



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 082**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98960593 .6**

96 Fecha de presentación : **01.12.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1036163**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

54

Título: **Diferenciación de células estromales adiposas en osteoblastos y sus usos.**

30

Prioridad: **02.12.1997 US 67334 P**

73

Titular/es: **ARTECEL SCIENCES, Inc.**
Hq Global Workplaces
4819 Emperor Boulevard
Durham, North Carolina 27703, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2011

72

Inventor/es: **Halvorsen, Yuan-Di, C.**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2011

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 351 082 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**CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para la diferenciación de células estromales de tejido adiposo en osteoblastos, y a los usos de éstos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La osteoporosis es responsable de aproximadamente 1,5 millones de fracturas cada año en los Estados Unidos, de las que aproximadamente 300.000 son fracturas de cadera. Cincuenta a 75% de los pacientes con fracturas de cadera son incapaces de vivir independientemente, lo que resulta en unos costes médicos incrementados. La

10 osteoporosis se caracteriza por una pérdida de la densidad ósea mayor de la normal al envejecer la población. Esta enfermedad ocurre con una alta frecuencia (>30% de mujeres con edad superior a 60) en las culturas Occidental y Asiática, y su predominio está aumentando al aumentar la longevidad. Aunque se desconoce la causa exacta de estos trastornos de reparación ósea, está claro que el proceso dinámico de la

15 remodelación ósea está alterado en un proceso caracterizado por una disminución de la actividad osteoblástica (células productoras de hueso) y un incremento de la actividad osteoclástica (células que degradan el hueso) (Parfitt (1992) Triangle 31:99-110; Parfitt (1992) En Bone, volumen 1, B.K. Hall, ed. Teleford Press and CRC Press, Boca Raton, FL, p. 351-429).

20 El uso de injertos de hueso es una práctica convencional en ortopedia, neurocirugía y odontología, así como en la cirugía plástica/de reconstrucción y la frecuencia de esta utilización ha ido creciendo en las últimas dos décadas. Con la excepción de la sangre, el hueso es el tejido más frecuentemente transplantado con una estimación de 500.000 injertos de hueso usados en EEUU anualmente. Los usos

25 ortopédicos comunes de los injertos de hueso incluyen la gestión de no uniones y fractura de hueso largo aguda, reconstrucción de articulaciones y para facilitar la fusión de segmentos vertebrales de movimiento para tratar varios trastornos espinales (Lane (1987) Ortho Clin N Amer 18:213-225).

Actualmente, el material de injerto más aceptable clínicamente es el hueso

30 autólogo. Los denominados autoinjertos se obtienen habitualmente de un sitio operativo secundario. Existen cuestiones significativas asociadas con los autoinjertos. Éstas incluyen ausencia de un suministro adecuado para heridas o defectos grandes. En los individuos ancianos con osteoporosis u osteopenia el uso de un autoinjerto es

problemático. La morbilidad secundaria asociada con la operación de recogida es alta. Estas complicaciones incluyen infecciones, inestabilidad pélvica (el hueso se recoge habitualmente de la cresta ilíaca), hematoma y fractura pélvica (Laurie et al. (1984) *Plas Rec Surg* 73:933-938; Summers et al. (1989) *J Bone Joint Surg* 71B:677-680; Younger et al. (1989) *J Orthop Trauma*. 3:192-195; Kurz et al. (1989) *Spine* 14:1324-1331). Además, el dolor crónico en el sitio de la donación es la segunda complicación más frecuentemente indicada (Turner et al. (1992) *JAMA* 268:907-911). Finalmente, la capacidad de moldear el autoinjerto al sitio del defecto/herida está limitada debido a la naturaleza rígida del material.

Las investigaciones recientes se han centrado en el uso de varias matrices, bien inorgánicas tales como hidroxiapatito (Flatley et al. (1983) *Clin Orthop Rel Res* 179:246-252; Shima et al. (1979) *J Neurosurg* 51:533-538; Whitehill et al. (1985) *Spine* 10:32-41; Herron et al. (1989) *Spine* 14:496-500; Cook et al. (1986) *Spine* 11:305-309) u orgánicas tales como matriz ósea desmineralizada (DBM) (revisado en Ashay et al. (1995) *Am J Orthop* 24:752-761; cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia). Se piensa que estas matrices son osteoconductoras (facilitan la invasión de las células formadoras de hueso en una matriz inerte) u osteoinductoras (inducen la transformación de las células precursoras reclutadas a osteoblastos). Se han observado varios resultados clínicos exitosos con algunos de estos productos aprobados para usarse clínicamente por la Food and Drug Administration. A pesar de estos éxitos, permanecen varias cuestiones respecto a la utilidad de estas matrices. La primera es la respuesta variable del sujeto a DBM. Además estas matrices tardan mucho más tiempo que el trasplante de hueso autólogo en desarrollar una integridad estructural significativa y aguantar carga eficazmente.

Una alternativa al trasplante y al uso de matrices simples es la mezcla de médula ósea o células estromales de médula ósea con DBM. Idealmente, las células y DBM se obtendrán del mismo sujeto aunque ya se ha usado clínicamente DBM alogénica con un éxito inicial (Mulliken et al. (1981) *Ann Surg* 194:366-372; Kaban et al. (1982) *J Oral Maxillofac Surg* 40:623-626). Los métodos de trasplante usando células de médula ósea autóloga con DBM alogénica han rendido buenos resultados (Connolly (1995) *Clin Orthop* 313:8-18). Sin embargo, las cuestiones que pueden afectar el uso amplio de estas técnicas incluyen el potencial de contaminación por materiales no propios, la aceptabilidad

del paciente para donar médula ósea, y las complicaciones potenciales que surgen de las aspiraciones de médula ósea y la depleción de médula ósea de la fuente.

