otra composición incluye el cultivo de hMSC en matrices de piel acelulares que está actualmente en el mercado. En este formato, las células se cultivan para poblar la matriz, y después se produce la diferenciación como se ha descrito. La matriz con las células adipogénicas se corta por el cirujano para fijar el tamaño de la reconstrucción. Como alternativa, las hMSC se pueden inducir para convertirse en adipocitos antes de su introducción en los materiales biocompatibles. De forma similar a su uso en cirugía reconstructiva, las hMSC adipogénicas serán de elección en cirugía estética opcional de una forma muy parecida; para aumentar el tejido subyacente debajo del piel con un compuesto de células autólogas y material biocompatible.

Ejemplo 5

Uso de hMSC Adipogénicas Como Una Fuente De Leptina Como Un Implante Para Infertilidad

El papel de la leptina en la obesidad también plantea cuestiones sobre su papel en las mujeres que tienen un bajo contenido de grasa corporal y un ciclo menstrual irregular, y que a menudo no pueden quedarse embarazadas. Recientes investigaciones sugieren que la leptina puede servir como un regulador metabólico para señalar cuándo

el cuerpo tiene suficientes reservas de grasa para soportar la concepción y el desarrollo del feto (Chehab *et al.* 1996). Hasta el grado de que las hMSC adipogénicas son una buena fuente de leptina, éstas se pueden usar como un implante para la liberación de leptina al cuerpo de tales mujeres. Tal implante puede tomar la forma de hMSC adipogénicas encapsuladas o de una matriz que contiene hMSC adipogénicas que se puede implantar donde los productos secretados tendrán acceso al sistema circulatorio.

Bibliografía citada

10 **MacDougald, O.A., C-S. Hwang, H. Fan, y M.D. Lane.** 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *PNAS* 92:9034-9037.

Hwang, C-S., S. Mandrup, O.A. MacDougald, D.E. Geiman y M.O. Lane. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein α . *PNAS* 93:873-877.

15 **Cornelius, P., O.A. MacDougald y M.D. Lane.** 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutrition* 14:99-129.

Yeh, W-C., Z. Cao, M. Classon y S.L. McKnight. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes and Development* 9:168-181.

20 **Freytag, S.O., y T.J. Geddes.** 1992. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP α . *Science* 256:379-382.

25 **Bortell, R., T.A. Owen, R. Ignatz, G.S. Stein y J.L. Stein.** 1994. TGFO, prevents the down-regulation of type I procollagen, fibronectin, and TGFO, gene expression associated with 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *J. Cellular Biochem.* 54:256-263.

Sadowski, H.B., T. T. Wheeler y D.A. Young. 1992. Gene expression during 3T3-L 1 adipocyte differentiation. *J. Biological Chem.* 266:4722-4731.

30 **Flier, S. J.** 1995. The adipocyte: storage depot or node o the energy information superhighway. *Cell* 80:15-18.

Greenspan, P., E.P. Mayer y S.D. Fowler. 1985. Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biology.* 100:965-973.

35 **Smith, M.J. y W. Wharton.** 1992. Differentiation of A31T6 proadipocytes to adipocytes: A flow cytometric analysis. *Exper. Cell Research* 199:29-38.

40 **Gimble, J.M., K. Youkhana, X. Hua, H. Bass, K. Medina.** 1992. Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stroma cell line. *J. Cell. Biochem.* 50:73-82.

Pietrangell, C.E., S-1. Hayashi y P.W. Kincade. 1988. Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors, *Europ. J. Immunology.* 18:863-872.

45 **Chehab, F.F., M. E. Lim y R. Lu.** 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 12 318-320.

Beresford, J.N., J.H. Bennett, C. Devlin, P.S. Leboy y M. E. Owen. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Science* 102:341-351.

50 **Bortell, R. T.A. Owen, R. Ignatz, G.S. Stein y J.L. Stein.** 1994. TGF β_1 prevents the down regulation of type I procollagen, fibrinectin, and TGF β_1 gene expression associated with 3T3-L 1 pre-adipocyte differentiation. *J. Cellular Biochem.* 54:256-263.

55 **Gimble, J.M., C. Morgan, K. Kelly, X. Wu, V. Dandapani, C.-S. Wang y V. Rosen.** 1995. Bone Morphogenetic Proteins inhibit adipogenic differentiation by bone marrow stromal cells. *J. Cellular Biochemistry* 58:393-402.

60 **Grigoriadis, A.E., J.N.M. Heersche y J.E. Aubin.** 1988. Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biology* 106:2139-2151.

Ibid., 1990. Continuously growing bipotential and monopotent myogenic adipogenic and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line. *Developmental Biology* 142:313-318.

