

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 830 525**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2007** **PCT/EP2007/001360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2007** **WO07093431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2007** **E 07711561 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020** **EP 1989295**

54 Título: **Un método para la diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea (BMSC) y usos del mismo**

30 Prioridad:

**16.02.2006 WO PCT/EP2006/001427**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.06.2021**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (100.0%)**  
**50, avenue Franklin D. Roosevelt**  
**1050 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es:

**EGRISE, DOMINIQUE;**  
**GANGJI, VALÉRIE;**  
**HAUZEUR, JEAN-PHILIPPE;**  
**LAMBERMONT, MICHELINE y**  
**TOUNGOUZ, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 830 525 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

Un método para la diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea (BMSC) y usos del mismo

## Campo de la invención

La memoria descriptiva se refiere a métodos *in vitro* o *ex vivo* para diferenciación osteogénica, y preferiblemente al menos en parte también endotelial, de células madre de médula ósea (BMSC), y a aplicaciones de células diferenciadas de ese modo. La invención se refiere a tipos y poblaciones de células particulares que presentan características similares a, pero nuevas con respecto a, osteoprogenitores y osteoblastos dados a conocer anteriormente. En aspectos relacionados, la invención proporciona usos, en particular en el campo de la terapia, preferiblemente terapia ósea, de los métodos, células y poblaciones celulares que pueden obtenerse usando los métodos anteriores, y de los tipos de células y poblaciones celulares específicamente descritos en el presente documento.

## Antecedentes de la invención

La viabilidad del trasplante alogénico de médula ósea se demostró en niños con osteogénesis imperfecta grave (Horwitz *et al.* 1999. Nat Med 5(3): 309-13). En ese estudio, se injertaron células mesenquimatosas derivadas de médula funcionales y contribuyeron a la formación de nuevo hueso denso, indicando que las células trasplantadas se diferenciaron para dar osteoblastos productores de hueso. También se notificó el trasplante autólogo de médula ósea en un paciente que padecía osteonecrosis de la cabeza del húmero (Hernigou *et al.* 1997. J Bone Joint Surg Am 79:1726-1730). Por tanto, el trasplante de células madre que pueden experimentar diferenciación osteogénica o de células que están implicadas en la diferenciación osteogénica puede ser una ruta prometedora para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los huesos, en particular cuando el tratamiento requiere la producción de hueso nuevo.

Por tanto, existe una gran necesidad de técnicas eficaces que proporcionen cantidades suficientes de células, en particular células autólogas, adecuadas para el trasplante como remedio para trastornos relacionados con los huesos.

Aunque pueden trasplantarse células madre de médula ósea no diferenciadas, estas células aún no están implicadas en un linaje osteogénico y, por tanto, una proporción considerable de las células madre trasplantadas pueden no contribuir en última instancia a la formación de tejido óseo. Además, se ha demostrado (Banfi *et al.* 2000. Exp Hematol 28: 707-15) que el cultivo *in vitro* de células madre de médula ósea disminuye su potencial de proliferación así como su capacidad para experimentar diferenciación cuando se tratan con factores de crecimiento tales como FGF-2. Por ejemplo, en ese estudio, la eficiencia de formación ósea de células madre de médula ósea cultivadas *in vitro* ya disminuyó 36 veces en el primer pase, en comparación con médula ósea recién aislada. Por tanto, la expansión *in vitro* de células madre de médula ósea puede disminuir su eficiencia como fuente de osteoblastos formadores de hueso tras el trasplante.

Martin *et al.* (Endocrinology 138: 4456-4462, 1997) demuestran que el cultivo *in vitro* de células madre de médula ósea en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2), en combinación con componentes de suero de ternero fetal (FCS), mantiene las células en un estado inmaduro (menos fosfatasa alcalina y morfología de tipo fibroblasto), sin embargo las células son competentes para experimentar diferenciación osteogénica *in vitro* en condiciones de cultivo osteogénico específicas. Sin embargo, la diferenciación de tales células inmaduras para dar osteoblastos productores de hueso *in vivo* todavía depende de proporcionar las señales apropiadas tras el trasplante. Por tanto, aunque puede que tales células puedan realizar diferenciación osteogénica *in vitro*, una proporción considerable de las mismas todavía pueden no convertirse en osteoblastos *in vivo*. Además, Chaudhary *et al.* (Bone 34: 402-11, 2004) muestran que células madre de médula ósea humanas tratadas con FGF-2 no demuestran ningún fenotipo osteogénico (ninguna expresión de fosfatasa alcalina) y, de hecho, tienen morfología distrófica. De manera similar, Kalajzic *et al.* (J Cell Biochem 88: 1168-76, 2003) demuestran que FGF-2 inhibe la diferenciación osteogénica.

Además, la preparación de materiales para su uso en terapia en seres humanos debe evitar el uso de componentes de animales no humanos, tales como componentes de suero (por ejemplo, FCS) en los medios de cultivo. Sin embargo, tal como se muestra por Kuznetsov *et al.* (Transplantation 70: 1780-1787, 2000), el uso de sueros humanos homólogos o autólogos disminuye en gran medida la capacidad de las células madre de médula ósea humanas para formar colonias y expandirse *in vitro*, y para formar hueso *in vivo*. Por tanto, Kuznetsov *et al.* sugieren que el uso de FCS es un requisito previo para una expansión eficiente de células madre de médula ósea y para su capacidad para formar hueso.

Takagi *et al.* 2003 (Cytotechnology 43: 89-96) incubaron aspirados de médula ósea humana en suero de donante complementado con FGF-2, en condiciones específicas. La población celular obtenida de este modo por Takagi *et al.* 2003 sólo mostró potencial de diferenciación condrogénica y, por tanto, los autores la contemplaron para su uso en la regeneración de cartílago.

Kobayashi *et al.* 2005 (J Bone Joint Surg Br 87: 1426-3) describen condiciones particulares para el aislamiento y

mantenimiento de BMSC humanas en suero de donante autólogo, concluyendo que estas condiciones pueden proporcionar suficiente expansión *ex vivo* de BMSC humanas, al tiempo que se conserva su potencial de diferenciación múltiple. Kobayashi *et al.* 2005 emplean FGF-2 en cultivo secundario para fomentar una expansión de BMSC adicional sin diferenciación. Estos autores no dan a conocer condiciones que hagan que sus células progresen hacia osteoprogenitores o células con fenotipo de osteoblastos.

Lin *et al.* 2005 (Transplant Proc 37: 4504-5) notificaron la expansión prolongada de BMSC humanas de potencial múltiple en suero de donante autólogo. La adición de FGF-2 y EGF a las células en determinadas condiciones no influyó en la proliferación celular y no provocó la progresión de las células hacia un destino osteogénico.

El documento WO 03/004605 proporciona poblaciones de células mesenquimatosas obtenidas a partir de células madre pluripotentes mediante diferenciación de las mismas *ex vivo*, usando condiciones de cultivo y técnicas de selección especiales.

El documento WO 2004/007697 describe métodos de aislamiento de células madre mesenquimatosas a partir de médula ósea, para reparar o inducir formación de hueso, sin expansión en cultivo previa de las células madre mesenquimatosas.

Deans y Moseley 2000 (Experimental Hematology, 28, 8, 875-884) describen el cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas a partir de médula ósea en medio que contiene FBS.

Con el fin de proporcionar una formación ósea máxima, sería deseable trasplantar células que ya muestran un fenotipo osteoblástico, dado que tales células son esencialmente las únicas con una actividad de formación ósea demostrada. Sin embargo, la diferenciación *in vitro* de células madre de médula ósea para dar osteoblastos implica el cultivo en medio osteogénico (Jaiswal *et al.* 1997. J Cell Biochem 64: 295-312) y puede conducir a una proliferación reducida de tales células *in vitro*. Además, el uso de medio osteogénico implica la adición de componentes adicionales a las células, lo cual puede aumentar el riesgo de contaminación del cultivo celular.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de un método sencillo y fiable para producir osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo osteoblástico a partir de células madre adultas humanas, en particular células madre de médula ósea humanas, *in vitro* al tiempo que se mantiene una alta capacidad de expansión de las células, garantizando condiciones autólogas y minimizando el número de componentes implicados en el cultivo de las células.

También existe la necesidad en la técnica de células osteoprogenitoras u osteoblásticas que tengan características útiles específicas, por ejemplo, en el contexto de terapia ósea, y de poblaciones celulares que comprendan tales células.

## Sumario de la invención

La presente invención aborda los problemas anteriores y otros de la técnica anterior.

En particular, los inventores constataron que las células madre adultas, en particular células madre de médula ósea (BMSC), ventajosamente de origen humano, pueden expandirse fácilmente *ex vivo* y dirigirse hacia los fenotipos osteoprogenitor o de osteoblastos útiles, y poblaciones celulares útiles que comprenden tales fenotipos y otros, usando condiciones de cultivo dadas a conocer en el presente documento.

La memoria descriptiva se refiere a un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de células madre de médula ósea humanas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto las células madre de médula ósea con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.

Los inventores observaron que los métodos tal como se describen en el presente documento pueden diferenciar una fracción sustancial, por ejemplo, la mayor parte, de células madre expuestas hacia los fenotipos osteoprogenitor o de osteoblastos. Por consiguiente, los métodos tal como se describen en el presente documento pueden emplearse para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos en sí mismos.

No obstante, puede apreciarse que los métodos tal como se describen en el presente documento producen generalmente poblaciones celulares que comprenden osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, habitualmente poblaciones que comprenden una porción sustancial, por ejemplo, la mayor parte, de tales células. Los inventores también constataron que las poblaciones celulares resultantes a partir del método pueden comprender tipos de células adicionales, al menos algunos de los cuales pueden aumentar las características útiles de las células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos presentes en tales poblaciones, en particular en el contexto de terapia ósea. Por ejemplo, una población celular de la invención también comprende células endoteliales o progenitores endoteliales.

Por consiguiente, la memoria descriptiva se refiere a un método para obtener una población celular que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de células madre de médula ósea

humanas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto las células madre de médula ósea con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.

Tal como se muestra mediante evidencias experimentales, el método tal como se describe en el presente documento puede proporcionar la expansión de las células madre de médula ósea entre 40.000 y 710.000 veces a lo largo de tres semanas, más particularmente veintidós días. Tal alto grado de expansión es sorprendente a la vista de las enseñanzas de la técnica anterior de que el uso de suero humano reduce notablemente la expansión de células madre de médula ósea humanas (Kuznetsov *et al.* 2000). Por tanto, el método tal como se describe en el presente documento permite la generación de un alto número de células con fines de trasplante. Esto reduce ventajosamente el tamaño de la muestra de médula ósea que es necesario extraer a partir de un sujeto con el fin de proporcionar las células madre. Además, el método tal como se describe en el presente documento permite acortar el tiempo en el que pueden trasplantarse las células diferenciadas a un paciente, dando como resultado de ese modo una terapia más rápida.

El método puede usar factor de crecimiento de fibroblastos y, en particular, FGF-b, es decir, FGF-2. A la vista de las enseñanzas de la técnica anterior de que FGF-2 provoca un fenotipo más inmaduro de células madre de médula ósea (Martin *et al.* 1997, Kalajic *et al.* 2003), resulta sorprendente que el uso de FGF-2 en combinación con componentes de plasma o suero humano estimule la diferenciación de células madre de médula ósea para alcanzar las características fenotípicas de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos.

Por tanto, el método tal como se describe en el presente documento proporciona un efecto ventajoso inesperado (alta expansión y fenotipo de osteoblastos) combinando elementos que se ha mostrado en la técnica anterior que proporcionan efectos opuestos cuando se usan por separado. Incluso más sorprendentemente, la técnica anterior enseñó que la diferenciación *in vitro* para dar osteoblastos requiere medio osteogénico, que contiene componentes tales como dexametasona, fosfato de ácido ascórbico y beta-glicerolfosfato. El método muestra sorprendentemente que tales componentes no son necesarios para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos. Por tanto, puede reducirse ventajosamente el número de componentes en un medio, dando como resultado menos probabilidades de error o contaminación, o arrastre de tales componentes tras el trasplante.

El método puede usar plasma o suero humano que es autólogo con respecto a las células madre de médula ósea y/o no incluye ningún material de animal no humano (tal como componentes de suero) en el cultivo de células madre de médula ósea. Esto hace que el método sea particularmente ventajoso para su uso en terapia humana, por ejemplo, reduciendo el riesgo de rechazo de las células obtenidas y/o reduciendo el riesgo de contaminación con patógenos.

El método puede definir otras características, por ejemplo, sin limitación, tiempos de incubación, pases, cantidades de componentes, etc., que solas o en combinación delimitan adicionalmente el método con respecto a la técnica anterior y subyacen a proporcionar células y poblaciones celulares con características ventajosas, por ejemplo, con superioridad en el trasplante óseo.

Los inventores constataron que osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como poblaciones celulares, que pueden obtenerse usando los métodos tal como se describen en el presente documento, muestran ventajas a modo de ejemplo con respecto a la técnica anterior. En primer lugar, al menos durante el cultivo *ex vivo*, dichas células muestran una rápida tasa de proliferación, con un tiempo de duplicación estimado de aproximadamente 2 días. Por tanto, pueden generarse números suficientes de las células dentro de un plazo de tiempo comparativamente corto, lo cual limita ventajosamente los periodos de tratamiento de paciente. En segundo lugar, las células muestran una tasa relativamente rápida de mineralización de sustrato, lo cual permite una formación ósea potenciada tras el trasplante de las células a pacientes. En tercer lugar, las células presentan poca o sustancialmente ninguna propensión a la diferenciación hacia otros fenotipos mesenquimatosos, en particular hacia adipocitos o condrocitos. Esto puede limitar ventajosamente la formación de tejido distinto de hueso cuando se trasplantan las células.

Por consiguiente, la memoria descriptiva proporciona osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como poblaciones celulares y cultivos que comprenden los mismos, que pueden obtenerse o se obtienen directamente usando los métodos tal como se describen en el presente documento, y también usos terapéuticos de los mismos en trastornos relacionados con los huesos y formulaciones farmacéuticas correspondientes que comprenden los mismos.

En un desarrollo adicional de la invención, los inventores analizaron en detalle las células y poblaciones celulares obtenidas llevando a cabo los métodos tal como se describen en el presente documento, con el fin de definir nuevos tipos de células osteogénicas y nuevas poblaciones celulares que comprenden las mismas, que pueden ofrecer superioridad particular en terapia, especialmente en terapia de trasplante óseo. Por consiguiente, la invención también contempla tales nuevos tipos de células, poblaciones que comprenden los mismos, así como el uso de los mismos, especialmente en terapia ósea.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona el contenido tal como se expone en todas y cada una de las reivindicaciones 1 a 17 adjuntas.

La memoria descriptiva proporciona células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (en el presente documento, "células OOP-1") caracterizadas porque expresan conjuntamente (1) al menos un marcador de osteoblastos elegido de fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP) y sialoproteína ósea (BSP) con (2) al menos un marcador de células madre / osteoprogenitores inmaduros elegido de CD63 (a modo de ejemplo, tal como se reconoce por el anticuerpo HOP-26; véase Zannettino *et al.* 2003. J Cell Biochem. 89: 56-66) y CD166. En (1): dichas células OOP-1 pueden expresar al menos ALP; dichas células OOP-1 pueden expresar al menos dos marcadores elegidos de ALP, P1NP y BSP, por ejemplo, al menos ALP y P1NP, al menos ALP y BSP o al menos P1NP y BSP; dichas células OOP-1 pueden expresar al menos los tres de ALP, BSP y P1NP. En (2): dichas células OOP-1 pueden expresar al menos CD63; dichas células OOP-1 pueden expresar al menos CD166; dichas células OOP-1 pueden expresar al menos CD63 y CD166.