Varios grupos han mostrado que las células estromales de médula ósea y las líneas celulares derivadas de éstas son capaces de diferenciarse en células bioquímicamente y morfológicamente similares a los osteoblastos (Dorheim et al. (1993) J Cell Physiol 154:317-328; Grigoriadis et al. (1988) J Cell Biol 106:2139-2151; Benayahu et al. (1991) Calcif Tiss Int. 49:202-207; cuyos contenidos se incorporan por referencia). En la mayor parte de los casos, las células semejantes a fibroblastos se aislaron de médula ósea humana o animal y se plaquearon en material de cultivo de tejidos estándar. Generalmente, se usa una formulación de medio estándar, tal como Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) más suero fetal de ternera 10-20% y antibióticos, para seleccionar el enriquecimiento de estas células (Ashton et al. (1980) Clin Orthop 151:294-307; Sonis et al. (1983) J Oral Med 3:117-120). Las células se estimularon para que se diferenciaran en osteoblastos cambiando el medio a uno que contiene 5-20% de suero fetal de ternera, 2-20 mM β -glicerofosfato y 20-75 μ M ácido ascórbico o ascórbico-2-fosfato (Asahina et al. (1996) Exp Cell Res 222:38-47; Yamaguchi et al. (1991) Calcif Tissue Int 49:221-225). Después de 14-21 días en cultivo, muchos de estos tipos celulares y líneas celulares mineralizarán matrices en el material de cultivo como se manifiesta por la tinción positiva de von Kossa. Otros indicadores fenotípicos del linaje osteoblasto incluyen actividad fosfatasa alcalina secretada elevada; la presencia de osteocalcina secretada en el medio; y la expresión incrementada de varios genes que se piensa que se expresan específicamente en los osteoblastos, incluyendo osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea (Stein et al. (1990) FASEB J 4:3111-3123; Dorheim et al. (1993) J Cell Physiol 154:317-328; Asahina et al. (1996) Exp Cell Res 222:38-47; Yamaguchi et al. (1991) Calcif Tissue Int 49:221-225).

Ha habido varios estudios detallados realizados en varios laboratorios que demuestran que las células estromales de médula ósea transplantadas pueden formar hueso ectópico (Gundle et al. (1995) Bone 16:597-603; Haynesworth et al. (1992) Bone 13:81-89; Boynton et al. (1996) Bone 18:321-329). Por ejemplo, se han transplantado fibroblastos estromales de médula ósea humana y murina en ratones SCID inmunodeficientes (Krebsbach et al. (1997) Transplantation 63:1059-1069; Kuznetsov et al. (1997) J Bone Min Res 12:1335-1347). Usando anticuerpos y marcadores histoquímicos, se demostró que las células estromales de médula ósea del donante

justificaban los osteoblastos recién desarrollados en sitios de formación de hueso ectópico en presencia de una matriz inductora. Las células murinas formaban hueso en presencia de partículas de hidroxiapatito/fosfato de tricalcio (HA/TCP), gelatina, poli-L-lisina y colágeno. Por el contrario, las células estromales humanas formaban hueso sólo en presencia de HA/TCP. No se requirió BMP exógeno en estos estudios.

La formación del hueso no está limitada al esqueleto. Por ejemplo, la introducción de matriz ósea cerámica o desmineralizada en sitios intramusculares, capsulares subrenales o subcutáneos resultará en la formación de hueso si el área expresa simultáneamente proteína morfogenética ósea (Urist (1965) Science 150:893-899). Estos resultados sugieren que las células presentes en estos tejidos tienen alguna capacidad para formar células precursoras de hueso bajo las condiciones ambientales apropiadas.

La formación de hueso ectópico en tejidos blandos tales como grasa es una condición patológica rara observada en pacientes con fibrosis osificante progresiva, una enfermedad hereditaria. Aunque la etiología de la enfermedad no se conoce completamente, surge en parte de la expresión anormal de BMP en los linfocitos localizados en los sitios de lesión del tejido blando (Kaplan et al. (1997) J Bone Min Res 12:855; Shafritz et al. (1996) N Engl J Med 335:555-561]). La formación de hueso también se observa en raras ocasiones en lipomas (Katzner (1989) Path Res Pract 184:437-443).

Se ha demostrado que la fracción estromal-vascular aislada de tejido adiposo después del tratamiento con colagenasa contiene una gran cantidad de preadipocitos, o células que están predispuestas a diferenciarse en adipocitos (Hauner et al. (1989) J Clin Invest 34:1663-1670). Estas células pueden diferenciarse espontáneamente en adipocitos con una frecuencia relativamente baja o responder a agonistas adipogénicos tales como tiazolidindionas con una frecuencia mucho más alta de diferenciación (Halvorsen (1997) Strategies 11:58-60; Digby (1997) Diabetes 4:138-141). Existe evidencia para sugerir que las células estromales presentan un patrón recíproco de diferenciación entre estos linajes (Gimble et al. (1996) Bone 19:421-428; Bennett et al. (1991) J Cell Sci 99:131-139; Beresford et al. (1992) J Cell Sci 102:341-351). Específicamente, la adipogénesis está acompañada de un potencial osteoblástico reducido mientras que la osteogénesis está acompañada de un potencial adipogénico reducido.

Bajo determinadas condiciones, las células estromales de la médula ósea pueden diferenciarse en adipocitos. De hecho, varias líneas celulares estromales óseas se han caracterizado extensamente respecto a esta capacidad (Gimble et al. (1990) Eur J

Immunol 20:379-387; Gimble et al. (1992) J Cell Biochem 50:73-82; Gimble et al. (1996) Bone 19:421-428). Sin embargo, antes de la presente invención, no se sabía que se podía hacer que las células estromales aisladas de tejido adiposo se diferenciaron en osteoblastos.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención proporciona métodos y composiciones para diferenciar células estromales de tejido adiposo en células que tienen propiedades osteoblásticas. Los métodos comprenden cultivar células estromales de tejido adiposo en β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascorbato-2-fosfato durante un tiempo suficiente para permitir la
10 diferenciación de dichas células en osteoblastos. Dichos métodos son útiles en la producción de osteoblastos para el trasplante autólogo en hueso en un sitio o lesión quirúrgico. También se proporcionan composiciones que comprenden células estromales adiposas, un medio capaz de sustentar el crecimiento de los fibroblastos y cantidades que inducen la diferenciación de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascorbato-2-fosfato.

15 De acuerdo con esto, la invención proporciona un método para diferenciar células estromales adiposas en osteoblastos, que comprende: cultivar dichas células en una composición que comprende un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades que inducen la diferenciación de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascorbato-2-fosfato.

20 La invención también proporciona una composición que comprende células estromales adiposas, un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascorbato-2-fosfato suficientes para inducir la diferenciación de dichas células estromales en osteoblastos.