65 **Umezawa, A., K.Tachibana, K. Harigaya, S. Kusakarl, S. Kato, Y. Watanabe y T. Takano.** 1991. Colony stimulating factor I expression is down-regulated during the adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells and induced by cachetin/tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* 11:920-927.

ES 2 274 547 T3

Yamaguchi, A. y **A.J. Kahn.** 1991. Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcified Tissue International* 49:221-225.

5 **Cheneval, D.R. J. Christy, D. Geiman, P. Cornelius,** y **M.D. Lane.** 1991. Cell-free transcription directed by the 422 adipose P2 gene promoter: activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. National Academy of Sciences USA* 88:8465-69.

10 **Ingalls, A.M., M.M. Dickie** y **G.D. Snell.** 1950, Obese, a new mutation in the house mouse, *J. Heredity.* 41:371-318.

Tontonoz, P.E., Hu, y **B.M. Spiegelman.** 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by mPPAR γ 2, a lipid activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156.

15 **Konieczny, S.F.** y **C.P. Emerson.** 1984. 5- azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 1OT1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling differentiation. *Cell* 38:791-800.

Spiegelman, B.M. y **H. Green.** 1980. Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 255:8811-8818.

20 **Zhang, Y. et al.** 1994. *Nature* 372:425-432.

MacDougald, O.A. y **M.O. Lane** 1995. Transcriptional Regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64:345-373.

25 **Chehab, F.F., M. E. Lim** y **R. Lu.** 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 12:318-320.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que comprende células madre mesenquimatosas que se han aislado de un ser humano y que tienen potencial para diferenciarse a células de más de un tipo de tejido conectivo y una sustancia en una cantidad eficaz para inducir que dichas células madre se diferencien al linaje adipogénico,

10 en la que la sustancia que induce que las células de la población de células madre mesenquimatosas se diferencien al linaje adipogénico comprende dexametasona, metil isobutilxantina e insulina.

10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para producir adipocitos, que comprende además células madre mesenquimatosas humanas aisladas en una matriz biocompatible que soporta la diferenciación y maduración de células madre mesenquimatosas humanas a adipocitos.

15 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la matriz está compuesta de colágeno.

4. Un proceso para inducir que células madre mesenquimatosas humanas se diferencien a adipocitos, que comprende:

20 poner en contacto células madre mesenquimatosas humanas con una sustancia que comprende dexametasona, metil isobutilxantina e insulina.

5. El proceso de la reivindicación 4 que además comprende aislar los adipocitos de las hMSC restantes.

25 6. El proceso de la reivindicación 4 en el que la dexametasona y la metil isobutilxantina están mezcladas entre sí.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