Según el conocimiento de los inventores, la técnica anterior sólo observó CD63 y/o CD166 en células madre / osteoprogenitores inmaduros cuando ALP, P1NP y BSP eran negativos. Tales células positivas para CD63 y/o CD 166 de la técnica anterior mostraron multipotencia y pudieron diferenciarse para dar condrocitos, adipocitos así como osteoblastos. Por tanto, la presencia concomitante de al menos uno de ALP, P1NP o BSP con CD63 y/o CD166 marca las células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos (células OOP-1) como un nuevo tipo de células no dado a conocer anteriormente. Además, este nuevo tipo de células presenta al menos algunas de las propiedades ventajosas tales como alta tasa de proliferación, alta tasa de mineralización y ausencia sustancial de propensión hacia diferenciación condrocítica y adipocítica, que son particularmente útiles, por ejemplo, en el contexto terapéutico óseo.

Preferiblemente, dichas células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos (células OOP-1) son negativas para osteocalcina (OCN). En la técnica se conoce que OCN se expresa preferiblemente en osteoblastos maduros. Por tanto, la ausencia de expresión de OCN significa el carácter menos maduro de estas células.

La memoria descriptiva proporciona además células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (en el presente documento, "células OOP-2") caracterizadas porque expresan conjuntamente, es decir, son positivas para, (1) al menos un marcador de osteoblastos elegido de fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP) y sialoproteína ósea (BSP) con (2) el marcador de progenitor hematopoyético / endotelial CD34. En (1): dichas células OOP-2 pueden expresar al menos ALP; dichas células OOP-2 pueden expresar al menos dos marcadores elegidos de ALP, P1NP y BSP, por ejemplo, al menos ALP y P1NP, al menos ALP y BSP o al menos P1NP y BSP; dichas células OOP-2 pueden expresar al menos los tres de ALP, BSP y P1NP.

Según el conocimiento de los inventores, nunca antes se han descrito células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos que expresen CD34, y normalmente se considera que la ausencia de CD34 es una de las características de las células madre mesenquimatosas de médula ósea. Por consiguiente, la presencia concomitante de al menos uno de ALP, P1NP o BSP con CD34 marca las células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos tal como se describen en el presente documento (células OOP-2) como un nuevo tipo de células no dado a conocer anteriormente. Además, este nuevo tipo de células presenta al menos algunas de las propiedades ventajosas tales como alta tasa de proliferación, alta tasa de mineralización y ausencia sustancial de propensión hacia diferenciación condrocítica y adipocítica, que son particularmente útiles, por ejemplo, en el contexto terapéutico óseo.

Preferiblemente, dichas células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos (células OOP-2) son negativas para osteocalcina (OCN). En la técnica se conoce que OCN se expresa preferiblemente en osteoblastos maduros. Por tanto, la ausencia de expresión de OCN significa el carácter menos maduro de estas células.

Los inventores también contemplan solapamientos entre los tipos de células osteoprogenitoras o de osteoblastos descritos anteriormente. Por ejemplo, las células OOP-1 pueden expresar conjuntamente además CD34. Las células OOP-2 pueden expresar además al menos uno, por ejemplo, uno o ambos, de CD63 y CD166.

Tal como se menciona, la invención abarca poblaciones celulares que comprenden las células osteoprogenitoras o con fenotipo de osteoblastos anteriores tal como se describen en el presente documento, por ejemplo, que comprenden los tipos de células OOP-1 y/u OOP-2 comentados anteriormente. Una población celular a modo de ejemplo puede comprender al menos el 80 %, e incluso más preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de los tipos de células OOP-1 y/u OOP-2. La población celular puede comprender menos del 20 % y preferiblemente menos del 10 %, por ejemplo, menos del 7 %, menos del 5 % o menos del 2 % de tipos de células distintos de los tipos de células OOP-1 y/u OOP-2 anteriores.

Dicha población celular comprende células endoteliales o progenitores de las mismas que son positivas para CD34 y de las que del 50 % al 75 % expresan factor de von Willebrand (vWF), del 25 % al 50 % expresan VEGF y del 25 % al 50 % expresan CD133.

Ventajosamente, los inventores han constatado que la presencia de tales células endoteliales o progenitores de las mismas en una población celular junto con osteoprogenitores o células con fenotipo de osteoblastos tal como se

describen en el presente documento puede mejorar el injerto de dichas células de linaje osteogénico en pacientes, supuestamente, pero sin limitación, instigando la formación de vasos que soportan y oxigenan las células y los tejidos implantados y/o liberando factores de crecimiento, tales como, por ejemplo, VEGF.

5 En aspectos relacionados, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden las poblaciones celulares definidas anteriormente y usos terapéuticos de las mismas.

Estas y otras características de la invención se explican adicionalmente a continuación en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, así como se ilustran mediante ejemplos no limitativos.

### Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 muestra resultados de inyección de una población celular según la presente invención en un paciente con osteonecrosis de la cabeza del fémur (línea continua con rombos). A: puntuación de VAS; B: puntuación de WOMAC. "B" - nivel inicial, "3m" - 3 meses, "6m" - 6 meses, línea discontinua - controles históricos (biopsia de control).

La figura 2 muestra la mineralización por las células / poblaciones de la invención.

### Descripción detallada de la invención

15 Tal como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, "una célula" se refiere a una o más de una célula.

20 Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por/comprendido" tal como se usan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos y abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método adicionales no mencionados.

La mención de intervalos numéricos mediante puntos de extremo incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de ese intervalo, así como los puntos de extremo mencionados.

25 Se pretende que el término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento, cuando hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, abarque variaciones de  $\pm 20\%$  o menos, preferiblemente  $\pm 10\%$  o menos, más preferiblemente  $\pm 5\%$  o menos, incluso más preferiblemente  $\pm 1\%$  o menos y todavía más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  o menos con respecto al valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para funcionar en la invención dada a conocer.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados para dar a conocer la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado habitualmente entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

#### 1. Métodos

35 Tal como se detalla en la sección de sumario, la memoria descriptiva se refiere a un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como para obtener poblaciones celulares que comprenden osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, a partir de células madre de médula ósea humanas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto las células madre de médula ósea con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.

40 La médula ósea es el tejido blando que ocupa cavidades medulares de huesos largos, algunos canales de Havers y espacios entre trabéculas de hueso trabecular o esponjoso. Convencionalmente, se distinguen dos tipos de médula ósea: roja, que se encuentra en todos los huesos al comienzo de la vida y en ubicaciones restringidas en la edad adulta (por ejemplo, en el hueso esponjoso) y se dedica principalmente a la producción de células sanguíneas (hematopoyesis); y amarilla, que comprende principalmente células grasas y tejido conjuntivo.

45 En su conjunto, la médula ósea es un tejido complejo compuesto por células madre hematopoyéticas, glóbulos rojos y blancos y sus precursores, células madre mesenquimatosas (MSC), células estromales y sus precursores, y un grupo de células incluyendo fibroblastos, reticulocitos, adipocitos y células que forman una red de tejido conjuntivo denominada "estroma".

50 Las células de médula ósea contribuyen a muchos tejidos diversos después del trasplante sistémico tanto en ratones como en seres humanos. Esta capacidad puede reflejar las actividades de múltiples células madre presentes en la médula ósea, tales como, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas y/o células madre multipotentes de médula. Por ejemplo, Krause *et al.* (Cell 105: 369-377, 2001) mostraron que una única célula madre derivada de médula ósea puede generar células de linajes tanto hematopoyético como no hematopoyético. Esto se confirmó por Dominici *et al.* (PNAS 101 (32): 11761-6, 2004) que mostraron que pueden derivarse células hematopoyéticas y osteoblastos a partir de un progenitor de médula común después del trasplante de médula ósea. En otro ejemplo, la patente estadounidense 5.486.359 da a conocer el aislamiento a partir de médula ósea de

células madre mesenquimatosas, que pueden generar células de linajes mesenquimatosos, por ejemplo, de hueso, cartílago, músculo, tendón, tejido conjuntivo, grasa o estroma de médula. Además, Horwitz *et al.* (Nat Med 5(3): 309-13, 1999) mostraron que el trasplante alogénico de médula ósea es eficaz en niños con osteogénesis imperfecta grave. En ese estudio, se injertaron células mesenquimatosas derivadas de médula funcionales y contribuyeron a la formación de nuevo hueso denso. Tal como se muestra por Horwitz *et al.* (PNAS 99(13): 8932-7, 2002), el porcentaje de osteoblastos injertados no mejoró significativamente tras el trasplante de tan sólo células madre mesenquimatosas (células de médula ósea adherentes a plástico), conduciendo a la conclusión de que células de médula ósea distintas de aquellas en la población adherente, en la que se piensa que residen células madre mesenquimatosas, pueden ser potentes progenitores trasplantables de osteoblastos. A la vista de lo anterior, la médula ósea puede contener varios tipos de células madre con el potencial de generar células del linaje osteocítico (hueso).

Por tanto, el término "célula madre de médula ósea" o "BMSC" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier célula madre adulta presente en la médula ósea, y particularmente presente en o (parcialmente) aislada a partir de una muestra de médula ósea. Una muestra de médula ósea (BMSC) puede obtenerse, por ejemplo, a partir de la cresta ilíaca, fémures, tibias, columna vertebral, costilla u otros espacios medulares de un sujeto. El término BMSC también abarca la progenie de BMSC, por ejemplo, progenie obtenida mediante propagación *in vitro* o *ex vivo* de BMSC obtenidas a partir de una muestra de un sujeto.

El término "célula madre" tal como se usa en el presente documento designa cualquier célula que, si se expone a condiciones apropiadas, puede dar lugar a al menos uno, y preferiblemente dos o más tipos de células diferentes. Una célula madre de este tipo puede realizar proliferación extensa, o quizás indefinida, *in vivo* y, en condiciones específicas, también *in vitro*, en la que la progenie de una célula madre de este tipo puede conservar las características fenotípicas y la capacidad proliferativa de la célula madre, o bien, si se expone a condiciones apropiadas, puede dar lugar a célula(s) más especializada(s), es decir más diferenciada(s). Se dice que una célula madre "da lugar" a otra célula más diferenciada cuando, por ejemplo, la célula madre se diferencia para convertirse en otra célula sin experimentar previamente división celular, o si la otra célula se produce después de una o más rondas de división y/o diferenciación celular de la célula madre.

El término "célula madre adulta" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre presente en u obtenida a partir de un organismo en el estadio fetal o después del nacimiento.

Las células madre de médula ósea preferibles tienen el potencial de generar células al menos del linaje osteogénico (hueso), tales como, por ejemplo, células osteogénicas y/u osteoprogenitores y/o preosteoblastos y/u osteoblastos y/u osteocitos, etc.

Preferiblemente, al menos algunas células madre de médula ósea también pueden tener el potencial de generar células adicionales comprendidas en las poblaciones celulares de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje endotelial, por ejemplo células progenitoras endoteliales y/o células endoteliales.

Un tipo a modo de ejemplo, pero no limitativo, de BMSC que tienen el potencial de generar células al menos del linaje osteogénico son células madre mesenquimatosas. El término "célula madre mesenquimatosa" o "MSC" (también conocidas como "células estromales de médula") tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre adulta, derivada de mesodermo, que puede generar células de linajes mesenquimatosos, normalmente de dos o más linajes mesenquimatosos, por ejemplo, linaje osteocítico (hueso), condrocítico (cartílago), miocítico (músculo), tendocítico (tendón), fibroblástico (tejido conjuntivo), adipocítico (grasa) y estromogénico (estroma de médula). Las MSC pueden aislarse, por ejemplo, a partir de médula ósea, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periostio y tejido adiposo. Se han descrito MSC humanas, su aislamiento, expansión *in vitro* y diferenciación, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.486.359; la patente estadounidense n.º 5.811.094; la patente estadounidense n.º 5.736.396; la patente estadounidense n.º 5.837.539; o la patente estadounidense n.º 5.827.740. Cualquier MSC descrita en la técnica y aislada mediante cualquier método descrito en la técnica puede ser adecuada, siempre que tal MSC pueda generar células al menos del linaje osteocítico (hueso), tales como, por ejemplo, células osteogénicas y/u osteoprogenitores y/o preosteoblastos y/u osteoblastos y/u osteocitos, etc.

Posiblemente, pero sin limitación, al menos algunas MSC también pueden generar células adicionales comprendidas en las poblaciones celulares de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje endotelial, por ejemplo células progenitoras endoteliales y/o células endoteliales.

El término MSC también abarca la progenie de MSC, por ejemplo, la progenie obtenida mediante propagación *in vitro* o *ex vivo* de MSC obtenidas a partir de una muestra biológica de un sujeto humano o animal.

Tal como se muestra en los ejemplos, el método tal como se describe en el presente documento conlleva seleccionar las células BMSC que, tras ponerse en contacto con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, se adhieren a una superficie de sustrato, por ejemplo, la superficie del recipiente de cultivo. En la técnica se conoce que pueden aislarse MSC a partir de médula ósea (u otras fuentes) seleccionando las células (mononucleares) que pueden adherirse a una superficie de sustrato, por

ejemplo, superficie de plástico (de hecho, las MSC se denominan algunas veces células adherentes a plástico o fibroblastos de unidad de formación de colonias). Por tanto, sin limitarse a ninguna hipótesis, los presentes inventores especulan que, en el método tal como se describe en el presente documento, las MSC pueden contribuir al menos parcialmente a obtener osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC.

- 5 Por tanto, la presente memoria descriptiva también contempla un método para obtener osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de células madre mesenquimatosas humanas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto las MSC con plasma o suero humano y un factor de crecimiento.

Las MSC pueden estar comprendidas en una muestra biológica, por ejemplo, en una muestra que comprende BMSC, o pueden aislarse al menos parcialmente a partir de la misma tal como se conoce en la técnica. Además, las MSC pueden aislarse al menos parcialmente a partir de médula ósea o a partir de fuentes que comprenden MSC distintas de médula ósea, por ejemplo, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periostio y tejido adiposo.

Las BMSC o MSC presentes en, o aisladas al menos parcialmente a partir de, la muestra biológica puede ponerse en contacto con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, sin propagación previa en condiciones que permiten el crecimiento celular y la duplicación de BMSC o MSC sin diferenciación.

Además, se sabe que preparaciones de MSC a partir de médula ósea comprenden una subpoblación de células que son pequeñas, proliferan rápidamente, experimentan renovación cíclica cuando vuelven a sembrarse en placa a baja densidad y son precursoras de MSC más maduras en el mismo cultivo. Esta subpoblación de células se denomina "células de autorrenovación rápida" y pueden tener al menos dos componentes identificados como RS-1 y RS-2 (Colter *et al.* PNAS 97(7): 3213-8, 2000). Por tanto, sin limitarse a ninguna hipótesis, los presentes inventores especulan que, en el método tal como se describe en el presente documento, las células RS tal como se describen por Colter *et al.* 2000 pueden contribuir al menos en parte a obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC, conduciendo posiblemente a través de un intermedio de MSC más maduras. Posiblemente, pero sin limitación, los inventores especulan que las células RS también pueden generar células adicionales comprendidas en las poblaciones celulares de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje endotelial, por ejemplo células progenitoras endoteliales y/o células endoteliales.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también contempla un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o para obtener poblaciones celulares que comprenden los mismos, a partir de células de autorrenovación rápida humanas (RS) *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto las RS con plasma o suero humano y un factor de crecimiento.

Se conoce además que la médula ósea contiene una población de células precursoras denominada "población secundaria" (SP). Estas células se identifican como precursores hematopoyéticos CD34<sup>low/neg</sup>, pero tienen una plasticidad notable en cuanto a la regeneración de tejido hematopoyético así como no hematopoyético (Goodell *et al.* 1997. Nat Med 3(12):1337-45). Por tanto, sin limitarse a ninguna hipótesis, los presentes inventores especulan que, en el método tal como se describe en el presente documento, las células SP tal como se describen por Goodell *et al.* 1997 pueden contribuir al menos en parte a obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC, conduciendo posiblemente a través de un intermedio de MSC más maduras. Posiblemente, pero sin limitación, los inventores especulan que las células SP también pueden generar células adicionales comprendidas en las poblaciones celulares de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje endotelial, por ejemplo células progenitoras endoteliales y/o células endoteliales.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también contempla un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o para obtener poblaciones celulares que comprenden los mismos, a partir de células de población secundaria humanas (SP) *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto las SP con plasma o suero humano y un factor de crecimiento.