DESCRIPCION BREVE DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 muestra los cambios morfológicos que ocurren en células estromales adiposas humanas inducidas para diferenciarse en osteoblastos por tratamiento con medio de diferenciación de osteoblastos.

La Figura 2 muestra células estromales adiposas que se han tratado con medio de diferenciación de osteoblastos o medio de diferenciación de adipocitos y se han teñido
30 con Oil Red O (Figuras 2A y 2C) o por el método de von Kossa (Figuras 2B y 2C).

La Figura 3 muestra la evolución con el tiempo de las concentraciones de osteocalcina y leptina secretadas en el medio después de tratamiento de las células

estromales adiposas con medio de células estromales (PA), medio de adipocitos (AD) o medio de osteoblastos (OST).

La Figura 4 muestra las concentraciones de fosfatasa alcalina secretada por las células estromales adiposas cultivadas durante veintiún días en medio de células estromales (SC), medio de diferenciación de adipocitos (AD) o medio de diferenciación de osteoblastos (OST).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para diferenciar células estromales adiposas en osteoblastos. Los osteoblastos producidos por los métodos de la invención son útiles para proporcionar una fuente de osteoblastos para investigación o trasplante en el hueso de un sujeto, en el sitio de cirugía o fractura. Así, en un aspecto, la invención proporciona un método para diferenciar células estromales adiposas en osteoblastos, que comprende: cultivar dichas células en una composición que comprende un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades que inducen la diferenciación de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones para la diferenciación de células estromales adiposas en osteoblastos. Dichas composiciones comprenden: células estromales adiposas, un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato suficientes para inducir la diferenciación de dichas células estromales en osteoblastos.

"Células estromales adiposas" se refiere a células estromales que se originan del tejido adiposo. Por "adiposo" se quiere decir cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón o blanco. Preferiblemente, el adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. Dichas células pueden comprender un cultivo celular primario o una línea celular inmortalizada. El tejido adiposo puede ser de cualquier organismo que tenga tejido graso. Preferiblemente, el tejido adiposo es de mamífero, lo más preferiblemente el tejido adiposo es humano. Una fuente conveniente de tejido adiposo humano es la cirugía de liposucción, sin embargo, la fuente de tejido adiposo o el método de aislamiento de tejido adiposo no es crítico para la invención. Si se desean los osteoblastos para el trasplante autólogo en un sujeto, el tejido adiposo se aislará de ese sujeto.

"Cantidades que inducen la diferenciación de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato" se refiere a concentraciones de β -glicerofosfato y (ácido ascórbico y/o

ascórbico-2-fosfato), que cuando se suministran en un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos (p. ej., células NIH-3T3, células estromales adiposas humanas y semejantes), inducirán la diferenciación de dichas células estromales en osteoblastos durante un periodo de tiempo de aproximadamente cinco días a ocho semanas. Las concentraciones y duración del tratamiento óptimas pueden determinarse por el médico mediante el uso de ensayos conocidos para osteoblastos diferenciados. Dichos ensayos incluyen, pero no están limitados a, los que evalúan las características morfológicas o bioquímicas (p. ej., osteocalcina secretada u otras proteínas o ARN específicos de osteoblastos).

La concentración de ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato se refiere a cualquier concentración combinada de estos compuestos que constituya el total de la concentración indicada. Por ejemplo, la definición de "50 μ M ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato" incluye, pero no está limitada a, dichas permutaciones como: 50 μ M ácido ascórbico; 50 μ M ascórbico-2-fosfato; 10 μ M ácido ascórbico y 40 μ M ascórbico-2-fosfato; ó 40 μ M ácido ascórbico y 10 μ M ascórbico-2-fosfato.

Preferiblemente, el medio contiene aproximadamente 2-20 mM β -glicerofosfato y aproximadamente 20-75 μ M ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato. Más preferiblemente, el medio contiene aproximadamente 5-15 mM β -glicerofosfato y aproximadamente 40-60 mM ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato. Lo más preferiblemente, el medio contiene aproximadamente 10 mM β -glicerofosfato y aproximadamente 50 μ M ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato.

Puede usarse cualquier medio capaz de sustentar fibroblastos en cultivo celular. Las formulaciones de los medios que sustentarán el crecimiento de fibroblastos incluyen, pero no están limitadas a, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Esencial Mínimo alfa modificado (α MEM) y Medio Basal Esencial (BME) y semejantes. Típicamente, se añadirá 5-20% Suero Fetal de Ternera (FCS) a los medios anteriores con el fin de sustentar el crecimiento de los fibroblastos. Sin embargo, podría usarse un medio definido si los factores del FCS necesarios para el crecimiento de los fibroblastos se identificaran y se proporcionaran en el medio de crecimiento.

Los medios útiles en los métodos de la invención pueden contener uno o más compuestos de interés, incluyendo, pero sin limitarse a, antibióticos, compuestos que son osteoinductores, osteoconductores, o que estimulan el crecimiento o diferenciación, tales

como proteínas morfogenéticas óseas u otros factores de crecimiento. Los ejemplos de proteínas morfogenéticas óseas incluyen, pero no están limitados a, proteína osteogénica 1, BMP-5, osteogenina, factor osteoinductor y proteína morfogenética ósea 4 (Asahina et al. (1996) Exp Cell Res 222:38-47; Takuwa (1991) Biochem Biophys Res Com 174:96-101; Chen (1991) J Bone Min Res 6:1387-1390; Sampath (1992) J Biol Chem 267:20352-20362; Wozney et al. 1988 Science 242:1528-1534) y semejantes.

Preferiblemente, el tejido adiposo se trata de manera que las células estromales se disocien entre sí y de otros tipos celulares, y se eliminan los componentes de la sangre precipitados. Típicamente, la disociación en células viables separadas puede conseguirse tratando el tejido adiposo con enzimas proteolíticas, tal como collagenasa y/o tripsina, y con agentes que quelan Ca^{2+} . Las células estromales pueden purificarse entonces parcialmente o completamente mediante varios medios conocidos por los expertos en la técnica, tales como centrifugación diferencial, separación de células activada por fluorescencia, cromatografía de afinidad y semejantes. Las células estromales aisladas parcialmente o completamente pueden cultivarse en un medio que sustentará el crecimiento de fibroblastos durante un periodo de entre ocho horas hasta cinco subcultivos de células antes del tratamiento con medios que contienen β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato.