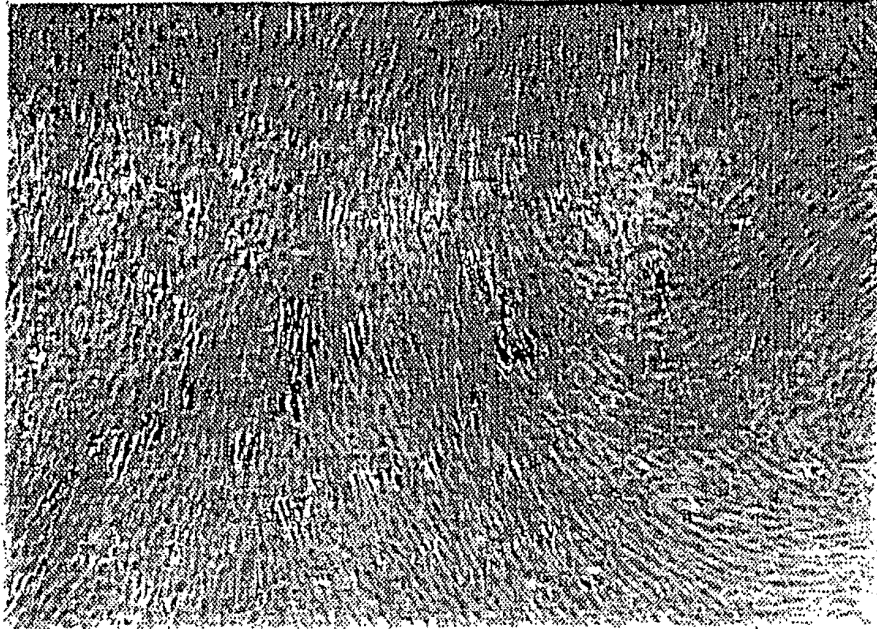


FIG. 1B

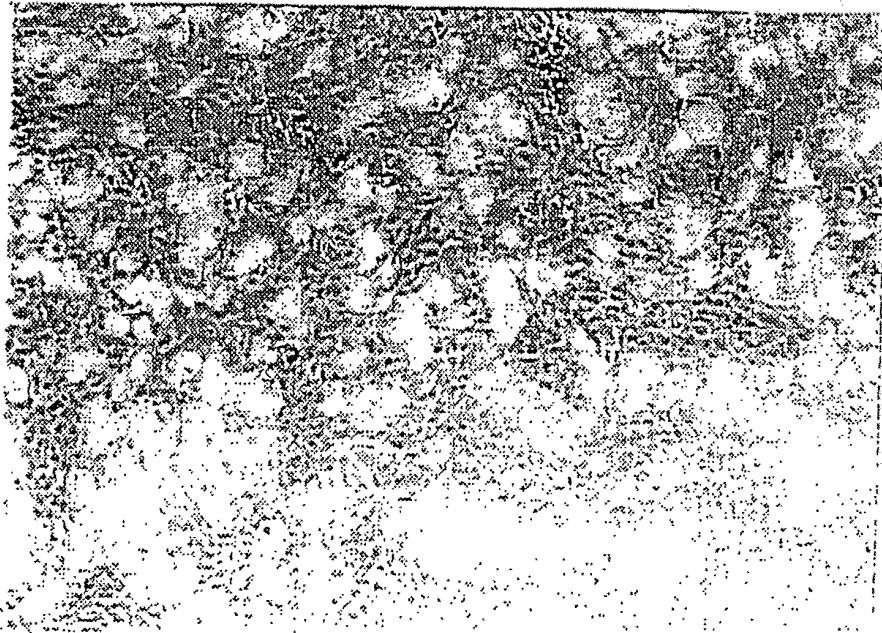


FIG. 2A

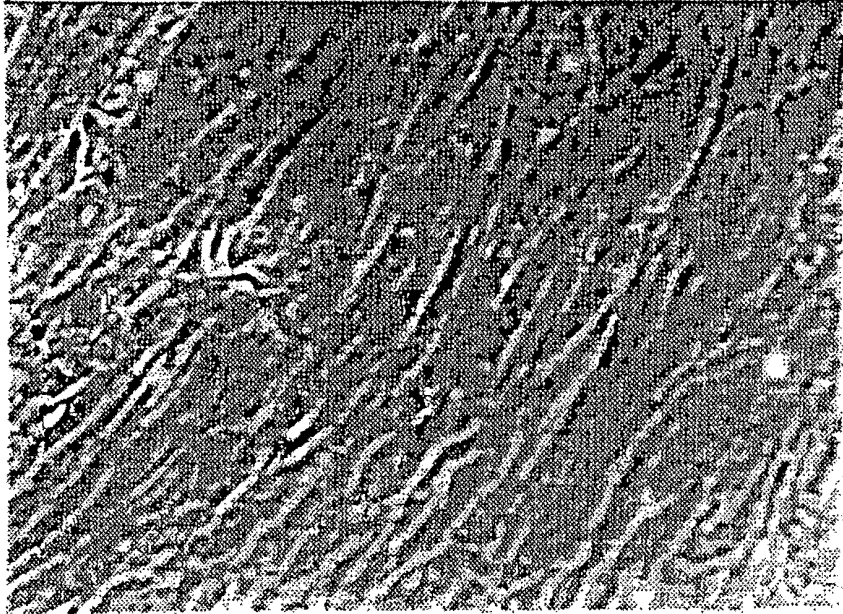


FIG. 2B



FIG. 3A