Se conoce además que la médula ósea comprende una población de células precursoras osteogénicas que se identifican inicialmente por su baja densidad (por ejemplo, tras centrifugación con gradiente de densidad), naturaleza no adherente y bajo nivel de expresión de marcadores osteogénicos (Long *et al.* 1995. J Clin Invest. Febrero de 1995; 95(2): 881-7; documento US 5.972.703). Sin embargo, a medida que tales células se inducen para diferenciarse hacia osteoblastos, también se vuelven adherentes a la superficie de sustrato. Por tanto, sin limitarse a ninguna hipótesis, los presentes inventores especulan que, en el método tal como se describe en el presente documento, los precursores osteogénicos tal como se describen por Long *et al.* 1995 pueden contribuir al menos en parte a obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también contempla un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o para obtener una población celular que comprende los mismos, a partir de precursores osteogénicos humanos (OP) *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto los OP con plasma o suero humano y un factor de crecimiento.

Se conoce además que la médula ósea comprende una población de células precursoras primitivas que pueden

generar células de linajes tanto hematopoyético como no hematopoyético (Krause *et al.* 2001. Cell 105:369-377; Dominici *et al.* 2004. PNAS 101(32): 11761-6). Por tanto, sin limitarse a ninguna hipótesis, los presentes inventores especulan que, en el método tal como se describe en el presente documento, tales precursores primitivos pueden contribuir al menos en parte a obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC, conduciendo posiblemente a través de un intermedio de MSC más maduras. Posiblemente, pero sin limitación, los inventores especulan que tales precursores primitivos también pueden generar células adicionales comprendidas en las poblaciones celulares de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje endotelial, por ejemplo células progenitoras endoteliales y/o células endoteliales.

Debe entenderse que, dada la complejidad de las poblaciones de células madre de médula ósea, no debe considerarse que la presente divulgación está limitada a uno o más tipos de BMSC particulares.

En vez de eso, en el método tal como se describe en el presente documento, uno o más tipos de células BMSC, por ejemplo, tal como se describió anteriormente, pueden contribuir, quizás en un grado diferente, a obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o a obtener poblaciones celulares que comprenden los mismos. Por otro lado, debe entenderse que el método tal como se describe en el presente documento también puede emplear una población de BMSC particulares, por ejemplo, MSC, aisladas al menos parcialmente a partir de otras poblaciones de BMSC.

La obtención de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de células madre de médula ósea humanas es *in vitro* o *ex vivo*. El término "*in vitro*" tal como se usa en el presente documento designa fuera del, o externo al, cuerpo humano o de animal. Debe entenderse que el término "*in vitro*" tal como se usa en el presente documento incluye "*ex vivo*". El término "*ex vivo*" se refiere normalmente a tejidos o células extraídas a partir de un cuerpo humano o de animal y mantenidas o propagadas fuera del cuerpo, por ejemplo, en un recipiente de cultivo.

Pueden obtenerse BMSC a partir de una muestra biológica de un sujeto humano.

El término "muestra biológica" o "muestra" tal como se usa en el presente documento se refiere a una muestra obtenida a partir de una fuente biológica, por ejemplo, a partir de un organismo, tal como un sujeto humano o animal, un cultivo celular, una muestra de tejido, etc. Una muestra biológica de un sujeto humano o animal se refiere a una muestra extraída a partir de un sujeto humano o animal y que comprende células del mismo. La muestra biológica de un sujeto humano o animal puede comprender uno o más tipos de tejido y puede comprender células de uno o más tipos de tejido. En la técnica se conocen bien métodos de obtención de muestras biológicas de un sujeto humano o animal, por ejemplo, biopsia de tejido o extracción de sangre.

Una muestra biológica útil de un sujeto humano comprende células madre de médula ósea del mismo. Tal muestra puede obtenerse normalmente a partir de médula ósea, por ejemplo, a partir de la cresta ilíaca, fémures, tibias, columna vertebral, costilla u otros espacios medulares de un sujeto. Otra muestra biológica útil comprende células madre mesenquimatosas y puede derivarse, por ejemplo, a partir de sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periostio o tejido adiposo de un sujeto.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a un organismo eucariota, en particular un organismo humano o animal. Los sujetos animales incluyen formas prenatales de animales, tales como, por ejemplo, fetos. Los sujetos humanos pueden incluir fetos y no embriones.

También pueden obtenerse BMSC a partir de un sujeto humano que corre el riesgo de, o tiene, un trastorno relacionado con los huesos. Los presentes inventores han constatado que administrar osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos obtenidas a partir de las BMSC de tal sujeto según los métodos tal como se describen en el presente documento puede ser útil para tratar el trastorno relacionado con los huesos en dicho sujeto, por ejemplo, mediante formación ósea *de novo* o aumento de la densidad ósea.

Por consiguiente, el término "trastorno relacionado con los huesos" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de enfermedad ósea, cuyo tratamiento puede beneficiarse de la administración de células de linaje osteogénico, por ejemplo, osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a un sujeto que tiene el trastorno. En particular, tales trastornos pueden caracterizarse, por ejemplo, por formación ósea reducida o resorción ósea excesiva, por número, viabilidad o función reducidos de osteoblastos u osteocitos presentes en el hueso, masa ósea reducida en un sujeto, adelgazamiento de huesos, elasticidad o resistencia ósea comprometida, etc.

A modo de ejemplo, pero no de limitación, los trastornos relacionados con los huesos que pueden beneficiarse de la administración de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describen en el presente documento pueden incluir trastornos locales o sistémicos, tales como cualquier tipo de osteoporosis u osteopenia, por ejemplo, primaria, posmenopáusica, senil, inducida por corticoides, cualquier osteonecrosis secundaria de un único o de múltiples sitios, cualquier tipo de fractura, por ejemplo, compresión o fracturas sin unión, de mala unión, de unión retardada, estados que requieren fusión ósea (por ejemplo, fusiones espinales y reconstrucción), fracturas maxilofaciales, reconstrucción ósea, por ejemplo, tras lesión traumática o cirugía contra el cáncer, reconstrucción ósea craneofacial, osteogénesis imperfecta, cáncer de huesos osteolítico, enfermedad de Paget, trastornos

endocrinológicos, hipofosfatemia, hipocalcemia, osteodistrofia renal, osteomalacia, osteopatía adinámica, artritis reumatoide, hiperparatiroidismo, hiperparatiroidismo primario, hiperparatiroidismo secundario, enfermedad periodontal, enfermedad de Gorham-Stout y síndrome de McCune-Albright.

- 5 Tal como se mencionó anteriormente, el método tal como se describe en el presente documento es para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o poblaciones celulares que comprenden los mismos, a partir de BMSC.

10 Tal como se usa en el presente documento en el contexto de los métodos tal como se describen en el presente documento, la mención de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos abarca generalmente células que pueden contribuir a, o pueden desarrollarse para dar células que pueden contribuir a, la formación de material óseo o matriz ósea. Se entiende que la divulgación proporciona métodos que dan como resultado células y poblaciones celulares que, tal como se confirma experimentalmente por los inventores, son útiles para restaurar la formación ósea en entornos terapéuticos. Por consiguiente, debe interpretarse que se desea que la mención de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos abarque cualquiera de tales células útiles del linaje osteogénico resultantes de los métodos tal como se describen en el presente documento.

15 La presente divulgación proporciona directriz suficiente para realizar el método tal como se describe en el presente documento, tal como para obtener células y poblaciones celulares contempladas en el presente documento y a las que se hace referencia generalmente mediante la mención anterior. Por medio de verificación de si se han obtenido células o poblaciones celulares deseadas, un experto puede aplicar, por ejemplo, los métodos de evaluación fenotípica dados a conocer en los ejemplos o pruebas adicionales en la técnica. No obstante, mediante directriz adicional y sin limitación, un osteoprogenitor, osteoblasto o célula con fenotipo de osteoblastos puede abarcar cualquier célula del linaje celular osteogénico que tendrá al menos una característica, y puede presentar al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco características, de la siguiente lista: (a) positiva para CD90, CD73 y CD105 (b) positiva para fosfatasa alcalina (ALP) (más específicamente, ALP del tipo hueso-hígado-riñón); (c) positiva para osteocalcina (específica para osteoblastos maduros); (d) densidad de entre 1,050 y 1,090 g/cm<sup>3</sup>; (e) positiva para osteonectina (positiva en osteoblastos y precursores); (f) un diámetro celular de entre 6 y 70 µm y forma sustancialmente cuboide; (g) positiva para colágeno de tipo I (procolágeno) y/o para vimentina y/o sialoproteína ósea; (h) positiva para otros marcadores específicos de osteoblastos, tales como receptores de BMP, receptores de PTH; (i) evidencias de capacidad para mineralizar el entorno externo o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio, cuando se expone a medio osteogénico (Jaiswal *et al.* 1997. J Cell Biochem 64: 295-312).

30 La expresión de los marcadores específicos de células anteriores puede detectarse usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica, tal como inmunocitoquímica o adsorción por afinidad, análisis por inmunotransferencia de tipo Western, FACS, ELISA, etc., o mediante cualquier ensayo bioquímico adecuado de actividad enzimática (por ejemplo, para detectar ALP), o mediante cualquier técnica adecuada de medición de la cantidad del ARNm de marcador, por ejemplo, transferencia de tipo Northern, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, etc. Los datos de secuencia para marcadores indicados en esta divulgación se conocen y pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas tales como GenBank. La acumulación de calcio dentro de células y la deposición en proteínas de matriz puede medirse mediante cultivo en <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, lavado y nuevo cultivo, y después determinación de cualquier radiactividad presente dentro de la célula o depositada en la matriz extracelular (patente estadounidense n.º 5.972.703), o sometiendo a ensayo sustrato de cultivo para determinar la mineralización usando un kit de ensayo de Ca<sup>2+</sup> (kit de Sigma n.º 587), o tal como se describe en los ejemplos.

45 Cuando se dice que una célula es positiva para un marcador particular, esto significa que un experto concluirá la presencia de una señal diferenciada para ese marcador cuando lleve a cabo la medición apropiada. Cuando el método permite la evaluación cuantitativa del marcador, las células positivas pueden generar una señal que es al menos 2 veces superior a tal señal generada por células de control (por ejemplo, por células BMSC antes de aplicar el método tal como se describe en el presente documento, o por cualquier otra célula no osteogénica), por ejemplo, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o al menos 50 veces superior.

50 Tal como se explica, las BMSC presentes en, o aisladas al menos parcialmente a partir de, la muestra biológica se pone en contacto con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, con el fin de obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos.

55 Un experto aprecia que el plasma y suero humanos son composiciones biológicas complejas, que pueden comprender uno o más factores de crecimiento, citocinas u hormonas. Por tanto, el término "poner en contacto con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo" designa que dicho factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo se proporciona además del, es decir, de manera exógena o como complemento al, plasma o suero. Por tanto, las BMSC se ponen en contacto, además de con los factores de crecimiento que pueden estar comprendidos en el plasma o suero, con un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo proporcionado además del, es decir, de manera exógena o como complemento al, plasma o suero.

Dicho factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo puede ser uno que no está

presente en el plasma o suero. En tal caso, las BMSC se ponen en contacto con un (es decir, dicho) factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo con el que no estarían en contacto si se pusieran en contacto con el plasma o suero solo. Dicho factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo también puede ser uno que está presente en el plasma o suero. En tal caso, las BMSC se ponen en contacto con una cantidad o concentración mayor de un (es decir, dicho) factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo que si se pusieran en contacto con el plasma o suero solo.

El término “factor de crecimiento” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia biológicamente activa que influye en la proliferación, crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración de diversos tipos de células, y puede realizar cambios de desarrollo, morfológicos y funcionales en un organismo, ya sea sola o cuando se modula con otras sustancias. Un factor de crecimiento puede actuar normalmente mediante unión, como ligando, a un receptor (por ejemplo, receptor de superficie o intracelular) presente en células sensibles al factor de crecimiento. Un factor de crecimiento en el presente documento puede ser particularmente una entidad proteica que comprende una o más cadenas de polipéptido.

A modo de ejemplo y no de limitación, el término “factor de crecimiento” abarca los miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP), la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta), la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF), la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), la familia del factor de crecimiento relacionado con insulina (IGF), la familia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento hematopoyéticos (HeGF), el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), angiopoyetina, la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), glucocorticoides y similares.

Preferiblemente, el factor de crecimiento es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Dicho miembro de la familia de FGF puede elegirse del grupo que consiste en FGF ácido y básico, FGF-1 y FGF-2, respectivamente, int2 (FGF-3), hst (FGF-4), FGF-5, hst2 (FGF-6), factor de crecimiento de queratinocitos (FGF-7), factor de crecimiento inducido por andrógenos (FGF- 8); factor de activación de la glía (FGF-9) y cualquiera de FGF-10 a 23.

Preferiblemente, el factor de crecimiento de fibroblastos es FGF básico, también denominado FGF-b, FGF-2, BFGF, HBGH-2, prostatropina o precursor de factor de crecimiento de unión a heparina 2 (HBGF-2). Los inventores han constatado que FGF-b es particularmente eficaz en el método tal como se describe en el presente documento.

FGF-2 o una variante o derivado biológicamente activo del mismo puede ser el único factor de crecimiento, proporcionado de manera exógena a los posiblemente presentes en suero o plasma humano, con el que se ponen en contacto las BMSC en el método tal como se describe en el presente documento.

Las BMSC pueden ponerse en contacto con FGF-2 o una variante o derivado biológicamente activo del mismo y uno o más factores de crecimiento adicionales distintos de FGF-2. Preferiblemente, dichos uno o más factores de crecimiento adicionales no incluyen EGF.

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP). Dicho miembro de la familia de BMP puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-3b/GDF-10, BMP-6, BMP-7, BMP-8 y BMP-15.

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Dicho miembro de la familia de PDGF puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en neuropilina 2, PDGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PDGF-AB y PIGF.

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta). Dicho miembro de la familia de TGFbeta puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en TGF-beta-1, TGF-beta-2, TGF-beta-3, TGFbeta-4, GDF1 (factor de crecimiento/diferenciación 1), GDF-2, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-11, GDF-15, INHA (cadena alfa de inhibina), INHBA (cadena beta A de inhibina), INHBB (cadena beta B de inhibina), INHBC (cadena beta C de inhibina), INHBE (cadena beta E de inhibina), MIS (factor de inhibición mulleriano), y además miembros de la subfamilia de GDNF, incluyendo GDNF (factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía), NRTN (neurturina), PSPN (persefina).

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF). Dicho miembro de la familia de NGF puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), NGF (factor de crecimiento nervioso beta), NT3 (neurotrofina 3) y NT5.

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Dicho miembro de la familia de EGF puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en anfirregulina, betacelulina, EGF, epirregulina, HB-EGF (factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina), isoforma GGF2 de NRG1 (neurregulina 1), isoforma SMDF de NRG1, NRG1-alfa, NRG1-beta, TGFalfa, tomorregulina 1 y TMEFF2.

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia del factor de crecimiento relacionado con insulina (IGF).

Dicho miembro de la familia de IGF puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en insulina, IGF1A (factor de crecimiento de tipo insulina 1A), IGF1B, IGF2, INSL3 (de tipo insulina 3), INSL5, INSL6 y relaxina.

El factor de crecimiento puede ser un miembro de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Dicho miembro de la familia de VEGF puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en VEGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D.

El factor de crecimiento puede ser un glucocorticoide. Dicho glucocorticoide puede ser cualquiera elegido del grupo que consiste en dexametasona, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, triamcinolona, corticosterona, fluocinolona, cortisona, betametasona.

Preferiblemente, el factor de crecimiento usado en el método tal como se describe en el presente documento es un factor de crecimiento humano. Tal como se usa en el presente documento, el término "factor de crecimiento humano" se refiere a un factor de crecimiento sustancialmente igual que un factor de crecimiento humano que se produce de manera natural. Por ejemplo, cuando el factor de crecimiento es una entidad proteica, el/los péptido(s) o polipéptido(s) constituyente(s) del mismo puede(n) tener una secuencia de aminoácidos primaria idéntica a un factor de crecimiento humano que se produce de manera natural. Se prefiere el uso de factores de crecimiento humanos en el método tal como se describe en el presente documento, ya que se espera que tales factores de crecimiento provoquen un efecto deseable sobre la función celular.