Las células estromales se cultivarán en medios que contienen β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación en osteoblastos. La duración del tratamiento con β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato requerida para la diferenciación de las células estromales en osteoblastos depende de varios factores. Dichos factores incluyen, pero no están limitados a, las concentraciones usadas de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato, el medio usado, la fuente de tejido adiposo o de células estromales, la densidad inicial del plaqueo, la presencia o ausencia de factores de crecimiento o proteínas morfogenéticas óseas y semejantes. La concentración de β -glicerofosfato y ácido ascórbico o ascórbico-2-fosfato y otras condiciones y factores las puede optimizar el médico. Las concentraciones y tiempos de tratamiento óptimos pueden determinarse midiendo el porcentaje de células que se han diferenciado en osteoblastos. Este porcentaje puede monitorizarse por ensayos morfológicos y bioquímicos e índices conocidos por los expertos en la técnica. Dichos ensayos e índices incluyen, pero no

están limitados a, los que evalúan características morfológicas o bioquímicas, tales como la presencia de depósitos de calcio o proteínas o ARN específicos de osteoblastos, tinción de von Kossa, secreción de osteocalcina y secreción de fosfatasa alcalina.

Los osteoblastos obtenidos de células estromales de tejido adiposo pueden
5 introducirse en el hueso de un sujeto humano o animal en el sitio de cirugía o fractura. La introducción de osteoblastos en el hueso es útil en el tratamiento de fracturas óseas y trastornos óseos, incluyendo osteoporosis. Así, en otro aspecto, la invención está dirigida a un método para mejorar la estructura ósea de un sujeto, que comprende:

- a) cultivar células estromales de tejido adiposo en una composición que
10 comprende un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades que inducen la diferenciación de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato; e
- b) introducir dichos osteoblastos en un sitio de cirugía o fractura de dicho sujeto.

Preferiblemente, las células estromales se aíslan del tejido adiposo del sujeto en el que se quieren introducir los osteoblastos diferenciados. Sin embargo, las células
15 estromales también pueden aislarse de un organismo de la misma o diferente especie del sujeto. El sujeto puede ser cualquier organismo que tenga tejido óseo. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, lo más preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Las células estromales u osteoblastos pueden transformarse de manera estable o transitoria con un ácido nucleico de interés antes de la introducción en un sitio de cirugía o
20 fractura del sujeto. Las secuencias de ácido nucleico de interés incluyen, pero no están limitadas a, las que codifican productos génicos que incrementan el crecimiento, diferenciación y/o mineralización de los osteoblastos. Por ejemplo, puede introducirse un sistema de expresión para la proteína morfogenética ósea 4 en los preadipocitos de una manera estable o transitoria para el propósito de tratar fracturas que no cicatrizan u
25 osteoporosis. Los métodos para la transformación de células estromales y osteoblastos son conocidos por los expertos en la técnica, como lo son los métodos para introducir osteoblastos en un hueso en el sitio de cirugía o fractura.

Los osteoblastos pueden introducirse solos o mezclados con una composición útil para reparar heridas o defectos óseos. Dichas composiciones incluyen, pero no están
30 limitadas a, proteínas morfogenéticas óseas, partículas de hidroxiapatito/fosfato de tricalcio (HA/TCP), gelatina, poli-L-lisina y colágeno. Por ejemplo, los osteoblastos diferenciados de células estromales adiposas pueden combinarse con DBM u otras matrices para obtener la mezcla osteogénica (que forma hueso por sí misma) así como

osteoinductora. Métodos similares usando células de médula ósea autóloga con DBM alogénica han rendido buenos resultados (Connolly (1995) Clin Orthop 313:8-18).

Las características y ventajas de la presente invención se entenderán más claramente por referencia a los ejemplos siguientes, que no deben considerarse como
5 limitativos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo I

Aislamiento de Estroma de Tejido Adiposo Humano

Las células estromales humanas se aislaron de tejido adiposo según los
10 procedimientos descritos por Rodbell (1964) J Biol Chem 239:375 y Hauner et al. (1989) J Clin Invest 84:1663-1670. Brevemente, se obtuvo tejido adiposo humano de depósitos subcutáneos por cirugía de liposucción. El tejido adiposo se transfirió del envase de liposucción a un vaso de precipitados estéril de 500 ml y se permitió que se asentara durante aproximadamente 10 minutos. La sangre precipitada se eliminó por succión. Un
15 volumen de 125 ml (o menor) del tejido se transfirió a un tubo de centrifuga de 250 ml y el tubo se rellenó con Tampón Krebs-Ringer. Se permitió que el tejido y el tampón se asentaran durante aproximadamente tres minutos o hasta que se consiguió una separación clara y el tampón se eliminó por aspiración. El tejido se lavó con Tampón Krebs-Ringer cuatro a cinco veces adicionales o hasta que fue de color naranja-amarillo y
20 el tampón de color marrón claro.

Las células del tejido adiposo se disociaron por tratamiento con collagenasa. Brevemente, el tampón se eliminó del tejido y se reemplazó por una disolución de Tampón Krebs con 2 mg de collagenasa/ml (Worthington, MA, EEUU, tipo I) con una relación de 1 ml de disolución de collagenasa/ml de tejido. Los tubos se incubaron en un
25 baño de agua a 37°C con agitación intermitente durante 30 a 35 minutos.

Las células estromales se aislaron de otros componentes del tejido adiposo por centrifugación durante 5 minutos a 500 x g a temperatura ambiente. La capa de aceite y de adipocitos se eliminó por aspiración. La fracción estromal-vascular restante se resuspendió en aproximadamente 100 ml de disolución salina tamponada con fosfato
30 (PBS) por agitación vigorosa, se dividió en tubos de 50 ml y se centrifugó durante cinco minutos a 500 x g. El tampón se eliminó cuidadosamente por aspiración, dejando las células estromales. Las células estromales se resuspendieron en medio de células estromales (DMEM (Morton (1970) In Vitro 6:89-108; Dulbecco (1959) Virology

8:396)/medio de Ham F-10 (Ham (1963) Exp Cell Res 29:515) (1:1, v/v); 10% (v/v) suero fetal de ternera; 15 mM HEPES, pH 7,4; 60 U/ml de penicilina; 60 U/ml de estreptomicina; 15 µg/ml de anfotericina B), se plaquearon a una densidad celular apropiada y se incubaron a 37°C en 5% CO₂ toda la noche. Una vez adheridas a la placa o matraz de cultivo de tejido, las células estromales cultivadas pueden usarse inmediatamente o mantenerse en cultivo hasta 5 subcultivos antes de inducir las para que se diferencien en osteoblastos como se describe en el Ejemplo 2 siguiente.