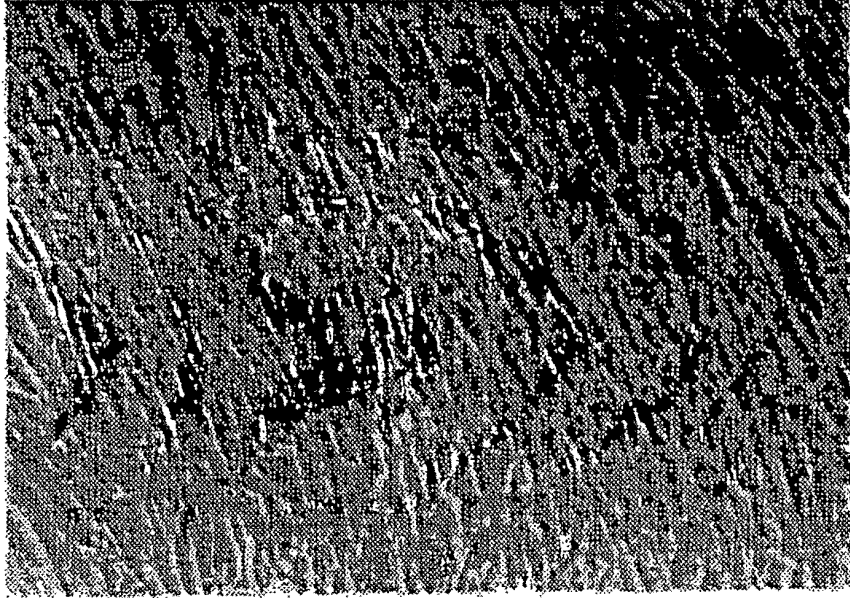


FIG. 3B



ES 2 274 547 T3

FIG. 3C

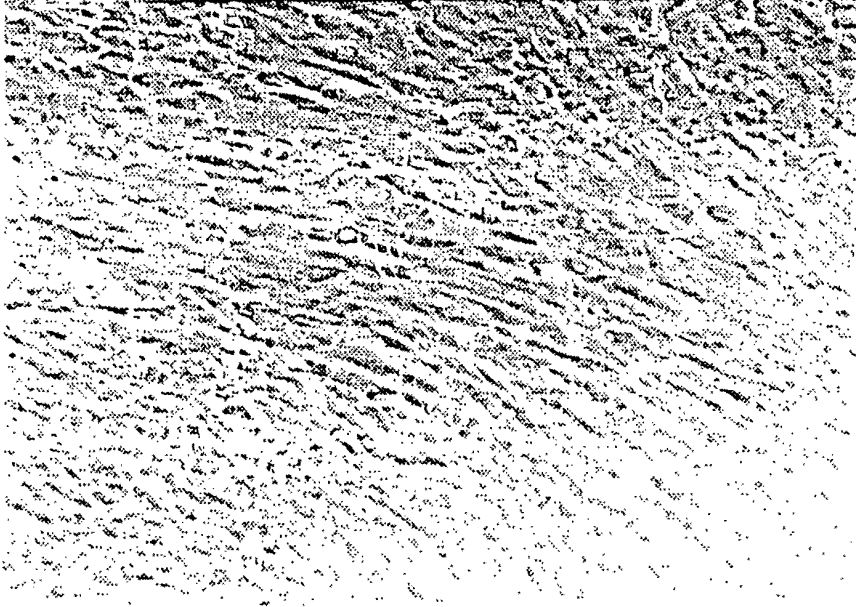


FIG. 3D

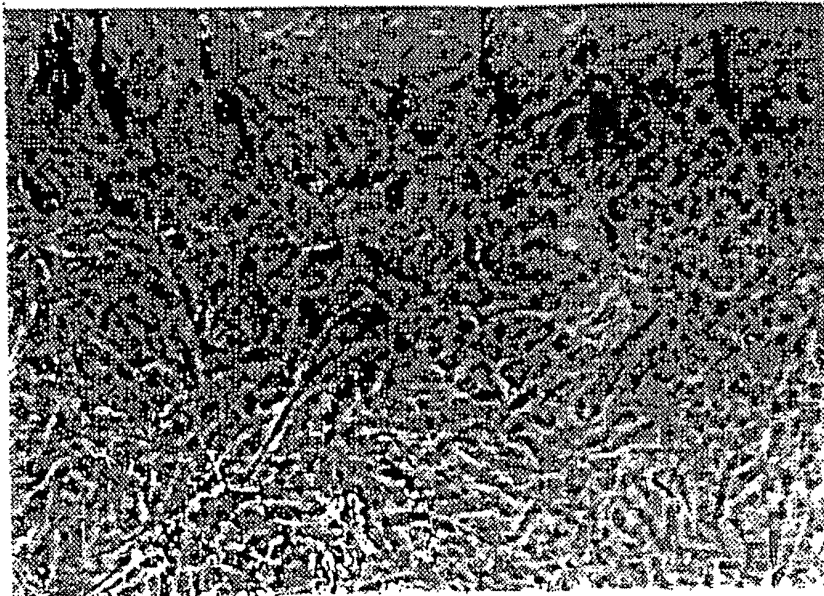