El término "que se produce de manera natural" se usa para describir un objeto o entidad que puede encontrarse en la naturaleza como diferenciado de uno producido artificialmente por el ser humano. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido presente en un organismo, que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado de manera intencionada por el ser humano en el laboratorio, se produce de manera natural. Cuando se hace referencia a una entidad particular, por ejemplo, a un polipéptido o una proteína, el término abarca todas las formas y variantes del mismo que se producen en la naturaleza, por ejemplo, debido a una variación normal entre individuos. Por ejemplo, cuando se hace referencia a un factor de crecimiento proteico, el término "que se produce de manera natural" abarca factores de crecimiento que tienen diferencias en la secuencia primaria de su(s) péptido(s) o polipéptido(s) constituyente(s) debido a variación alélica normal entre individuos.

El método tal como se describe en el presente documento puede emplear una variante o derivado biológicamente activo de un factor de crecimiento. En el método tal como se describe en el presente documento, las variantes o derivados "biólogicamente activos" de un factor de crecimiento logran al menos aproximadamente el mismo grado de obtención de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC que el factor de crecimiento respectivo, cuando otras condiciones son sustancialmente iguales.

Cuando un factor de crecimiento ejerce sus efectos mediante la unión a su receptor relacionado, las variantes o derivados biológicamente activos de dicho factor de crecimiento pueden presentar afinidad y/o especificidad para unirse a ese receptor relacionado, que es al menos aproximadamente tan alta como la afinidad y/o especificidad del factor de crecimiento para unirse al mismo. Por ejemplo, dichas variantes o derivados biológicamente activos pueden tener afinidad y/o especificidad para unirse al receptor relacionado que es al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 90 % o incluso el 100 % o más de la afinidad y/o especificidad del factor de crecimiento respectivo para unirse a ese receptor. Un experto puede determinar fácilmente los parámetros anteriores de la unión usando ensayos *in vitro* o celulares que se conocen en sí mismos.

Cuando la actividad de un factor de crecimiento dado puede medirse fácilmente en un ensayo establecido, por ejemplo, un ensayo *in vitro* o celular (tal como, por ejemplo, medición de la actividad mitogénica en cultivo celular), las variantes o derivados biológicamente activos de dicho factor de crecimiento pueden presentar actividad en tales ensayos que es al menos aproximadamente tan alta como la actividad del factor de crecimiento. Por ejemplo, dichas variantes o derivados biológicamente activos pueden mostrar una actividad que es al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 90 % o incluso el 100 % o más de la actividad del factor de crecimiento respectivo.

Una "variante" de un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica (es decir, en gran medida pero no totalmente idéntica) a la secuencia de aminoácidos del polipéptido. En el presente documento, "sustancialmente idéntico" se refiere a idéntico en al menos el 85 %, por ejemplo, idéntico en al menos el 90 %, preferiblemente idéntico en al menos el 95 %, por ejemplo, idéntico en al menos el 99 %. Pueden resultar diferencias de secuencia a partir de la inserción (adición), delección y/o sustitución de uno de más aminoácidos.

La identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse alineando las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y puntuando, por un lado, el número de posiciones en la alineación en las que los polipéptidos contienen el mismo residuo de aminoácido y, por otro lado, el número de posiciones en la alineación en las que los dos polipéptidos difieren en cuanto a su secuencia. Los dos polipéptidos difieren en cuanto a su secuencia en una posición dada en la alineación cuando los polipéptidos contienen residuos de aminoácido diferentes en esa posición (sustitución de aminoácido), o cuando uno de los polipéptidos contiene un residuo de aminoácido en esa posición mientras que el otro no o viceversa (inserción/adición o delección de aminoácido). La identidad de secuencia se

calcula como la proporción (porcentaje) de posiciones en la alineación en las que los polipéptidos contienen el mismo residuo de aminoácido frente al número total de posiciones en la alineación.

Al menos algunas de las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de una variante y del polipéptido respectivo con el que la variante es sustancialmente idéntica pueden implicar sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, por ejemplo, el 100 % de dichas diferencias pueden ser sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, dichas sustituciones de aminoácido pueden ser conservadoras. El término “sustitución conservadora” tal como se usa en el presente documento designa que un residuo de aminoácido se ha sustituido por otro residuo de aminoácido biológicamente similar. Los ejemplos no limitativos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo de aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como entre arginina y lisina, entre ácidos glutámico y aspártico o entre glutamina y asparagina, y similares.

Un factor de crecimiento variante puede estar compuesto por uno o más péptidos o polipéptidos, al menos uno de los cuales es una variante tal como se definió anteriormente del péptido o polipéptido constituyente respectivo del factor de crecimiento.

Un “derivado” de un polipéptido puede derivatizarse mediante alteración química de uno o modo residuos de aminoácido y/o la adición de uno o más restos en uno o más residuos de aminoácido, por ejemplo, mediante glicosilación, fosforilación, acilación, acetilación, sulfatación, lipidación, alquilación, etc. Normalmente, menos del 50 %, por ejemplo, menos del 40 %, preferiblemente menos del 30 %, por ejemplo, menos del 20 %, más preferiblemente menos del 15 %, por ejemplo, menos del 10 % o menos del 5 %, por ejemplo, menos del 4 %, el 3 %, el 2 % o el 1 % de los aminoácidos en un polipéptido derivado pueden derivatizarse de ese modo. Un factor de crecimiento proteico derivado puede estar compuesto por uno o más péptidos o polipéptidos, al menos uno de los cuales puede estar derivatizado en al menos un residuo de aminoácido.

El factor de crecimiento usado en el método tal como se describe en el presente documento puede ser un factor de crecimiento de animal no humano, y particularmente un factor de crecimiento de mamífero no humano, o una variante o derivado biológicamente activo del mismo. Tal como se usa en el presente documento, los términos “factor de crecimiento de animal no humano” y “factor de crecimiento de mamífero no humano” se refieren a un factor de crecimiento sustancialmente igual que, respectivamente, un factor de crecimiento de animal no humano o de mamífero no humano que se produce de manera natural. Por ejemplo, cuando el factor de crecimiento es una entidad proteica, el/los péptido(s) o polipéptido(s) constituyente(s) del mismo puede(n) tener una secuencia de aminoácidos primaria idéntica a un factor de crecimiento de animal no humano o de mamífero no humano que se produce de manera natural. Un experto entenderá que los factores de crecimiento de animal no humano o de mamífero no humano pueden aplicarse en el método tal como se describe en el presente documento, sin embargo, en una menor medida que factores de crecimiento de animal humano, dado que estos últimos son del mismo origen que las células BMSC. En particular, los factores de crecimiento de animal no humano o de mamífero no humano pueden usarse si provocan el efecto deseado, por ejemplo, un efecto similar a un factor de crecimiento humano (análogo).

Preferiblemente, el factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo es recombinante, es decir, se produce por un organismo huésped mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante, que se ha introducido en el organismo huésped o un ancestro del mismo, y que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido. El término “molécula de ácido nucleico recombinante” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o ADNc) que está compuesta por segmentos unidos entre sí usando tecnología de ADN recombinante.

El uso de factores de crecimiento expresados de manera recombinante o variantes o derivados biológicamente activos de los mismos puede ser particularmente ventajoso. Por ejemplo, si el factor de crecimiento es un factor de crecimiento humano, puede prepararse más fácilmente a partir de una fuente recombinante que mediante aislamiento a partir de material biológico humano. Además, el aislamiento de factores de crecimiento a partir de material humano o de animal puede conllevar el riesgo de transmisión de agentes patógenos. Tal riesgo puede controlarse o eliminarse más eficazmente durante la expresión recombinante, particularmente si esta emplea sistemas de expresión celular que pueden inspeccionarse de manera rutinaria para determinar la presencia de agentes patógenos. Ventajosamente, tal riesgo puede reducirse adicionalmente si los sistemas de expresión celular son distantes de seres humanos, por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células vegetales o células de insecto, dado que será menos probable que los agentes patógenos posiblemente presentes en tales cultivos dañen a las células humanas o los seres humanos.

En la técnica se conocen sistemas de expresión adecuados, por ejemplo, vectores de expresión, tales como vectores de plásmido y virales; organismos huésped, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris*), células vegetales cultivadas (por ejemplo, de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*) y células de animales (por ejemplo, células de mamífero y células de insecto) y organismos multicelulares, tales como plantas o animales; y procedimientos para el aislamiento de las proteínas producidas de manera recombinante expresadas, tales como factores de

crecimiento o variantes o derivados biológicamente activos de los mismos. Se hace referencia a libros de texto bien conocidos, incluyendo, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed." (Sambrook *et al.*, 1989), Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987), la serie Methods in Enzymology (Academic Press), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed." (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987 y 1995); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu ed., Academic Press 1995). También hay factores de crecimiento recombinantes comercialmente disponibles de manera habitual (por ejemplo, de Sigma, Biological Industries, R&D Systems, Peprotech, etc.).

El término "plasma" es tal como se define convencionalmente. El plasma se obtiene habitualmente a partir de una muestra de sangre completa, que se proporciona o se pone en contacto con un anticoagulante, tal como heparina, citrato (por ejemplo, citrato de sodio o citrato ácido con dextrosa), oxalato o EDTA, después o poco después de extraer la muestra de sangre, para prevenir la coagulación. Posteriormente, se separan los componentes celulares de la muestra de sangre a partir del componente líquido (plasma) mediante una técnica apropiada, normalmente mediante centrifugación. Por tanto, el término "plasma" se refiere a una composición que no forma parte de un cuerpo humano o de animal.

El término "suero" es tal como se define convencionalmente. El suero puede obtenerse habitualmente a partir de una muestra de sangre completa dejando en primer lugar que tenga lugar la coagulación en la muestra y posteriormente separando el coágulo así formado y los componentes celulares de la muestra de sangre a partir del componente líquido (suero) mediante una técnica apropiada, normalmente mediante centrifugación. La coagulación puede facilitarse mediante un catalizador inerte, por ejemplo, perlas de vidrio o polvo. Ventajosamente, puede prepararse suero usando tubos de separación de suero (SST) conocidos en la técnica, que contienen el catalizador inerte para facilitar la coagulación y además incluyen un gel con densidad diseñada para posicionarse entre el componente líquido y el coágulo y los componentes celulares después de la centrifugación, simplificando de ese modo la separación. Alternativamente, puede obtenerse suero a partir de plasma retirando el anticoagulante y la fibrina. Por tanto, el término "suero" se refiere a una composición que no forma parte de un cuerpo humano o de animal.

El plasma o suero aislado puede usarse directamente en el método tal como se describe en el presente documento. También pueden almacenarse de manera apropiada para su uso posterior en el método tal como se describe en el presente documento. Normalmente, puede almacenarse plasma o suero durante periodos de tiempo más cortos, por ejemplo, hasta aproximadamente 1-2 semanas, a una temperatura superior a los puntos de congelación respectivos de plasma o suero, pero por debajo de la temperatura ambiental. Habitualmente, esta temperatura será de aproximadamente 15 °C o menos, preferiblemente de aproximadamente 10 °C o menos, más preferiblemente de aproximadamente 5 °C o menos, por ejemplo, aproximadamente 5 °C, 4 °C, 3 °C, 2 °C o aproximadamente 1 °C, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 °C o aproximadamente 4 °C. Alternativamente, puede almacenarse plasma o suero por debajo de sus puntos de congelación respectivos, es decir, mediante almacenamiento en estado congelado. Tal como resulta habitual en la técnica, las temperaturas ventajosas para el almacenamiento en estado congelado de plasma o suero pueden ser de aproximadamente -70 °C o menos, por ejemplo, aproximadamente -75 °C o menos o aproximadamente -80 °C o menos. Tales temperaturas pueden prevenir ventajosamente cualquier descongelación del plasma o suero almacenado, conservando de ese modo la calidad del mismo. Puede usarse almacenamiento en estado congelado independientemente del periodo de tiempo durante el que es necesario almacenar el plasma o suero, pero puede ser particularmente adecuado si se requiere almacenamiento más prolongado, por ejemplo, durante más de unos pocos días o durante más de 1-2 semanas.

Antes del almacenamiento o del uso, el plasma o suero aislado puede inactivarse por calor. En la técnica se usa inactivación por calor principalmente para retirar el complemento. Cuando el método tal como se describe en el presente documento emplea plasma o suero autólogo con respecto a las células cultivadas en presencia del mismo, puede no ser necesario inactivar por calor el plasma o suero. Cuando el plasma o suero es al menos parcialmente alogénico con respecto a las células cultivadas, puede resultar ventajoso inactivar por calor el plasma o suero. La inactivación por calor implica normalmente incubar el plasma o suero a 56 °C durante de 30 a 60 min, por ejemplo, 30 min, con mezclado constante, después de lo cual se permite que el plasma o suero se enfríe gradualmente hasta temperatura ambiental. Un experto conocerá cualquier modificación y requisito habituales del procedimiento anterior.

Opcionalmente, también puede esterilizarse el plasma o suero antes de su almacenamiento o uso. Los medios habituales de esterilización pueden implicar, por ejemplo, filtración a través de uno o más filtros con un tamaño de poro de menos de 1 µm, preferiblemente menos de 0,5 µm, por ejemplo, menos de 0,45 µm, 0,40 µm, 0,35 µm, 0,30 µm o 0,25 µm, más preferiblemente 0,2 µm o menor, por ejemplo, 0,15 µm o menor, 0,10 µm o menor.

El método tal como se describe en el presente documento emplea plasma o suero humano que es autólogo con respecto a las BMSC humanas que se ponen en contacto con el mismo. El término "autólogo" con referencia a plasma o suero designa que el plasma o suero se obtiene a partir del mismo sujeto que las BMSC que van a ponerse en contacto con dicho plasma o suero. Los presentes inventores han constatado que el uso de plasma o suero autólogo proporciona condiciones ventajosas para obtener osteoblastos y células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC. Además, cuando los osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos obtenidos van a administrarse al mismo sujeto humano del que se obtuvieron las BMSC, el uso de plasma o suero autólogo puede garantizar una aceptación óptima de las células por parte del sujeto y/o evitar la transmisión accidental de agentes

infecciosos, por ejemplo, a partir de otros sueros.

El método puede emplear plasma o suero humano que es "homólogo" con respecto a las BMSC humanas que se ponen en contacto con el mismo, es decir, obtenido a partir de uno o más sujetos humanos (combinados) distintos del sujeto del que se obtienen las BMSC.

- 5 El método puede emplear una mezcla de plasmas o sueros autólogos y homólogos tal como se definió anteriormente.

El término "poner en contacto" tal como se usa en el presente documento significa juntar, ya sea directa o indirectamente, una o más moléculas, componentes o materiales entre sí, facilitando de ese modo las interacciones entre los mismos. Normalmente, un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y plasma o suero humano, pueden ponerse en contacto con BMSC por medio de su inclusión en los medios en los que se cultivan las BMSC.

Puede incluirse plasma o suero humano en los medios a una proporción (volumen de suero / volumen de medio) de entre el 0,5 % y el 30 %, preferiblemente entre el 1 % y el 20 %, más preferiblemente entre el 2 % y el 10 %, tal como entre el 5 % y el 10 %, por ejemplo, a aproximadamente el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 % o el 10 %. Los inventores han constatado sorprendentemente que plasma o suero humano en una cantidad relativamente baja, por ejemplo, a aproximadamente el 5 % en volumen o menos, por ejemplo entre el 1 % y el 5 %, entre el 2 % y el 5 %, entre el 3 % y el 5 % o entre el 4 % y el 5 % puede ser suficiente para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC. Esto permite disminuir ventajosamente el volumen de plasma o suero que es necesario obtener a partir de un donante (por ejemplo, a partir de un paciente en caso de plasma o suero autólogo) con el fin de cultivar las BMSC.