Ejemplo 2

Diferenciación de células estromales adiposas extramedularmente en osteoblastos

Las células estromales adiposas se aislaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se trataron como sigue para inducir la diferenciación en osteoblastos. Las células estromales se plaquearon en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos y/o de 6 pocillos en medio de células estromales (véase anteriormente) a una densidad de aproximadamente 22.000 células/cm². Después de 24 horas, el medio de células estromales se reemplazó por medio de diferenciación de osteoblastos (DMEM con 10% suero fetal de ternera (v/v); 10 mM β-glicerofosfato; 50 µg/ml ascorbato-2-fosfato; 60 U/ml de penicilina; 60 U/ml de estreptomicina; 15 µg/ml de anfotericina B). El medio de diferenciación de osteoblastos se reemplazó por medio fresco cada 3 días durante 3 semanas. Cuando se cambió el medio, se recogió un ml del medio condicionado y se almacenó a -80°C para un análisis posterior de factores secretados. Alternativamente, las células estromales aisladas de tejido adiposo se indujeron para diferenciarse en adipocitos según el método de Hauner et al. (1989) J Clin Invest 34:1663-1670) por tratamiento con medio de diferenciación de adipocitos.

El examen microscópico de las células tratadas con medio de osteoblastos como se ha descrito anteriormente reveló cambios morfológicos consistentes con la apariencia de los osteoblastos (Figura 1). Después de un cultivo prolongado (21-28 días) se formaron varios nódulos multicelulares en cada pocillo del cultivo. La apariencia granulada del cultivo de osteoblastos, indica la presencia de depósitos de fosfato de calcio y estructuras pre-óseas. Como las células estromales aisladas del tejido adiposo también tienen el potencial de diferenciarse en adipocitos cuando se tratan con un medio de diferenciación de adipocitos, las células tratadas con medio de osteoblastos también se examinaron para la presencia de adipocitos. No se observaron adipocitos en los cultivos tratados con medio

de osteoblastos, como indica la ausencia de gotitas de aceite que aparecen en el citoplasma y la ausencia de células que tienen la morfología redondeada característica de los adipocitos.

Las células tratadas con el medio de diferenciación de osteoblastos se tiñeron con el método de von Kossa para determinar si las células estromales se habían diferenciado en osteoblastos. Brevemente, se diluyó de manera seriada suero fetal de ternera del medio intercambiando 80% del medio varias veces con medio sin suero. Las células se fijaron en 5% formaldehído y se lavaron varias veces con PBS para eliminar el suero restante. Las células fijadas se incubaron en 100% etanol a 4°C durante aproximadamente 10 minutos. El etanol se eliminó y las células fijadas se incubaron en 0,5 ml 5% nitrato de plata durante 10 minutos bajo luz UV a 254 nm. Las células se lavaron 2-3 veces en agua destilada, se incubaron en 5% tiosulfato de sodio durante 5 minutos y se lavaron con agua. Las células teñidas pueden almacenarse en 50% glicerol de manera indefinida. Los resultados de la tinción de von Kossa se muestran en las Figuras 2B y 2C. Sólo las células que recibieron medio de osteoblastos se tiñeron positivamente y se volvieron oscuras.

La tinción con Oil Red O se realizó como sigue. Las placas se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato varias veces para eliminar el suero o la albúmina de suero bovino del medio de cultivo. Las células se fijaron en metanol ó 10% formaldehído en disolución salina tamponada con fosfato durante 15 minutos a 24 horas. Se preparó una disolución de trabajo de Oil Red O añadiendo 6 ml de una disolución madre (0,5 g Oil Red O en 100 ml isopropanol) a 4 ml de dH₂O. La disolución de trabajo se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente antes de filtrarla a través de un filtro Whatman #1. Las células se tiñeron con aproximadamente 3ml/ 100 mm de placa ó 1ml/ pocillo en placas de 6 pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron varias veces con H₂O. El resto del agua de lavado se eliminó. Se añadieron 150 µl/pocillo de isopropanol y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El isopropanol se pipeteó arriba y abajo varias veces para asegurar que todo el oil red O estaba en disolución. La densidad óptica se midió a 500 nm.

Las células que recibieron medio de diferenciación de adipocitos teñidas con oil red O como se describe a continuación presentaron el color rojo característico lo que indica la acumulación de lípido (Figura 2A). Los preadipocitos mostraron gotitas de aceite muy pequeñas acumuladas después de 4 semanas en cultivo. Las células que recibieron

medio de osteoblastos mostraron algo de oil red O de fondo inespecífico, sin embargo, la tinción no estaba asociada con las células (Figura 2C). Estos resultados sugieren que las células estromales que se diferencian en osteoblastos no tienen una morfología de adipocito detectable. La ausencia de dicha acumulación de lípidos neutros es un indicador de pérdida de función y linaje de adipocito.

Los cambios bioquímicos indicativos de diferenciación en osteoblastos también se evaluaron. La osteocalcina es una proteína secretada específica de osteoblastos que puede medirse por ELISA (kit Intact Human Osteocalcin K EIA, número de catálogo BT-460, Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA). Los medios obtenidos de osteoblastos, preadipocitos y adipocitos se examinaron para la presencia de osteocalcina secretada. Brevemente, se recogió el medio condicionado (2 ml de medio de 40.000 células después de 72 horas) y se usaron 20 µl de cada medio para el ensayo. Como se muestra en la Figura 3, se encuentra una mayor cantidad de osteocalcina en los medios de osteoblastos mientras que se observa poca o ninguna secreción de osteocalcina en las células estromales adiposas y en los adipocitos.