FIG. 3E

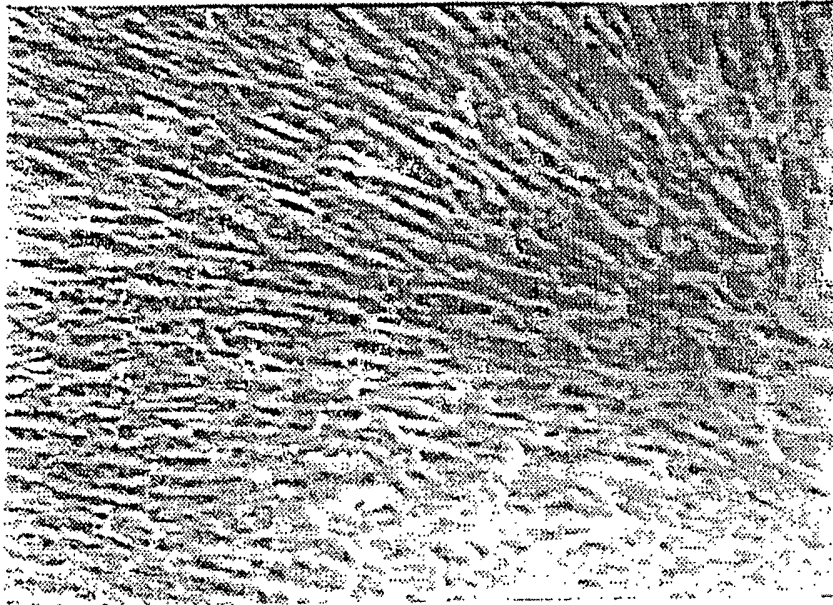


FIG. 3F

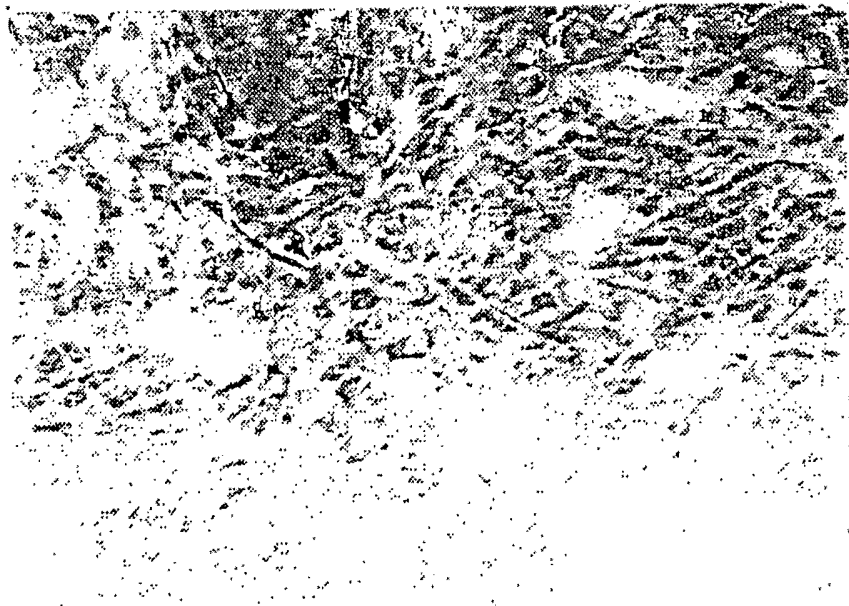


FIG. 4A

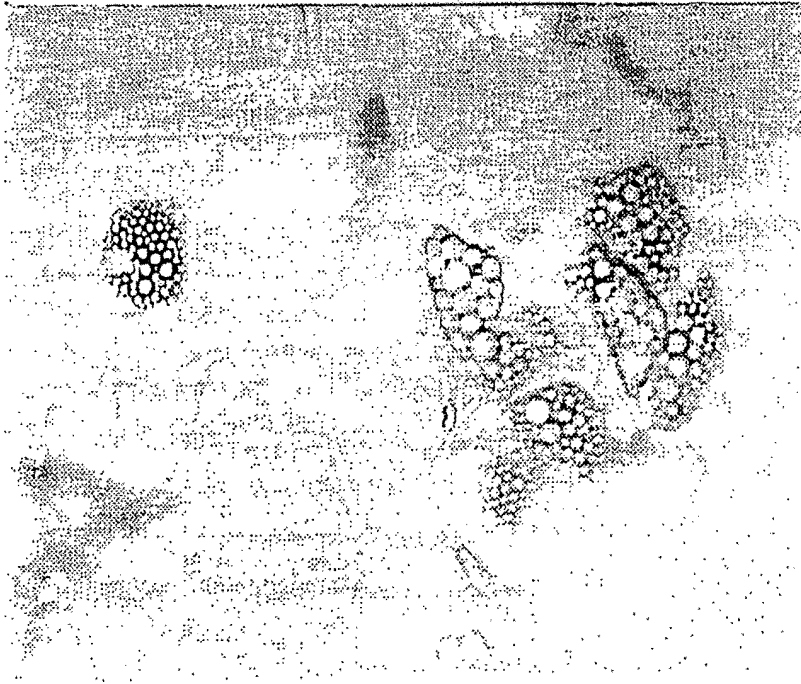