Puede incluirse un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo en los medios a una concentración suficiente, en combinación con plasma o suero humano incluido en los mismos medios en una de las proporciones anteriormente indicadas, para inducir la diferenciación de BMSC para dar osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, obteniendo de ese modo estos últimos. Normalmente, el factor de crecimiento, por ejemplo, FGF-2, o una variante o derivado biológicamente activo del mismo puede incluirse en los medios a una concentración de entre 0,01 y 100 ng/ml, preferiblemente entre 0,1 y 50 ng/ml, por ejemplo, entre 0,5 y 30 ng/ml, más preferiblemente entre 1 y 20 ng/ml, tal como entre 1 y 10 ng/ml, por ejemplo, preferiblemente menos de 5 ng/ml, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 ng/ml. Cuando un factor de crecimiento es un glucocorticoide, por ejemplo, dexametasona, tal concentración puede ser preferiblemente de entre  $10^{-9}$  y  $10^{-5}$  mMol. Se entenderá que las concentraciones anteriores se refieren al factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo que se proporciona además del, es decir, de manera exógena o como complemento al, plasma o suero (véase en otra parte en la memoria descriptiva).

Preferiblemente, se incluye FGF-2 o una variante o derivado biológicamente activo del mismo a una concentración inferior a 20 ng/ml, preferiblemente inferior a 10 ng/ml, aún más preferiblemente inferior a 5 ng/ml, por ejemplo, a 1, 2, 3, 4 o 5 ng/ml. Los inventores plantean la hipótesis de que tal concentración inferior de FGF-2 puede preferirse particularmente para lograr la diferenciación.

Las concentraciones anteriores pueden referirse a la concentración total de dicho factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo en el medio, es decir, a la suma de concentración del factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo a la que contribuye el plasma o suero y proporcionada además del mismo.

Las concentraciones anteriores pueden referirse a la concentración de dicho factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo tal como se proporciona además de lo que ya contribuye el plasma o suero. De manera evidente, si normalmente no está presente el factor de crecimiento que va a añadirse (no es detectable) en el plasma o suero, la concentración total y añadida del factor de crecimiento será (sustancialmente) la misma.

Las BMSC pueden ponerse en contacto de manera continua con plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, durante un periodo de tiempo suficiente para inducir la diferenciación de BMSC para dar osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, obteniendo de ese modo estos últimos. El término "poner en contacto de manera continua" puede significar que dichos componentes se incluyen en todos los medios, en los que las BMSC, la progenie de las mismas y/o células derivadas a partir de las mismas se cultivan durante dicho periodo de tiempo. Normalmente, puede suministrarse plasma o suero humano y el factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo a concentraciones respectivas sustancialmente idénticas en todos los medios (recientes) usados para cultivar las BMSC durante dicho periodo de tiempo.

Por tanto, normalmente,  $t=0$  días corresponderá al punto de tiempo en el que se siembran por primera vez las BMSC aisladas en presencia de una hormona de crecimiento y suero o plasma humano (cultivo primario).

El periodo de tiempo de exposición anterior puede ser de al menos 5 días, preferiblemente al menos 10 días, más

preferiblemente al menos 15 días e incluso más preferiblemente al menos 18 días, por ejemplo, al menos 20 días. Por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de entre 5 y 30 días, preferiblemente entre 10 y 30 días, más preferiblemente entre 15 y 25 días e incluso más preferiblemente de aproximadamente 20 días, por ejemplo, 20, 21, 22 días más o menos. Por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de entre 12 y 16 días, por ejemplo, 12, 13, 14, 15 o 16 días, de manera particularmente preferible de aproximadamente 14 días. Preferiblemente, el periodo de tiempo puede ser de entre 18 y 24 días, por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 días, de manera particularmente preferible de aproximadamente 21 días.

El periodo de tiempo anterior puede implicar uno o más pases de las células, tal como, 1, 2, 3, 4 o más pases, y preferiblemente implicará 1, 2 o 3 pases, incluso más preferiblemente 1 o 2 pases, por ejemplo, 1 pase. El número de pases se refiere al número de veces que se ha retirado una población celular a partir de un recipiente de cultivo y se ha sometido a subcultivo, es decir, un pase. Tal como entenderá un experto, las células que se hacen crecer en cultivo se someten normalmente a pase cuando han alcanzado un grado dado de confluencia. Por ejemplo, si las células están presentes como monocapas, pueden someterse a pase cuando su confluencia es del 60 % o más, por ejemplo, el 70 % o más, el 80 % o más o el 90 % o más o incluso el 100 %. Normalmente pueden someterse las células a pase a una razón de entre 1/8 y 2/3, tal como de 1/4 a 1/2. Esta razón expresa la proporción de células que se introducen en el mismo volumen de medio después del pase. Si las células están presentes en colonias, pueden someterse a pase, por ejemplo, después de un número dado de días en cultivo, por ejemplo, a entre 4 y 20 días, por ejemplo, entre 8 y 15 días, más preferiblemente entre 10 y 15 días, por ejemplo, a 10, 11, 12, 13 o 14 días. Por ejemplo, pueden someterse a pase una vez que el número promedio de células por colonia es de 20 o más, o 50 o más, o 100 o más, 500 o más.

Preferiblemente, cuando el tiempo total de puesta en contacto de las células con un factor de crecimiento, especialmente FGF-2, y suero o plasma humano es, preferiblemente, de entre 12 y 16 días, no es necesario someter a pase las BMSC sembradas en placa primarias, sino que pueden recogerse directamente. Cuando el tiempo total de puesta en contacto de las BMSC con un factor de crecimiento, especialmente FGF-2, y suero o plasma humano es, preferiblemente, de entre aproximadamente 18 y aproximadamente 24 días, puede realizarse un pase del cultivo primario preferiblemente entre 8 y 17 días, aún más preferiblemente entre 12 y 16 días, por ejemplo, lo más preferiblemente en el día 14.

Los inventores observaron que puede ser preferible poner en contacto BMSC con un factor de crecimiento, esp. con FGF-2, y suero o plasma humano durante aproximadamente 12-16 días, ya que al final de este periodo las células muestran un fenotipo lo más parecido a osteoblastos. Después de eso, las células parecen experimentar una desdiferenciación al menos parcial, tal como se demuestra mediante una morfología variable, ALP inferior y niveles superiores de factores de diferenciación. No obstante, el periodo anterior puede prolongarse ventajosamente hasta aproximadamente de 18 a 24 días con el fin de obtener más células de linaje osteogénico resultantes, sin una desdiferenciación aún sustancial de las células. Aunque puede ser posible una prolongación adicional de estos periodos, implicando posiblemente pases adicionales, los inventores plantean la hipótesis de que tal presencia prolongada de un factor de crecimiento, esp. FGF-2, puede provocar una desdiferenciación adicional, no deseada, de las células. Por tanto, se prefieren los periodos de tiempo más cortos mencionados anteriormente.

En el método tal como se describe en el presente documento puede usarse cualquier medio que puede soportar el crecimiento de fibroblastos en cultivo celular. Las formulaciones de medios que soportarán el crecimiento de fibroblastos incluyen, pero no se limitan a, medio esencial mínimo (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo modificado alfa (alfa-MEM), medio esencial basal (BME), BGJb, mezcla de nutrientes F-12 (Ham) y similares, que están comercialmente disponibles (por ejemplo, Invitrogen, Carlsbad, California). Un medio particularmente adecuado para su uso en el método tal como se describe en el presente documento puede ser alfa-MEM, IMDM, X-Vivo-10, medio libre de suero X-Vivo 20 (calidad clínica), disponible de Invitrogen o Cambrex (Nueva Jersey). Tales medios de cultivo líquidos contienen componentes necesarios para el desarrollo de células de mamífero, que se conocen en sí mismos. Por ejemplo, estos componentes incluyen sales inorgánicas (en particular Na, K, Mg, Ca y posiblemente Cu, Fe y Zn), aminoácidos, vitaminas y fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa), etc. Normalmente, puede ser necesario añadir el 5-20 % de un componente de suero, por ejemplo, suero de ternero fetal (FCS), a los medios anteriores con el fin de soportar el crecimiento de fibroblastos. Sin embargo, puede usarse un medio libre de suero definido si se identificaron los factores en FCS necesarios para el crecimiento de fibroblastos y se proporcionan en el medio de crecimiento. Ventajosamente, en el método tal como se describe en el presente documento, este componente de suero puede estar representado por el plasma o suero humano con el que se ponen en contacto las BMSC, de tal manera que no se añade ningún componente de suero adicional al medio. Los medios pueden contener además uno o más compuestos de interés, incluyendo, pero sin limitarse a, bicarbonato de sodio, componentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, penicilina, estreptomycin y/o anfotericina, etc.

Preferiblemente, las BMSC no se ponen en contacto con ningún componente obtenido a partir de un animal no humano, en particular mamífero no humano. Si los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos obtenidos a partir de BMSC tienen que administrarse a un sujeto humano, la ausencia de contacto entre las BMSC y los componentes obtenidos a partir de animales no humanos garantiza una aceptación óptima de las células por parte del sujeto y evita la transmisión accidental de agentes infecciosos al mismo. Esta última preocupación se vuelve cada vez más importante debido a la aparición de enfermedades priónicas, por ejemplo,

BSE, que pueden transmitirse de animales a seres humanos.

Las BMSC pueden no ponerse en contacto con ningún componente de suero derivado de un animal no humano. Por ejemplo, los medios usados para cultivar y diferenciar BMSC en el método tal como se describe en el presente documento pueden no contener ningún componente de suero a partir de un animal no humano. Tal como se indicó anteriormente, la adición, por ejemplo, de FCS a los medios de cultivo celular resulta habitual en la técnica para sustentar el crecimiento de cultivo celular. Por tanto, los medios usados para cultivar y diferenciar BMSC en el método tal como se describe en el presente documento pueden no incluir ningún FCS u otros componentes de suero de animal no humano. Los inventores constataron que cuando las BMSC no se ponen en contacto con ningún componente de suero a partir de un animal no humano, esto genera condiciones ventajosas para obtener osteoblastos y células con fenotipo de osteoblastos a partir de las BMSC.

El medio en el que pueden cultivarse las BMSC no contiene ningún componente antibiótico o antimicótico. La ausencia de estos componentes permite distinguir más fácilmente una posible contaminación del cultivo. Si los osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos obtenidos a partir de las BMSC tienen que administrarse a un sujeto humano, esto evita introducir microorganismos patógenos en el sujeto.

El medio puede no contener componentes que se usan habitualmente en la técnica para inducir diferenciación osteogénica, tales como un glucocorticoide (por ejemplo, dexametasona), 2-fosfato de ácido ascórbico y/o beta-glicerolfosfato.

Por tanto, teniendo en cuenta las características preferidas anteriores, el método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o una población celular que comprende los mismos (y opcionalmente que comprende además otros tipos de células, por ejemplo, células endoteliales o progenitores) *in vitro* o *ex vivo* puede comprender las etapas:

(a) recuperar células a partir de una muestra biológica de un sujeto humano que comprende BMSC, preferiblemente una muestra de médula ósea;

(b) opcionalmente, aislar células mononucleadas a partir de las células recuperadas en (a), por ejemplo, usando centrifugación con gradiente de densidad adecuada u otros métodos;

(c) añadir células de (a) o, preferiblemente, (b) a un medio que comprende plasma o suero humano y un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y cultivar la mezcla de células-medio, tal como para permitir la adherencia de células a una superficie de sustrato, por ejemplo, superficie de vidrio o plástico, por ejemplo, de un recipiente de cultivo;

(d) retirar la materia no adherente y cultivar adicionalmente las células adherentes en el medio tal como se define en (c), tal como para permitir obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células de tipo osteoblastos, o una población celular que comprende los mismos.

Preferiblemente, el método puede comprender además recoger las células o población celular obtenida en (d), preferiblemente a entre 12 y 16 días, por ejemplo, en el día 14.

Preferiblemente, el método puede comprender someter a pase las células o población celular de (d) entre aproximadamente los días 12 y 16 y recoger las células o población celular así cultivada entre aproximadamente los días 18 y 24.

Preferiblemente, el recipiente de cultivo puede proporcionar una superficie de plástico para permitir la adherencia celular. La superficie puede ser una superficie de vidrio. La superficie puede estar recubierta con un material apropiado favorable para el crecimiento de las células, por ejemplo, Matrigel(R), laminina o colágeno.

El término "aislar" con referencia a un componente particular designa separar ese componente a partir de al menos otro componente de una composición a partir de la cual está aislándose el primer componente. Por tanto, aislar BMSC implica separar BMSC a partir de al menos otro componente de una composición que comprende BMSC. Aislar BMSC también implica aumentar la proporción de BMSC en una composición con respecto a otros componentes, en particular con respecto a otros componentes celulares, en comparación con una composición a partir de la cual están aislándose las BMSC. Por ejemplo, aislar BMSC a partir de una muestra biológica designa separar BMSC a partir de otros componentes, en particular componentes celulares, de la muestra.

El término "aislado" tal como se usa en el presente documento con respecto a cualquier población celular también implica que tal población celular no forma parte de un cuerpo humano o de animal.

Las células de (a) o (b) pueden sembrarse en placa para su cultivo a entre 1 y  $1 \times 10^6$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo, entre 1 y  $5 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, entre 1 y  $1,5 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo, entre  $1 \times 10^3$  y  $5 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, preferiblemente entre  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo, entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, o entre  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, o entre  $5 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^4$  o  $1 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>.

Preferiblemente, dicha retirada de materia no adherente en (d) se lleva a cabo después de entre 1 y 8 días, por ejemplo, de 2 a 6 días, preferiblemente entre 1 y 4 días, más preferiblemente a aproximadamente 4 días, por ejemplo, a 4 días, e incluso más preferiblemente en el día 1, 2 o 3, aún más preferiblemente en el día 1 o 2.

Además, dicho cultivo adicional de células adherentes en (d) puede realizarse durante entre 5 y 30 días, por ejemplo, durante aproximadamente de 10 a 25 días, más preferiblemente de aproximadamente 18 a 22 días, aún más preferiblemente entre 18 y 24 días, por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 días.

Dicho cultivo adicional de células adherentes en (d) puede implicar uno o más de uno, por ejemplo, 2 o 3 pases de las células, preferiblemente 1 o 2, más preferiblemente 1 pase. Preferiblemente, puede implicar un pase a aproximadamente 10 - 18 días, por ejemplo, a aproximadamente de 12 a 16 días, por ejemplo, a 14 días, tras la etapa (c).

Preferiblemente, tal pase puede ser a un tiempo constante con el fin de normalizar el procedimiento de cultivo, por ejemplo, a aproximadamente 14 días, por ejemplo, a 14 días de cultivo.

Preferiblemente, las células pueden volver a sembrarse en placa, después de someterse a pase, para su cultivo adicional en (d) a entre 1 y  $1 \times 10^6$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo, a entre  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, a entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, preferiblemente entre  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^4$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo aproximadamente  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  o  $5 \times 10^4$  células/mm<sup>2</sup>, más preferiblemente entre  $8 \times 10^3$  y  $2 \times 10^4$  células/mm<sup>2</sup>, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/mm<sup>2</sup>.

Las células pueden volver a sembrarse en placa a una confluencia de al menos el 5 % o al menos el 10 %, por ejemplo, al menos el 30 % y no más del 90 % o no más del 80 % o no más del 50 %, y preferiblemente entre el 30 y el 80 %.

La etapa de someter a pase incluye el tratamiento de las células con un quelante iónico bivalente (por ejemplo, EDTA o EGTA) y/o tratamiento con tripsina. Preferiblemente, la etapa de someter a pase incluye el tratamiento de las células con un quelante iónico bivalente (por ejemplo, EDTA o EGTA) y no con tripsina. Esto resulta ventajoso, ya que la tripsina puede derivarse a partir de fuentes animales y, por tanto, puede conllevar el riesgo de introducir agentes patógenos.

Características preferidas adicionales de las etapas de procedimiento (a) a (d) son tal como se describieron anteriormente.