El péptido leptina secretado se midió por un kit ELISA disponible comercialmente. Se recogió el medio condicionado (2 ml de medio de 40.000 células se condicionó durante 72 horas) y se usaron 100 µl de cada medio para el ensayo según el protocolo sugerido por el fabricante. Como se esperaba, la leptina secretada en el medio se incrementa durante la diferenciación de los adipocitos pero no durante la diferenciación de los osteoblastos. La presencia de leptina, una proteína secretada específica de adipocitos, en los medios condicionados es un marcador claro de la actividad de los adipocitos. Los osteoblastos y las células estromales no secretan leptina detectable en los medios, lo que indica una ausencia de linaje de adipocito, mientras que sólo las células sometidas a diferenciación de adipocitos secretan leptina después de 2 semanas.

Otro indicador del linaje de osteoblastos es la capacidad de secretar fosfatasa alcalina. Las células se prepararon y se incubaron como se ha descrito anteriormente y los medios condicionados se ensayaron para actividad de fosfatasa alcalina usando un kit de ensayo de fosfatasa alcalina disponible comercialmente (Sigma Diagnostic Inc., número de catálogo 104-LS, St Louis, MO). Como se muestra en la Figura 4, los preadipocitos tenían un nivel basal de actividad fosfatasa alcalina secretada. Después de

la diferenciación, los adipocitos perdieron este nivel basal de actividad secretada mientras que los osteoblastos mostraron un incremento en los niveles de fosfatasa alcalina.

Ejemplo 3

Identificación de Compuestos que Influyen en la Diferenciación de Osteoblastos

5 Los cultivos de células estromales aisladas de tejido adiposo según el método descrito en el Ejemplo 1 se usaron para estudiar el efecto de compuestos de interés en la diferenciación de osteoblastos. Los osteoblastos se diferenciaron de células estromales adiposas como en el Ejemplo 2, pero en presencia y ausencia de un compuesto de interés. La diferenciación se midió por ensayos para osteocalcina secretada. Los
10 compuestos que se encontró que influyen positivamente en la diferenciación de osteoblastos usando el método de este ejemplo incluyen la proteína morfogenética ósea 4 y osteopontina I (datos no mostrados). Estos resultados están de acuerdo con los descubrimientos previos de Wozney et al. 1988 Science 242:1528-1534; Asahina et al. 1996 Exp Cell Res 222:38-47; y Cook et al. 1996 Clin Orthop. 324:29-38. Los compuestos
15 que incrementan la diferenciación de osteoblastos pueden usarse para incrementar la estructura ósea de un sujeto, como se discute a continuación.

Ejemplo 4

Uso de Osteoblastos en la Reparación Ósea

Las células estromales se aíslan de tejido adiposo usando liposucción de
20 pacientes que padecen fracturas no cicatrizadas o fracturas osteoporóticas usando el método del Ejemplo 1. Los preadipocitos se inducen para diferenciarse a osteoblastos *in vitro* usando el método descrito en el Ejemplo 2. Después de 7-21 días, los osteoblastos diferenciados se recogen, por ejemplo, por tratamiento con tripsina o raspado mecánico de las células diferenciadas de una placa de cultivo de tejido y se concentran por
25 centrifugación a 3.000 x g durante 10 min a 4-20°C bajo condiciones estériles. Las células recogidas se resuspenden en una disolución de colágeno o Matrigel™ y se inyectan directamente en el sitio de fractura o cirugía usando una aguja con un calibre 20 o un calibre mayor. Alternativamente, antes de la inyección, las células se mezclan con DBM o una matriz cerámica tal como ProOsteon 2000™ (Interpore Cross, Irvine, CA) o
30 Collagraft™ (Zimmer Inc., Warsaw, IN). La cantidad de células usada dependerá del área superficial de la fractura y la naturaleza de la fractura. Pueden ser necesarios múltiples tratamientos dependiendo de la velocidad de recuperación deseada de la fractura. El

resultado es un tiempo disminuido de cicatrización y una densidad ósea incrementada alrededor del sitio de la fractura.

Ejemplo 5

Uso de Osteoblastos Alterados Genéticamente para Fracturas u Osteoporosis

5 Las células estromales se aíslan como se ha descrito en el Ejemplo 1 y el material genético (p. ej., ADN que codifica productos génicos útiles, tal como proteínas morfogenéticas óseas, unido de manera operativa a un promotor) se introduce en las células estromales usando métodos de transfección estándar tal como cloruro de calcio (Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Dicho protocolo ha sido desarrollado usando reactivo Effectene y se describe en la presente memoria. En un tubo de microcentrífuga, se añaden 0,1-2,0 µg pCMV-βgal (Stratagene, Inc. La Jolla, CA) a 150 µl de Tampón EC (Qiagen kit Effectene™; número de catálogo 301425, Qiagen Corp.). Esto permite que el ADN se condense. Se añaden 8 µl de amplificador (Qiagen kit Effectene) al ADN condensado. El tubo que contiene el ADN condensado se agita en vórtex durante un segundo y se deja incubando a temperatura ambiente durante 2-5 minutos. El tubo se centrifuga brevemente para eliminar gotas en la parte superior del tubo. Se añaden 10 µl de Effectene™, el tubo se agita con vórtex durante 10 segundos y se incuba a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Después de un tiempo de incubación de 5-10 minutos, se añade 1 ml de medio a la mezcla de ADN.

Se sacan 120 µl del medio viejo de las células y se añaden 70 µl de medio fresco. Se añaden 25 µl de la mezcla de ADN a cada pocillo. Las células se incuban a 37°C durante aproximadamente 5 horas. Sin embargo, Effectene no es tóxico y puede dejarse en las células durante cualquier periodo de tiempo.

25 Las células se lavan una vez con 80 µl de medio fresco y se ensayan a las 72 horas después de la infección para actividad β-galactosidasa usando el método descrito por Maniatis *et al.* (1982). Dichas células pueden diferenciarse en osteoblastos según los métodos descritos en el Ejemplo I. Alternativamente, el ADN puede introducirse directamente en las células diferenciadas en osteoblastos.