FIG. 4B



FIG. 5A

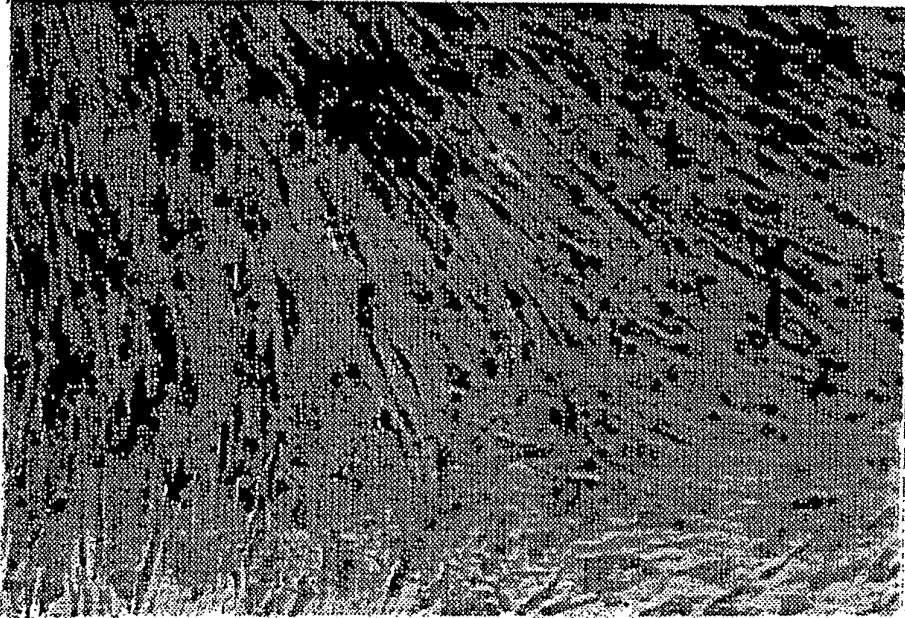


FIG. 5B

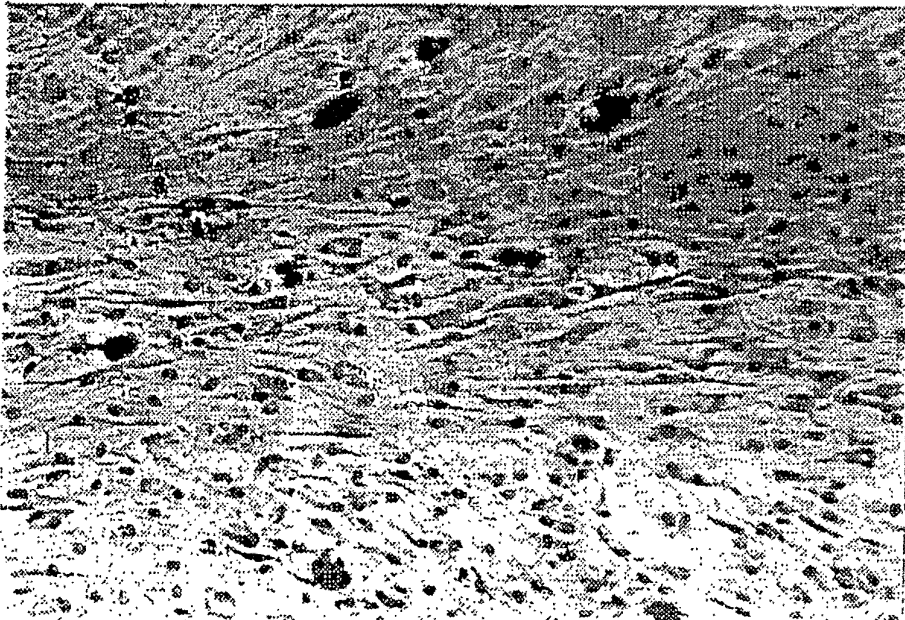
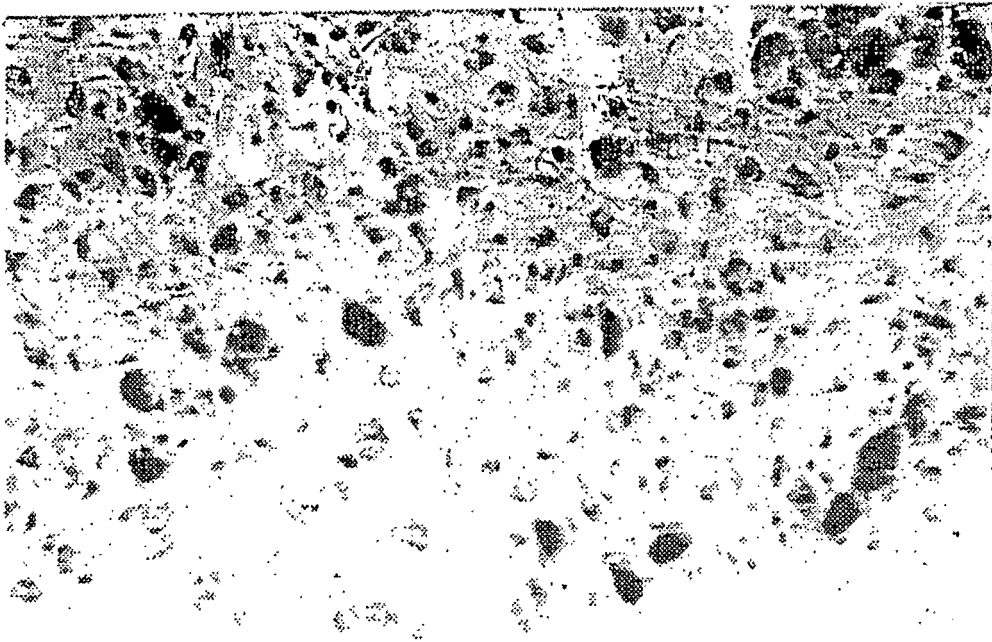