Tal como se explicó anteriormente, los métodos tal como se describen en el presente documento proporcionan osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como poblaciones celulares que comprenden los mismos, que muestran características superiores, tales como, por ejemplo, proliferación rápida, mineralización rápida y potencial sustancialmente ausente de diferenciarse hacia adipocitos o condrocitos. Los inventores también han constatado que estas células y poblaciones celulares funcionan de manera superior cuando se implantan en tejido óseo de un paciente. Dadas tales características sorprendentes de las células y poblaciones celulares obtenidas mediante los métodos tal como se describen en el presente documento, estas células y poblaciones son en sí mismas una valiosa contribución a la técnica. Además, tal como se explica adicionalmente en la siguiente sección y se corrobora mediante los datos experimentales, los métodos tal como se describen en el presente documento proporcionan nuevos tipos de células osteogénicas, tal como se demuestra mediante nuevas e inesperadas combinaciones de marcadores en estas células, así como nuevas poblaciones celulares particularmente adecuadas para terapia ósea.

Por tanto, un experto apreciará que cuando se tratan BMSC según los métodos tal como se describen en el presente documento para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, se obtiene una población celular compuesta principalmente por osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos. Sin embargo, debido, por ejemplo, a fluctuaciones en las respuestas celulares, la población celular puede comprender una proporción minoritaria de células que no son osteoprogenitores, osteoblastos ni células con fenotipo de osteoblastos.

Por consiguiente, la memoria descriptiva proporciona osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos que pueden obtenerse o se obtienen directamente usando los métodos tal como se describieron anteriormente.

La memoria descriptiva proporciona una población celular aislada que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, pudiendo obtenerse u obteniéndose directamente dicha población usando los métodos tal como se describieron anteriormente. Por ejemplo, tal población celular puede comprender al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, preferiblemente al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, por ejemplo, el 85 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, el 95 % o incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos.

Preferiblemente, la población celular puede comprender uno o más tipos de células distintos de dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos. Por ejemplo, la población puede comprender

menos del 50 %, por ejemplo, menos del 40 %, preferiblemente menos del 30 %, por ejemplo, menos del 20 %, más preferiblemente menos del 15 % o menos del 10 %, por ejemplo, menos del 7 %, menos del 5 % o menos del 2 % de tipos de células distintos de dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos.

- El fenotipo real de las células restantes en la mezcla de células puede resultar importante, dado que la rápida proliferación y diferenciación de osteoblastos puede depender al menos en parte de la producción endógena de sustancias que afectan a los osteoblastos, por ejemplo, factores de crecimiento y/o factores de diferenciación, por las células restantes en la mezcla. Con respecto a esto, puede resultar interesante que se sabe que el desarrollo y remodelado óseos dependen al menos en parte de interacciones complejas entre osteoblastos formadores de hueso y otras células presentes dentro del microentorno óseo, particularmente células endoteliales, que pueden ser miembros importantes de una compleja red de comunicación interactiva en el hueso. La colaboración celular entre células osteoprogenitoras humanas y células endoteliales se ha demostrado anteriormente (Guillotin *et al.* 2004. *Cell Physiol Biochem* 14(4-6): 325-32). Además, la presencia de células endoteliales puede dar lugar a formaciones *in situ* de vasos o capilares que irrigarán el tejido óseo recién formado. Los presentes inventores han encontrado que tales células restantes en la presente mezcla de células pueden ser de tipo endotelial y, en cuanto a marcadores específicos, pueden ser positivas para el marcador CD133 y/o CD34, y posiblemente negativas para el marcador CD45; y en particular y preferiblemente, positivas para al menos uno cualquiera, dos o la totalidad de vWF, VEGF y CD133; y opcionalmente también positivas para CD34.

Por consiguiente, la población celular puede comprender osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos y células endoteliales o progenitores.

- Además, la memoria descriptiva se refiere a osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos que pueden obtenerse o se obtienen directamente usando los métodos tal como se describieron anteriormente, para su uso en terapia y/o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos.

- La memoria descriptiva se refiere a una población celular aislada que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, pudiendo obtenerse u obteniéndose directamente dicha población usando los métodos tal como se describieron anteriormente, para su uso en terapia y/o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos.

- Los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos que pueden obtenerse o se obtienen directamente mediante los métodos tal como se describen en el presente documento, o una población celular aislada que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, pudiendo obtenerse u obteniéndose directamente dicha población usando los métodos tal como se describieron anteriormente, pueden administrarse a un sitio de lesión ósea, por ejemplo, cirugía o fractura.

- La memoria descriptiva proporciona un método para prevenir y/o tratar una enfermedad ósea, que comprende la administración de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos que pueden obtenerse o se obtienen directamente mediante los métodos tal como se describen en el presente documento, o de una población celular aislada que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, pudiendo obtenerse u obteniéndose directamente dicha población usando los métodos tal como se describieron anteriormente, a un sujeto que necesita tal tratamiento.

La memoria descriptiva se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad ósea, que comprende:

- (a) obtener una muestra biológica que comprende BMSC a partir de un sujeto que necesita tal tratamiento;
- (b) obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, u obtener una población celular aislada que comprende osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, a partir de las BMSC *in vitro* o *ex vivo* según los métodos tal como se describen en el presente documento; y
- (c) administrar los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos así obtenidos o dicha población celular que comprende los mismos al sujeto.

- Preferiblemente, la etapa (b) puede implicar métodos tal como se describen en el presente documento que usan plasma o suero humano autólogo, y más preferiblemente carente de componentes de animal no humano, por ejemplo, componentes de suero. Tal condición puede denominarse en el presente documento condiciones "autólogas puras" de obtención de los osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describe en el presente documento.

- La memoria descriptiva se refiere a una composición farmacéutica que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos que pueden obtenerse o se obtienen directamente mediante los métodos tal como se describen en el presente documento, o que comprende una población celular aislada que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, pudiendo obtenerse u obteniéndose directamente dicha población usando los métodos tal como se describieron anteriormente, y adecuada para su administración a un sitio de lesión ósea.

## 2. Células y poblaciones de la invención

Tal como se explica en la sección de sumario, un estudio adicional de las células y poblaciones celulares resultantes de los métodos tal como se describen en el presente documento permitió a los inventores definir nuevos tipos de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como poblaciones celulares específicas que comprenden los mismos, que destacan las propiedades ventajosas observadas con el uso en terapia ósea.

En particular, la memoria descriptiva proporciona osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos (en el presente documento, "células OOP-1"), preferiblemente de origen humano, caracterizadas porque expresan conjuntamente (1) al menos un marcador de osteoblastos elegido de fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, propéptido amino-terminal de procógeno tipo 1 (P1NP) y sialoproteína ósea (BSP) con (2) al menos un marcador de células madre / osteoprogenitores inmaduros elegido de CD63 y CD166.

Por tanto, en (a) a (u), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1) pueden expresar conjuntamente: (a) al menos ALP y CD63, (b) al menos P1NP y CD63, (c) al menos BSP y CD63, (d) al menos ALP, P1NP y CD63, (e) al menos ALP, BSP y CD63, (f) al menos P1NP, BSP y CD63, (g) al menos ALP, P1NP, BSP y CD63, (h) al menos ALP y CD166, (i) al menos P1NP y CD166, (j) al menos BSP y CD166, (k) al menos ALP, P1NP y CD166, (l) al menos ALP, BSP y CD166, (m) al menos P1NP, BSP y CD166, (n) al menos ALP, P1NP, BSP y CD166, (o) al menos ALP, CD63 y CD166, (p) al menos P1NP, CD63 y CD166, (q) al menos BSP, CD63 y CD166, (r) al menos ALP, P1NP, CD63 y CD166, (s) al menos ALP, BSP, CD63 y CD166, (t) al menos P1NP, BSP, CD63 y CD166, o (u) al menos ALP, P1NP, BSP, CD63 y CD166.

En (v), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (u), pueden ser negativas para osteocalcina (OCN).

En (w), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (v), pueden ser positivas para CD34.

En (x), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (v), pueden ser negativas para CD34.

En (y), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (x), también pueden ser positivas para uno cualquiera, dos o los tres de CD90, CD73 y CD105.

En (z), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (y), pueden ser negativas para uno cualquiera, dos o los tres de CD45, CD19 y CD14.

En (ab), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (z), pueden ser negativas para CD133.

En (ac), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (ab), pueden mostrar evidencias de capacidad para mineralizar el entorno externo, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio, cuando se exponen a medio osteogénico (Jaiswal *et al.* 1997. *J Cell Biochem* 64: 295-312). La cantidad de mineralización después de 1 semana (medida mediante la proporción total de superficie teñida con rojo de alizarina en medio de mineralización, tal como se conoce en la técnica) puede ser de al menos el 40 %, preferiblemente al menos el 45 %, más preferiblemente al menos el 50 %, incluso más preferiblemente al menos el 55 %, y lo más preferiblemente al menos el 60 %, tal como al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % o incluso el 100 %. Ventajosamente, la mineralización por estas células es mucho más rápida que por BMSC clásicas, en las que los niveles anteriores sólo pueden lograrse después de 3 a 4 semanas en medio osteogénico.

De manera interesante, el tiempo de duplicación de los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos anteriores en el medio de mineralización puede ser de entre 1 y 3 días, por ejemplo, aproximadamente 2 días. Esto es considerablemente más rápido que el tiempo de duplicación de osteoblastos clásicos en estas condiciones, que es de aproximadamente 6-7 días.

En (ad), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-1), en particular tal como se definen en cualquiera de (a) a (ac), pueden no diferenciarse sustancialmente hacia uno cualquiera de, y preferiblemente hacia ninguno de, células de linaje adipocítico (por ejemplo, adipocitos) o linaje condrocítico (por ejemplo, condrocitos). La ausencia de diferenciación hacia estos linajes celulares puede someterse a prueba usando condiciones de inducción de diferenciación convencionales establecidas en la técnica (por ejemplo, véase Pittenger *et al.* 1999. *Science* 284: 143-7) y métodos de ensayo (por ejemplo, cuando se inducen, los adipocitos se tiñen normalmente con aceite rojo O que muestra acumulación de lípidos; los condrocitos se tiñen normalmente con azul alcian o safranina O).

La ausencia sustancial de propensión hacia diferenciación adipogénica o condrogénica puede significar normalmente que menos del 50 % de las células sometidas a prueba, por ejemplo, células OOP-1 sometidas a prueba, preferiblemente menos del 40 %, por ejemplo, menos del 30 %, más preferiblemente menos del 20 %, incluso más preferiblemente menos del 10 %, y todavía más preferiblemente menos del 5 %, por ejemplo, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, o menos del 1 % o incluso menos de 0,1 %, mostrarán signos de diferenciación adipogénica o condrogénica cuando se apliquen a la prueba respectiva.

Además, la memoria descriptiva proporciona células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (en el presente documento, "células OOP-2"), preferiblemente de origen humano, caracterizadas porque expresan conjuntamente (1) al menos un marcador de osteoblastos elegido de fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, propéptido amino-terminal de procólágeno tipo 1 (P1NP) y sialoproteína ósea (BSP) con (2) el marcador de progenitor hematopoyético / endotelial CD34.

Por tanto, en (a') a (g'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2) pueden expresar conjuntamente: (a') al menos ALP y CD34, (b') al menos P1NP y CD34, (c') al menos BSP y CD34, (d') al menos ALP, P1NP y CD34, (e') al menos ALP, BSP y CD34, (f) al menos P1NP, BSP y CD34, o (g') al menos ALP, P1NP, BSP y CD34.

En (h'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (g'), pueden ser negativas para osteocalcina (OCN).

En (i'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (g'), pueden ser positivas para CD63.

En (j'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (i'), pueden ser positivas para CD166.

En (k'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (j'), también pueden ser positivas uno cualquiera, dos o los tres de CD90, CD73 y CD105.

En (l'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (k'), pueden ser negativas para uno cualquiera, dos o los tres de CD45, CD19 y CD14.

En (m'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (l'), pueden ser negativas para CD133.

En (n'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (m'), pueden mostrar evidencias de capacidad para mineralizar el entorno externo, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio, cuando se exponen a medio osteogénico (Jaiswal *et al.* 1997). La cantidad de mineralización después de 1 semana (medida mediante la proporción total de superficie teñida con rojo de alizarina en medio de mineralización, tal como se conoce en la técnica) puede ser de al menos el 40 %, preferiblemente al menos el 45 %, más preferiblemente al menos el 50 %, incluso más preferiblemente al menos el 55 %, y lo más preferiblemente al menos el 60 %, tal como al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % o incluso el 100 %. Ventajosamente, la mineralización por estas células es mucho más rápida que por BMSC clásicas, en las que los niveles anteriores sólo pueden lograrse después de 3 a 4 semanas en medio osteogénico.

De manera interesante, el tiempo de duplicación de los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos anteriores tal como se describe en el presente documento en el medio de mineralización puede ser de entre 1 y 3 días, por ejemplo, aproximadamente 2 días. Esto es considerablemente más rápido que el tiempo de duplicación de osteoblastos clásicos en estas condiciones, que es de aproximadamente 6-7 días.

En (o'), las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos (OOP-2), en particular tal como se definen en cualquiera de (a') a (n'), pueden no diferenciarse sustancialmente hacia uno cualquiera, y preferiblemente hacia ninguno, de células de linaje adipocítico (por ejemplo, adipocitos) o linaje condrocítico (por ejemplo, condrocitos).

Cuando se dice que una célula es positiva para un marcador particular, esto significa que un experto concluirá la presencia o evidencia de una señal diferenciada, por ejemplo, detectable por anticuerpo o detección posible mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, para ese marcador cuando se lleve a cabo la medición apropiada, en comparación con controles adecuados. Cuando el método permite la evaluación cuantitativa del marcador, las células positivas pueden generar en promedio una señal que es significativamente diferente del control, por ejemplo, pero sin limitación, al menos 1,5 veces superior a tal señal generada por células de control, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces superior o incluso superior.

La expresión de marcadores específicos de células puede detectarse usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica, tal como citometría de flujo, inmunocitoquímica o adsorción por afinidad, análisis por inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, etc., o mediante cualquier técnica adecuada de medición de la cantidad del ARNm de marcador, por ejemplo, transferencia de tipo Northern, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, etc.

Los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos anteriores, cuando se dice que son positivos para ALP, pueden ser positivos para ALP tal como se determina mediante FACS. Las células positivas para ALP pueden contener al menos 300 mU de ALP por 1 mg de proteína celular total, preferiblemente al menos 400 mU de ALP por 1 mg de proteína celular total, más preferiblemente al menos 450 mU de ALP por 1 mg de proteína celular total, por ejemplo, al menos 500 mU, al menos 600 mU, al menos 700 mU, al menos 800 mU, al menos 900 mU o al menos 1 U de ALP por 1 mg de proteína celular total. Por ejemplo, la actividad de ALP puede ser de entre 400 y 1500 mU por 1 mg de proteína celular total, por ejemplo, entre 450 y 1500 mU, entre 500 y 1500 mU, entre 550 y 1500 mU o entre 600 y 1500 mU por 1 mg de proteína celular total, y puede ser normalmente de entre 400 y 800 mU por 1 mg de proteína celular total, por ejemplo, aproximadamente 500 mU, aproximadamente 550 mU, aproximadamente 600 mU, aproximadamente 650 mU, aproximadamente 700 mU, aproximadamente 750 mU o aproximadamente 800 mU por 1 mg de celular proteína. La actividad de ALP anterior puede estar presente en combinación con una o más de otras características (a) a (h) tal como se definió anteriormente.

Los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describen en el presente documento, cuando se dice que son positivos para P1NP, pueden producir el propéptido amino-terminal de procólágeno tipo 1 (P1NP) en los medios de cultivo en las siguientes cantidades de (P1NP se expresa en ng por ml de medio por  $10^6$  células): al menos 0,4 ng, preferiblemente al menos 0,5, más preferiblemente al menos 1,0, incluso más preferiblemente al menos 1,2 y lo más preferiblemente al menos 1,5, por ejemplo, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8 o al menos 2. Por ejemplo, P1NP puede ser de entre 0,4 y 3,5, por ejemplo entre 0,5 y 3,5, entre 0,8 y 3,5, entre 1,0 y 3,5, entre 1,2 y 3,5, entre 1,5 y 3,5, entre 1,8 y 3,5, entre 2,0 y 3,5, entre 2,2 y 3,5, entre 2,5 y 3,5, entre 2,8 y 3,5 o entre 3,0 y 3,5; por ejemplo, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9 o aproximadamente 2,0. La producción de P1NP anterior puede estar presente en combinación con una o más de otras características (a) a (h) tal como se definió anteriormente.