30 También pueden usarse otros métodos para introducir secuencias de ácido nucleico en células. Por ejemplo, pueden usarse adenovirus para introducir ADN en las células estromales de manera similar a los protocolos descritos por Becker et al. (1994)

Meth Cell Biol 43:161-189 y Meunier-Durmout et al. (1996) Eur Biochem 237:660-667. Las células se tratan de manera que se diferencian en osteoblastos como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Alternativamente, los osteoblastos diferenciados serán susceptibles de infección por partículas virales. Una adición de un antibiótico como
5 marcador de selección permite el enriquecimiento de células que contienen el material genético introducido. Los osteoblastos derivados que contienen el material genético introducido se introducen en la fractura y médula ósea osteoporótica como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo III.

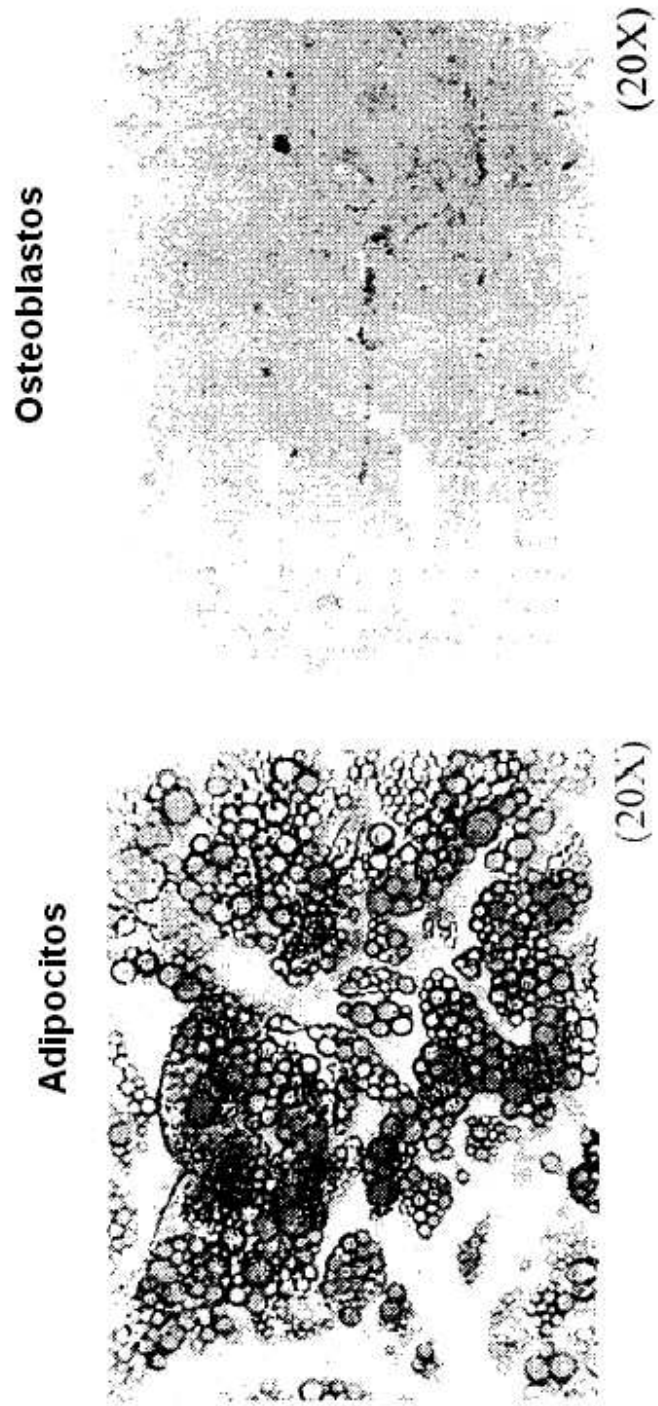
Todas las publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas del nivel
10 de los expertos en la técnica a los que concierne esta invención. Todas las publicaciones se incorporan en la presente memoria por referencia en la misma medida que si se indicara que cada publicación individual se incorpora específicamente e individualmente por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar células estromales adiposas en osteoblastos, que comprende: cultivar dichas células en una composición que comprende un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades que inducen la diferenciación de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato.
2. Un método según la reivindicación 1 en el que dichas cantidades son 2-20 mM β -glicerofosfato y 20-75 μ M ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato; preferiblemente 5-1 mM β -glicerofosfato y aproximadamente 40-60 μ M ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato; más preferiblemente aproximadamente 10 mM β -glicerofosfato y aproximadamente 50 μ M ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato.
3. Un método según la reivindicación 1 en el que dicho medio es DMEM, α MEM o BME.
4. Un método según la reivindicación 1 en el que dicho medio comprende además 5-20% suero fetal de ternera; o una o más proteínas morfogenéticas óseas.
5. Un método según la reivindicación 1 en el que dichas células son células de mamífero.
6. Un método según la reivindicación 5 en el que dichas células son células humanas.
7. Una composición que comprende células estromales adiposas, un medio capaz de sustentar el crecimiento de fibroblastos y cantidades de β -glicerofosfato y ácido ascórbico y/o ascórbico-2-fosfato suficientes para inducir la diferenciación de dichas células estromales en osteoblastos.
8. Una composición según la reivindicación 7 en la que dichas cantidades son como se han definido en la reivindicación 2 ó 4.
9. Una composición según la reivindicación 8 en la que dichas células estromales son células estromales humanas.