FIG. 5C



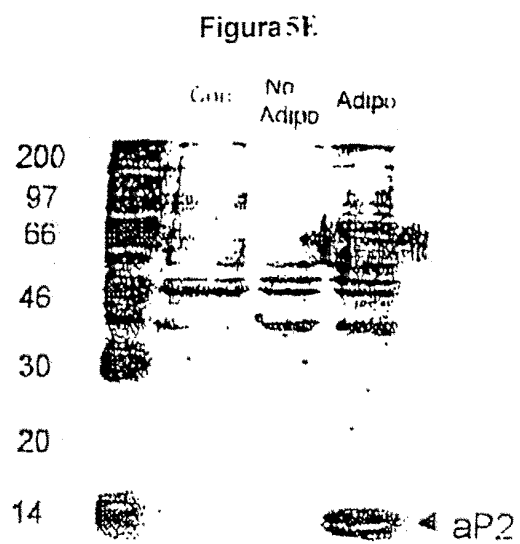
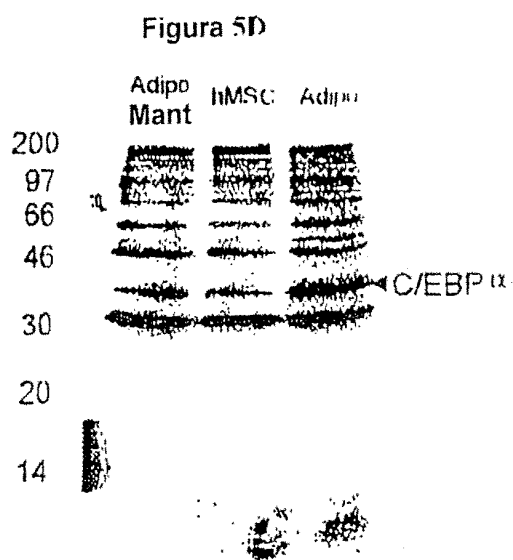