Los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describen en el presente documento, cuando se dice que son positivos para BSP, pueden contener una cantidad de moderada a alta de sialoproteína ósea. Cuando se mide mediante métodos cuantitativos (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa), la señal generada en osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describen en el presente documento puede ser al menos 2 veces superior a la generada por células de control (por ejemplo, cualquier otra célula no osteogénica), y puede ser, preferiblemente, al menos 4 veces, al menos 10 veces, y más preferiblemente al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o al menos 50 veces superior. La producción de sialoproteína ósea anterior puede estar presente en combinación con una o más de otras características (a) a (h) tal como se definió anteriormente.

Generalmente, los marcadores de CD y otros mencionados anteriormente se conocen en la técnica y un experto dispone de maneras y reactivos para su detección en células.

En un aspecto adicional, la invención abarca poblaciones celulares que comprenden las células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos anteriores, por ejemplo, que comprenden los tipos de células OOP-1 y/u OOP-2 tal como anteriormente. Preferiblemente, tal población celular puede comprender al menos el 80 %, e incluso más preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % o incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de los tipos de células OOP-1 y/u OOP-2.

Por ejemplo, de la fracción total de células osteoprogenitoras, de osteoblastos o con fenotipo de osteoblastos, las células OOP-1 pueden constituir al menos el 5 %, o al menos el 10 %, o al menos el 20 %, o al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 % o incluso el 100 %, mientras que las OOP-2 pueden constituir sustancialmente las células restantes de dicha fracción.

En realizaciones preferidas, la población celular puede comprender menos del 20 % y más preferiblemente menos del 10 %, por ejemplo, menos del 7 %, menos del 5 % o menos del 2 % de tipos de células distintos de los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos anteriores, esp. los tipos de células OOP-1 y/u OOP-2.

Dicha población celular comprende células endoteliales o progenitores de las mismas, que expresan los tres de factor de von Willebrand (vWF), VEGF y CD133.

Dichas células endoteliales tal como anteriormente expresan además CD34.

Por consiguiente, la población celular comprende (A) osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, especialmente las células OOP-1 y/u OOP-2 tal como se definió anteriormente, y comprende además (B) células endoteliales o progenitores tal como se definió anteriormente.

En una realización, las células osteogénicas en (A) y las células endoteliales en (B) constituyen en conjunto al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 % y lo más preferiblemente al menos el 96 %, por ejemplo, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % o incluso el 100 % de las células que forman dicha población celular.

- 5 De esta fracción (A+B), las células osteogénicas en (A) constituyen preferiblemente al menos el 80 % y preferiblemente al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o incluso al menos el 99 %, en ejemplos preferidos, entre el 90 % y el 99 %, entre el 90 % y el 95 % o entre el 95 % y el 99 %.

- 10 Por consiguiente, de esta fracción (A+B), las células endoteliales en (B) constituyen preferiblemente menos del 20 % y preferiblemente menos del 10 %, por ejemplo, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o incluso menos del 1 %, en ejemplos preferidos, entre el 1 % y el 10 %, entre el 5 % y el 10 % o entre el 1 % y el 5 %.

- 15 Se apreciará que los tipos de células y poblaciones celulares dados a conocer en el presente documento pueden obtenerse ventajosamente usando los métodos de diferenciación tal como se describen en el presente documento. Tales métodos pueden complementarse opcionalmente mediante separación o aislamiento adicionales de tipos de células particulares (por ejemplo, usando FACS basándose en el perfil de marcadores), y opcionalmente combinación de tales tipos de células para formar poblaciones deseadas.

- 20 No obstante, debe entenderse que la invención define los tipos de células y poblaciones mediante sus características estructurales y funcionales, es decir, en sí mismas, y no se limita a ninguna manera de preparación de las mismas. A modo de ejemplo, y no de limitación, pueden obtenerse osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se definieron anteriormente usando otras condiciones de diferenciación de células para dar linaje osteogénico, y seleccionando, por ejemplo, mediante FACS, células que tienen los perfiles de marcadores particulares tal como se definen en el presente documento. De manera similar, las células endoteliales también pueden generarse aplicando, por ejemplo, factores angiogénicos, o a partir de células hematopoyéticas, seguido por selección de células con el perfil de marcadores deseado.

- 25 En aspectos adicionales, la invención también se refiere a poblaciones particulares que tienen perfiles de marcadores particulares.

- 30 En determinadas realizaciones, la invención se refiere a una población celular ("POP 1") en la que entre el 80 % y el 100 %, más preferiblemente entre el 90 % y el 100 %, incluso más preferiblemente entre el 95 % y el 100 %, por ejemplo, hasta entre el 90 % y el 100 % o entre el 90 % y el 98 %, o entre el 95 % y el 98 %, son positivas para CD105 y, preferiblemente, también negativas para CD45, negativas para CD19, negativas para CD14, positivas para CD90 y positivas para CD73.

- 35 En determinadas realizaciones, la invención se refiere además a una población 2 ("POP 2") que tiene las características de POP 1, y además en la que entre el 70 % y el 100 %, preferiblemente entre el 80 % y el 100 %, más preferiblemente entre el 90 % y el 100 %, incluso más preferiblemente entre el 95 % y el 100 % de células positivas para CD105 también son positivas para ALP y/o positivas para P1NP y/o positivas para BSP.

En aspectos relacionados, la invención se refiere a las células o poblaciones celulares anteriormente definidas para su uso en terapia y/o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos.

- 40 En un aspecto, las células o poblaciones celulares anteriormente definidas pueden administrarse a un sitio de lesión ósea, por ejemplo, cirugía o fractura.

La memoria descriptiva proporciona un método para prevenir y/o tratar una enfermedad ósea, que comprende la administración de las células o poblaciones celulares anteriormente definidas a un sujeto que necesita tal tratamiento.

- 45 Además, la memoria descriptiva se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad ósea, que comprende:

- (a) obtener las células o poblaciones celulares definidas anteriormente, y
- (b) administrar las células o poblaciones celulares así obtenidas al sujeto.

- 50 La etapa (a) puede implicar métodos tal como se describen en el presente documento que usan plasma o suero humano autólogo, y más preferiblemente carente de componentes de animal no humano, por ejemplo, componentes de suero. Tal condición puede denominarse en el presente documento condiciones "autólogas puras" de obtención de los osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células y poblaciones celulares tal como se definió anteriormente, y adecuada para su administración a un sitio de lesión ósea.

### 3. Aspectos adicionales relacionados con células y poblaciones de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos y poblaciones que comprenden los mismos, tal como se obtienen o pueden obtenerse mediante los métodos descritos en la sección 1 anterior; así como a osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, y poblaciones celulares que comprenden los mismos, en sí mismos, tal como se describen en la sección 2 anterior.

La memoria descriptiva se refiere a una disposición que comprende un instrumento quirúrgico para la administración de una composición a un sitio de lesión ósea y que comprende además la composición farmacéutica que comprende las células o poblaciones celulares de la invención tal como se definió anteriormente, en la que la disposición está adaptada para la administración de la composición farmacéutica al sitio de lesión ósea. Por ejemplo, un instrumento quirúrgico adecuado puede inyectar una composición líquida que comprende células tal como se describe en el presente documento en el sitio de lesión ósea.

Según los aspectos anteriores, las células o poblaciones celulares de la invención pueden introducirse en el hueso de un sujeto humano en el sitio de cirugía o fractura. La introducción de osteoblastos en el hueso es útil en el tratamiento de fracturas óseas y trastornos relacionados con los huesos.

Tal como se indica, preferiblemente, los osteoblastos se obtienen a partir de BMSC del sujeto en el que pueden introducirse los osteoblastos diferenciados. Sin embargo, también pueden aislarse BMSC a partir de un organismo de la misma especie o una diferente del sujeto. El sujeto puede ser cualquier organismo que tiene tejido óseo. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, lo más preferiblemente el sujeto es humano.

Las células BMSC o las células o poblaciones celulares de la invención pueden transformarse de manera estable o transitoria con un ácido nucleico de interés antes de la introducción en la lesión ósea, por ejemplo, un sitio de cirugía o fractura, del sujeto. Las secuencias de ácido nucleico de interés incluyen, pero no se limitan a, las que codifican para productos génicos que potencian el crecimiento, la diferenciación y/o mineralización de osteoblastos. Por ejemplo, puede introducirse un sistema de expresión para BMP-4 en las BMSC de una manera estable o transitoria con el fin de tratar fracturas que no se consolidan u osteoporosis. Los expertos en la técnica conocen métodos de transformación de BMSC y osteoblastos, al igual que métodos para introducir osteoblastos en un hueso en el sitio de lesión ósea, por ejemplo, cirugía o fractura.

Las células o poblaciones celulares de la invención pueden introducirse solas o en mezcla con componentes adicionales útiles en la reparación de heridas y defectos óseos. Tales composiciones incluyen, pero no se limitan a, proteínas morfogenéticas óseas, hidroxiapatita/partículas de fosfato de tricalcio (HA/TCP), gelatina, polímero láctico, polímero láctico-glicólico, ácido hialurónico, quitosano, poli-L-lisina y colágeno. Por ejemplo, pueden combinarse osteoblastos diferenciados a partir de células estromales adiposas con matriz ósea desmineralizada (DBM) u otras matrices para hacer que el material compuesto sea osteogénico (formación ósea por sí mismo) así como osteoinductivo. Métodos similares usando células de médula ósea autólogas con DBM alogénica han proporcionado buenos resultados (Connolly *et al.* 1995. *Clin Orthop* 313: 8-18).

Cuando se introducen células o poblaciones celulares de la invención solas o en mezcla con componentes adicionales, la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede contener componentes adicionales que garanticen la viabilidad de tales células, por ejemplo, osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos en las mismas. En particular, las células o poblaciones celulares pueden suministrarse en forma de una composición farmacéutica, que comprende un excipiente isotónico preparado en condiciones suficientemente estériles para su administración a seres humanos. Para principios generales en formulación medicinal, se remite al lector a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, de G. Morstyn y W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister y P. Law, Churchill Livingstone, 2000. La elección del excipiente celular y cualquier elemento adjunto de la composición se adaptará según el dispositivo usado para la administración. Por ejemplo, la composición puede comprender un sistema de tampón adecuado para el pH adecuado, por ejemplo, pH casi neutro (por ejemplo, sistema de tampón de fosfato o carbonato), y puede comprender sal suficiente como para garantizar condiciones isosmóticas para las células o poblaciones celulares, es decir, que previenen el estrés osmótico. Por ejemplo, una disolución adecuada para estos fines puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS) tal como se conoce en la técnica. Además, la composición puede comprender una proteína portadora, por ejemplo, albúmina, que puede aumentar la viabilidad de las células. Preferiblemente, para garantizar la exclusión de material de animal no humano, la albúmina puede ser de origen humano (por ejemplo, aislada a partir de material humano o producida de manera recombinante). Generalmente, se conocen concentraciones adecuadas de albúmina.

Las células o poblaciones celulares pueden administrarse de una manera que permite que se injerten o migren al sitio de tejido previsto y reconstituyan o regeneren la zona de funcionalidad deficiente. La administración de la composición dependerá del sitio musculoesquelético que esté reparándose. Por ejemplo, puede facilitarse la osteogénesis en concordancia con una intervención quirúrgica para remodelar tejido o insertar una incisión, o un dispositivo protésico tal como una prótesis de cadera. En otras circunstancias, no se requerirá cirugía invasiva, y la composición puede administrarse mediante inyección o (para la reparación de la columna vertebral) uso de un

endoscopio que puede guiarse.

Si se desea, la preparación celular puede incluir además, o administrarse conjuntamente con, un factor bioactivo complementario tal como una proteína morfogenética ósea, tal como BMP-2 o BMP-4, o cualquier otro factor de crecimiento. Otros posibles componentes adjuntos incluyen fuentes inorgánicas de calcio o fosfato adecuadas para

ayudar a la regeneración ósea (documento WO 00/07639). Si se desea, la preparación celular puede administrarse en una matriz de portador o material para proporcionar una regeneración tisular mejorada. Por ejemplo, el material puede ser un material cerámico granular o un biopolímero tal como gelatina, colágeno, osteonectina, fibrinógeno u osteocalcina. Pueden sintetizarse matrices porosas según técnicas convencionales (por ejemplo, Mikos *et al.*, Biomaterials 14: 323, 1993; Mikos *et al.*, Polymer 35: 1068, 1994; Cook *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 35: 513, 1997).

En una realización, la preparación celular tal como se definió anteriormente puede administrarse en una forma de composición líquida.

En otra realización, las células o poblaciones celulares de la invención pueden transferirse a y/o cultivarse en un sustrato adecuado para proporcionar implantes. El sustrato en el que pueden aplicarse y cultivarse las células puede ser un metal, tal como titanio, aleación de cobalto/cromo o acero inoxidable, una superficie bioactiva tal como un fosfato de calcio, superficies de polímero tales como polietileno, y similares. Aunque se prefiere menos, también puede usarse como sustrato un material síliceo tal como materiales vitrocerámicos. Lo más preferido son metales, tales como titanio, y fosfatos de calcio, aunque el fosfato de calcio no es un componente indispensable del sustrato. El sustrato puede ser poroso o no poroso.

Por ejemplo, las células que han proliferado o que están diferenciándose en placas de cultivo, pueden transferirse a soportes sólidos tridimensionales con el fin de hacer que se multipliquen y/o continúen el proceso de diferenciación incubando el soporte sólido en un medio de nutriente líquido, si es necesario. Pueden transferirse las células a un soporte sólido tridimensional, por ejemplo, impregnando dicho soporte con una suspensión líquida que contiene dichas células. Los soportes impregnados obtenidos de esta manera pueden implantarse en un sujeto humano. Tales soportes impregnados también pueden volver a cultivarse sumergiéndolos en un medio de cultivo líquido antes de implantarse finalmente.

El soporte sólido tridimensional debe ser biocompatible para permitir implantarlo en un ser humano. Puede ser de cualquier forma adecuada tal como un cilindro, una esfera, una placa o una pieza de forma arbitraria. De los materiales adecuados para el soporte sólido tridimensional biocompatible, puede mencionarse particularmente carbonato de calcio y, en particular, aragonito, específicamente en forma de esqueleto de coral, materiales cerámicos porosos basados en alúmina, en zircona, en fosfato de tricalcio y/o hidroxiapatita, imitación de esqueleto de coral obtenida mediante intercambio hidrotérmico que permite transformar el carbonato de calcio en hidroxiapatita, o bien materiales vitrocerámicos de apatita-wollastonita, materiales vitrocerámicos bioactivos tales como vidrios Bioglass(TM).

## Ejemplos

Ejemplo 1: método para diferenciar BMSC para dar osteoblastos

Se extraen 30 ml de médula ósea a partir de la cresta ilíaca de un sujeto humano y se extraen 100 ml de sangre a partir del mismo sujeto.

Se prepara plasma a partir de la sangre tal como resulta habitual en la técnica. Más específicamente, se centrifuga sangre suministrada con el anticoagulante heparina a 2000 rpm, 15 min a 20 °C, para retirar los componentes celulares, se recupera el plasma, se inactiva por calor a 56 °C durante 50 min, se aclara mediante centrifugación a 3000 rpm, 15 min, se filtra a través de un filtro de esterilización de 0,22 µm, se divide en alícuotas y se almacena a -80 °C.

Se recuperan células mononucleadas a partir de la muestra de médula ósea usando centrifugación con gradiente de Ficoll, en particular usando Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia) y centrifugación a 1400 rpm (450 g), 30 min a 20 °C.