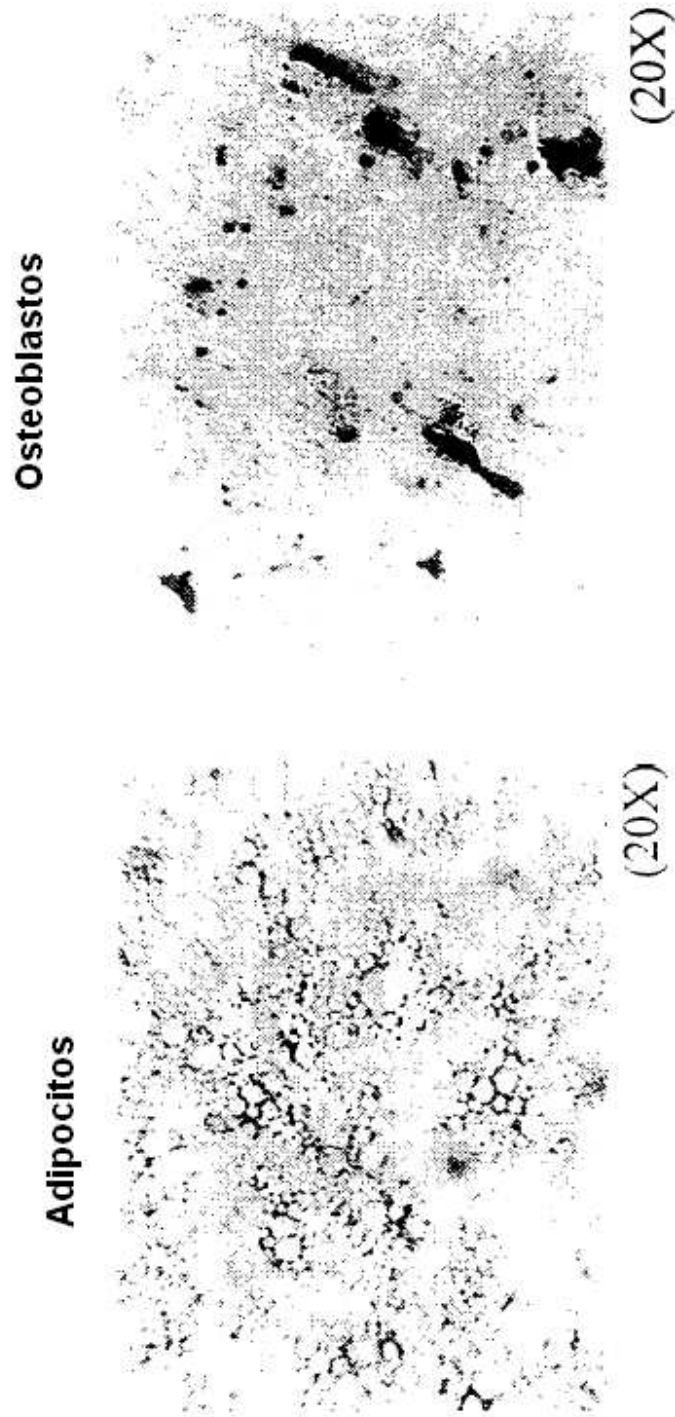


FIG. 1.



- 20 días en cultivo
- Teñidos con oil red O

FIG. 2A.



- 20 días en cultivo
- Teñidas con von Kassa

FIG. 2B.

Oil red O von Kossa



Adipocitos



Osteoblastos

FIG. 2C.

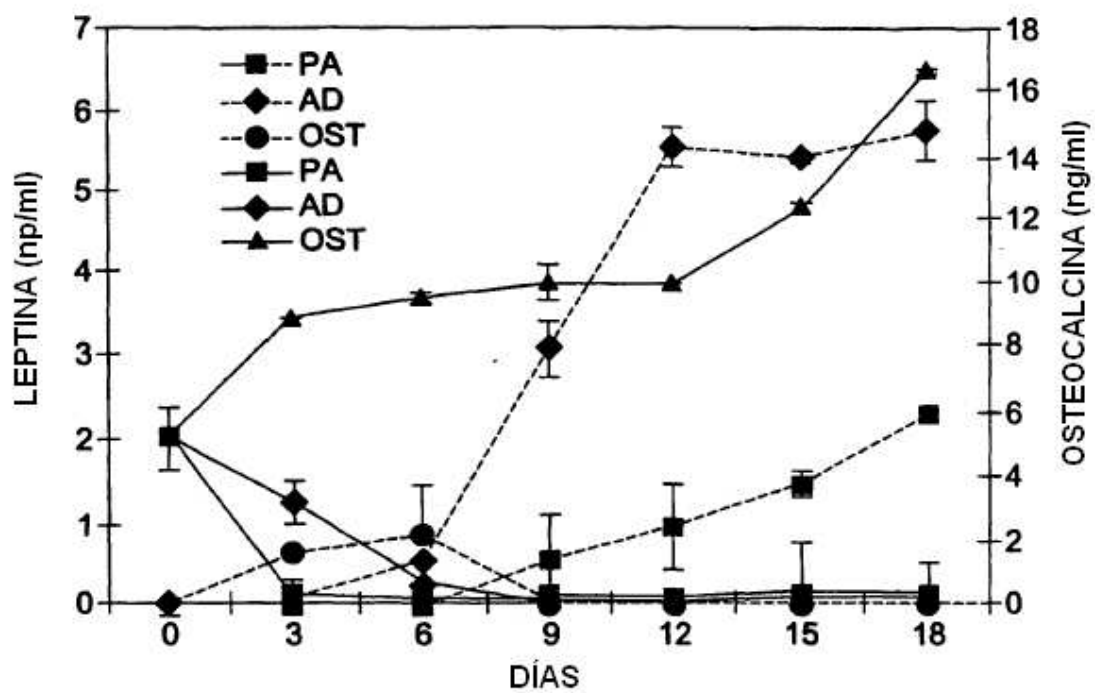


FIG. 3.

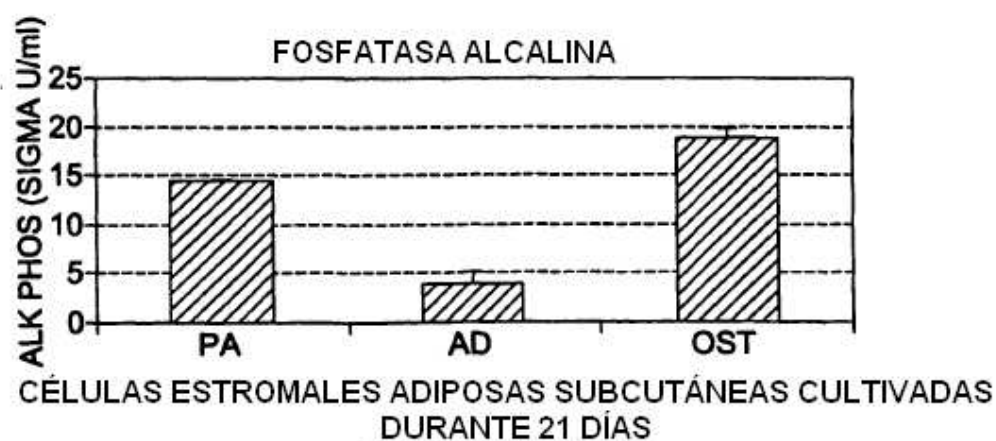


FIG. 4.