FIG. 6A

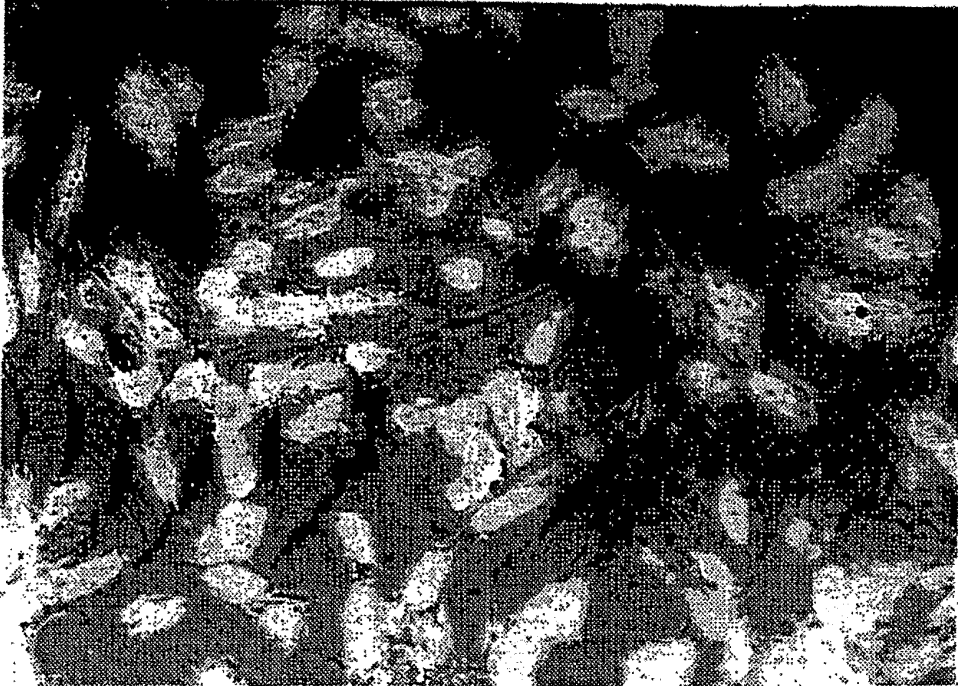
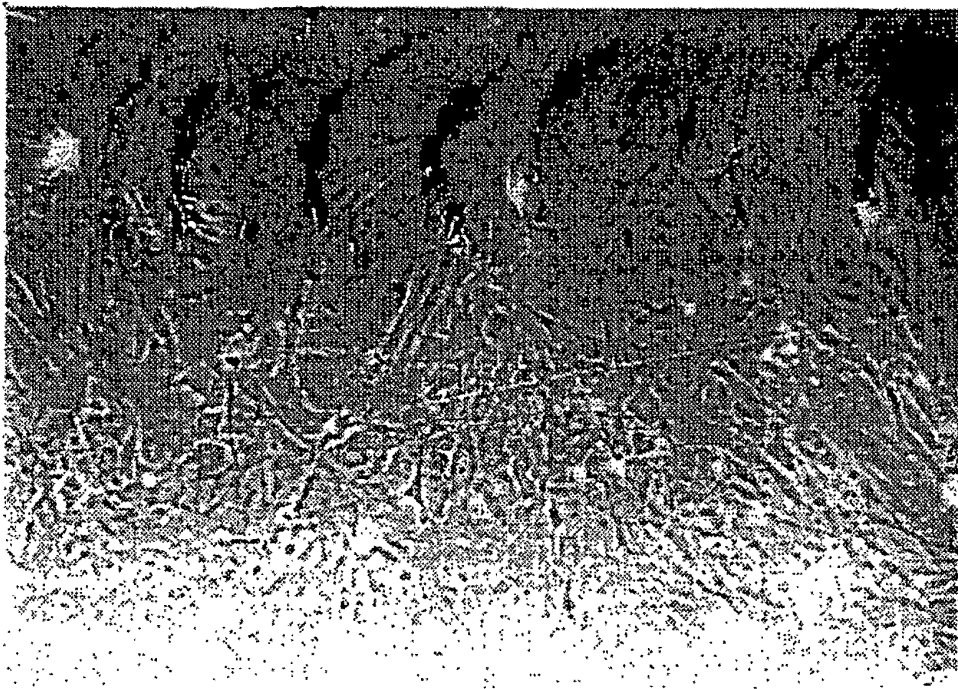


FIG. 6B



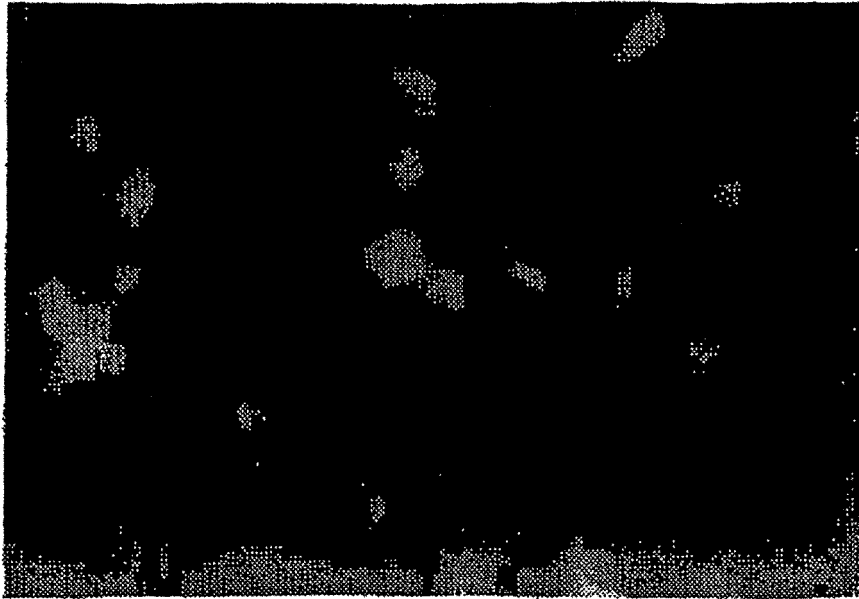


FIG. 7