Se recuperan las células, se lavan en PBS y se depositan en matraces de cultivo con medio que contiene IMDM (calidad clínica), medio libre de suero (Cambrex), plasma autólogo al 20 % aislado anteriormente y FGF-b 1 ng/ml (Peprotech), a 10x10<sup>6</sup> células por matraz de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (Corning). A los 4 días de cultivo, se cambia la totalidad del medio, retirando de ese modo el material no adherente. En los días 7 y 11, se cambia la mitad del medio. En el día 12, 13 o 14, se lavan las células con PBS, se desprenden usando EDTA y se someten a pase para el cultivo adicional en el mismo medio, a 1x10<sup>6</sup> células por matraz de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Entre el día 21 y 24 de cultivo, se recogen las células tal como anteriormente. Para los fines de trasplante, se resuspenden las células en PBS estéril que contiene albúmina humana al 5 %. Se usa una porción de las células para caracterización fenotípica (ejemplo 2).

Ejemplo 2: caracterización fenotípica de osteoblastos y células de tipo osteoblasto obtenidos mediante el método del ejemplo 1.

Después de 21 días de cultivo en la unidad de terapia celular, se recogen las células para la inyección al paciente y para su caracterización. Se preparan  $20 \times 10^6$  células para la inyección. Las células restantes se usan para la caracterización fenotípica:

#### 1. Medición semicuantitativa de sialoproteína ósea mediante RT-PCR

- 5 Se someten de 1 a  $2 \times 10^6$  células a lisis en un tampón de extracción de ARN (tampón RLT, kit RNeasy, Qiagen) y se almacenan a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que se procesan. Se extrae ARN total a partir de los lisados usando el kit RNeasy de Qiagen. Se sometió un  $\mu\text{g}$  de ARN total a transcripción inversa usando hexámeros al azar y transcriptasa inversa. Se somete el producto de ADNc de primera cadena a reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) usando pares de cebadores de oligonucleótidos para sialoproteína ósea (BSP) y un gen de mantenimiento,  $\beta$ -actina. Se analizan los productos de RT-PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y se visualizan para una medición semicuantitativa de sialoproteína ósea (BSP) (0 = sin expresión, + = expresión débil; ++ = expresión moderada, +++ = expresión alta).
- 10

Resultado: Expresión de sialoproteína ósea (n=6). La expresión de BSP es ++ en promedio (intervalo desde + hasta ++)

- 15 Dosificación de péptido amino-terminal de procógeno tipo 1 (P1NP) total en medios cultivados

En el día 21, se almacenan 2 ml de los medios cultivados a  $-20^\circ\text{C}$  para la dosificación de P1NP. Se mide el nivel de P1NP mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (Roche, Elecsys, 1010/2010 modular analytics).

Resultado: P1NP = 21-90 (intervalo) ng/ml de medios cultivados (n=6)

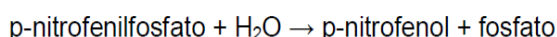
Medición de la actividad de fosfatasa alcalina (APA)

- 20 Se usan  $5 \times 10^5$ - $10^6$  células para las mediciones de la actividad de fosfatasa alcalina.

Se lavan las células con 2 ml de PBS y se someten a sonicación en agua destilada. Tras la centrifugación se usan los sobrenadantes para la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina y el contenido en proteína.

- 25 Se prepararon los reactivos de la siguiente manera. Preparación de tampón de dietanolamina: 1 M, pH 9,8. Se diluye disolución madre (D 8885 - Sigma-Aldrich) 10 veces en agua y se ajusta a pH 9,8 con HCl. Preparación de disolución de reacción: disolución de dietanolamina 1 M, pH 9,8 y  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM (M 8266 Sigma-Aldrich). Preparación de sustrato de pNPP: disolución 10 mM de la sal de sodio de 4-nitrofenilfosfato hexahidratada (N 4645, Sigma-Aldrich) en la disolución de reacción.

La APA cataliza la siguiente reacción:



- 30 Se incuba la disolución de sustrato a  $37^\circ\text{C}$ ; 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante + 1000  $\mu\text{l}$  de sustrato. Se transfiere a un tubo de espectrofotometría a  $37^\circ\text{C}$ ; después de 2 minutos se realiza la lectura a 405 nm, se incuba durante otros 2 minutos y vuelve a realizarse la lectura, y se realiza una última lectura después de otros 2 minutos. Se calcula la media de los deltas (diferenciales) de absorbancia y se expresa el delta de absorbancia/min.

- 35 Cálculo: 1 U = la cantidad de enzima para producir un micromol de p-nitrofenol por minuto. Coeficiente de absorción molar de p-nitrofenol = 18450, mmolar = 18,45  $\mu\text{molar}$  = 0,01845. Para una muestra de 20  $\mu\text{l}$ :  $\text{APA (U/l, o mU/ml)} = \text{deltaA} \times 1020 / 0,01845 \times 20$ .

Cantidad de proteínas.

- 40 Se prepara una disolución de Coomassie de la siguiente manera: 100 mg de azul de Coomassie (Merck 1.15444) + 50 ml de etanol al 95 % + 100 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85 % +  $\text{H}_2\text{O}$  hasta 1 l, se homogeniza y se filtra. Se prepara una disolución que contiene albúmina bovina 1 mg/ml de la siguiente manera: de 10 a 50  $\mu\text{l}$  de BSA (1 mg/ml) +  $\text{H}_2\text{O}$  hasta 1 ml.

Se preparan muestras de la siguiente manera: 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante + 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  o 500  $\mu\text{l}$  de sobrenadante + 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se añaden 2 ml de la disolución de Coomassie y se agita con vórtex. Después de 5 min, se mide la DO a 595 nm. Se expresa la proteína en mg/ml.

- 45 Para cada muestra se notifica el nivel de APA con respecto a la concentración total de proteína (mU/mg de proteína).

Resultado: fosfatasa alcalina (n=10). APA:  $693 \pm 126$  mU/mg de proteína (media  $\pm$  EEM); intervalo: 274-1472 mU/mg de proteína

Capacidad de mineralización

En el día 14 del cultivo, se siembra una placa de 6 pocillos para el estudio de la capacidad de mineralización.

En el día 21 se cambian los medios de esta placa por MEM + FCS al 15 % + ácido ascórbico 50 µg/ml + dexametasona  $10^{-8}$  M + β-glicerofosfato 10 mM (EMEM, BioWhittaker BE12-136F; FCS Invitrogen; ácido ascórbico Sigma A-4403; dexametasona Sigma D-4902; β-glicerofosfato Sigma G-9891).

- 5 Visualización de la mineralización mediante una coloración con alizarina en el día 28: se fijan las células en formaldehído al 4 % en PBS, se aclaran con PBS, se incuban con rojo de alizarina al 2 %, pH 4,1 para la coloración.

Se evalúa la mineralización como porcentaje de la superficie de placa de cultivo total (n=10).

Ejemplos específicos de las mediciones anteriores en pacientes

| pacientes | Médula (ml) | MNC x $10^6$ después de Ficoll | MNC x $10^6$ en cultivo | Cultivo primario recogido (día 7) x $10^6$ | Cultivo secundario recogido (día 21) x $10^6$ | Células inyectadas (X $10^6$ ) | APA (mU/mg de proteína) | BSP | P1NP, ng/ml | Mineralización (% de la superficie total) |
|-----------|-------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----|-------------|-------------------------------------------|
| N.º 1     | 27          | 44,3                           | 44,3                    | 17,1                                       | 70,8                                          | 20                             | 640                     | ++  | 43          | >65%                                      |
| N.º 2     | 32          | 60                             | 50                      | 12                                         | 28                                            | 20                             | 773                     | ++  | 82          | >65%                                      |
| N.º 3     | 31          | 15,6                           | 15,6                    | 11,5                                       | 122                                           | 20                             | 274                     | +   | 26          | >65%                                      |

- 10 En experimentos adicionales, se observó incluso una capacidad de mineralización de hasta el 75 % o más a 1 semana (véase la figura 2).

Determinación del perfil de marcadores

Se realizó un seguimiento de la expresión de marcadores tal como anteriormente y/o mediante tinción con anticuerpos y citometría de flujo de las células. Estos experimentos proporcionaron la siguiente imagen de expresión de marcadores en las células recogidas.

- 15 La población total era de >95 % (o incluso >99 %) CD45-, CD19-, CD14-, CD90+, CD73+, CD105+. El 90-95 % de todas las células pudieron caracterizarse como fenotipo osteoprogenitor o de osteoblasto. De estas, el 100 % eran ALP+, el 50-100 % eran CD166+ y el 65-100 % eran CD63+. Estas células también eran positivas para P1NP y BSP. Del 35 % al 65 % de estas células eran CD34+. (En la población total, esto correspondía al 80-98 % de células ALP+, el 40-98 % de células CD166+ y el 60-98 % de células CD63+).

- 20 Además, la población total contenía células endoteliales o progenitores de las mismas en una cantidad estimada del 5-10 % de las células totales. De estas células, el 50-75 % eran positivas para vWF (factor de von Willebrand), el 25-50 % eran VEGF+ y el 25-50 % eran CD133+. Aproximadamente el 50 % de las células expresaban conjuntamente CD133 y VEGF. Todas estas células eran CD34+. (En la población total, esto representaba el 1 - 4 % de células positivas para CD133, el 1 - 4 % de células positivas para VEGF y aproximadamente el 5 - 8 % de células positivas para vWF).

- 25 Una determinación del perfil de marcadores adicional permitió a los inventores definir los presentes tipos de células tal como también se detalla en otras partes en esta divulgación.

Ejemplo 3: trasplante de las células del ejemplo 2 a pacientes.

- 30 En un ejemplo, a un paciente con osteonecrosis de estadio 2 de la cabeza del fémur se le trató mediante implantación de osteoblastos en la zona necrótica de la cadera, según un método anteriormente descrito por Gangji *et al.* 2005 (Expert Opin Biol Ther 5(4): 437-42; J Bone Joint Surg Am 87, sup. 1:106-12).

- 35 En el nivel inicial, el paciente tenía una puntuación de dolor (escala analógica visual, VAS) de 38 mm (de una puntuación total de 100) y puntuaciones funcionales de la cadera de WOMAC de 43 (de una puntuación total de 96) y de Lesquesne de 11 (de una puntuación total de 24).

El paciente tratado mediante implantación de osteoblastos demostró una notable mejoría en los síntomas de las articulaciones después de 3 y 6 meses: la puntuación de VAS disminuyó hasta 0 a los 3 y 6 meses (figura 1A), WOMAC disminuyó hasta 0 a los 3 meses y a los 6 meses (figura 1B) y el índice de Lequesne disminuyó desde 11 en el nivel inicial hasta 0 a los 3 y a los 6 meses.

- 40 En otro ejemplo, a un paciente con osteonecrosis de estadio 2 de la cabeza del fémur se le trató mediante implantación de osteoblastos en la zona necrótica de la cadera, según el mismo método. En el nivel inicial, el paciente tenía una puntuación de dolor analógica visual de 6 mm y una puntuación funcional de Lesquesne de 3.

El paciente tratado mediante implantación de osteoblastos demostró una notable mejoría en los síntomas de las articulaciones después de 3 y 6 meses: la puntuación de VAS disminuyó hasta 0 a los 3 y 6 meses y el índice de

Lequesne disminuyó hasta 0 a los 3 meses y a los 6 meses. Además, la otra cadera, en la que no se implantaron osteoblastos, evolucionó hasta estadio de osteonecrosis final, requiriendo prótesis de cadera total.

## REIVINDICACIONES

1. Una población celular obtenida mediante cultivo *in vitro* o *ex vivo* a partir de células madre de médula ósea humanas que comprende:
  - (a) osteoprogenitores, osteoblastos o células osteoblásticas humanos caracterizados porque (1) expresan fosfatasa alcalina (ALP) del tipo hueso-hígado-riñón, (2) el 65-100 % expresan CD63 y el 50-100 % expresan CD166, y (3) no se diferencian hacia células de linaje adipocítico ni linaje condrocítico, y
  - (b) células endoteliales o progenitores de las mismas que son positivas para CD34 y de las que del 50 % al 75 % expresan factor de von Willebrand (vWF), del 25 % al 50 % expresan VEGF y del 25 % al 50 % expresan CD133,
- en la que dicha población celular comprende al menos el 80 % de osteoprogenitores, osteoblastos o células osteoblásticas humanos tal como se definió en (a), y menos del 20 % de células endoteliales o progenitores de las mismas tal como se definió en (b).
2. La población celular según la reivindicación 1, en la que dicha población celular comprende al menos el 90 % o al menos el 95 % de osteoprogenitores, osteoblastos o células osteoblásticas humanos tal como se definió en (a).
3. La población celular según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha población celular comprende menos del 10 % o menos del 5 % de células endoteliales o progenitores de las mismas tal como se definió en (b).
4. La población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los osteoprogenitores, osteoblastos o células osteoblásticas humanos expresan ALP del tipo hueso-hígado-riñón, péptido amino-terminal de procólágeno tipo 1 (P1NP) y sialoproteína ósea (BSP).
5. La población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los osteoprogenitores, osteoblastos o células osteoblásticas humanos son positivos para CD90, CD73 y CD105; y negativos para CD45, CD19 y CD14.
6. La población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los osteoprogenitores, osteoblastos o células osteoblásticas humanos pueden mineralizar el entorno externo, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio, cuando se exponen a medio osteogénico.
7. La población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en terapia.
8. Uso de la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.
9. La población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.
10. El uso según la reivindicación 8, o la población celular para su uso según la reivindicación 9, en los que la población celular va a administrarse a un sitio de lesión ósea.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 10, o la población celular para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en los que la población celular se obtiene a partir de células madre de médula ósea humanas de un sujeto al que se le va a administrar dicha población celular.
12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 10, o la población celular para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en los que la población celular se obtiene a partir de células madre de médula ósea humanas de un sujeto diferente del sujeto al que se le va a administrar dicha población celular.
13. Una composición farmacéutica que comprende la población celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, que es adecuada para la administración de la población celular a un sitio de lesión ósea.
15. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 13 o 14, que comprende además una matriz de portador o sustrato.
16. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.
17. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 16, en la que la composición farmacéutica es líquida y en la que la composición farmacéutica está contenida dentro de un instrumento quirúrgico que

puede inyectar la composición farmacéutica líquida en el sitio de lesión ósea.

FIGURA 1

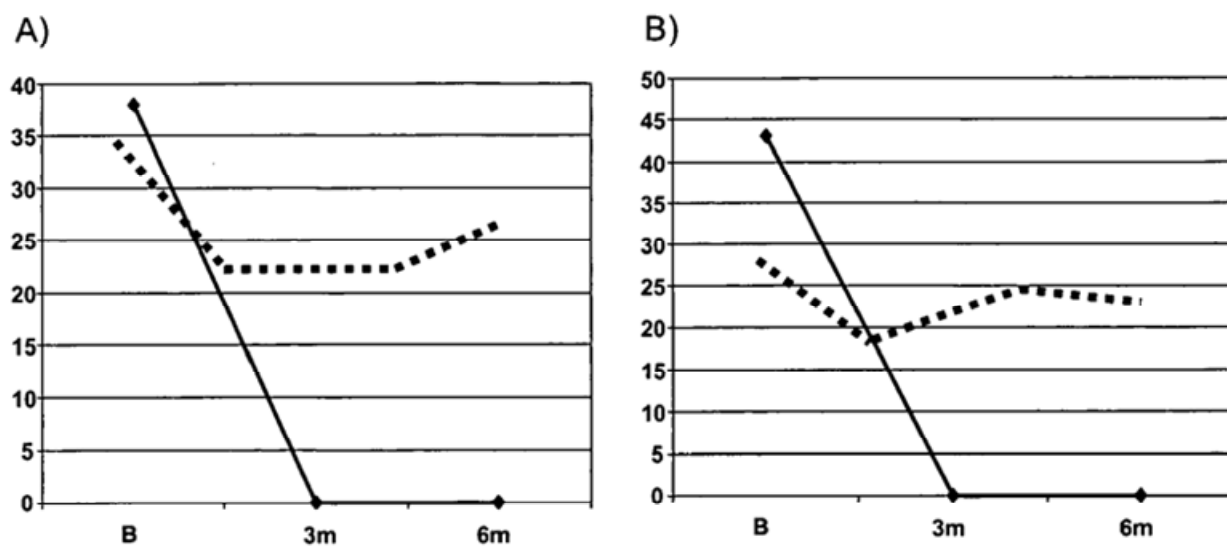


FIGURA 2

