



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 873**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00307155 .2**

86 Fecha de presentación : **21.08.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1077253**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2001**

54 Título: **Uso de células estromales derivadas del tejido adiposo para la diferenciación de condrocitos y la reparación de cartilago.**

30 Prioridad: **19.08.1999 US 149850 P**
17.05.2000 US 573989

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Zen-Bio, Inc.**
3200 Chapel Hill-Nelson Boulevard, Suite 102
Research Triangle Park, North Carolina 27709, US

72 Inventor/es: **Halvorsen, Yuan-Di Chang;**
Wilkison, William O. y
Gimble, Jeffrey

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

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

Uso de células estromales derivadas del tejido adiposo para la diferenciación de condrocitos y la reparación de cartílago.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para dirigir células estromales derivadas del tejido adiposo cultivadas *in vitro* para diferenciarse hacia células de la linajes de los condrocitos y particularmente para la inducción dirigida de linaje de este tipo antes, o en el momento de, su implantación en un receptor o huésped para el tratamiento terapéutico de estados patológicos en seres humanos y otras especies.

Antecedentes de la invención

Las células madre mesenquimatosas (MSC) con células de tipo embrionario o blastocitos pluripotenciales de formación que se encuentran en la médula ósea, sangre, dermis y periostio que son capaces de diferenciarse hacia tipos específicos de tejidos mesenquimatosos o conjuntivos incluyendo los tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conjuntivo fibroso. La ruta de diferenciación específica en la que estas células entran depende de diversas influencias de influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas, y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos huésped.

En organismos prenatales, se ha establecido bien la diferenciación de MSC hacia células especializadas del tejido conjuntivo; por ejemplo, las células mesenquimatosas de excrecencia celómica humana, de ratón o de pollo embrionario se diferencian hacia cartílago, hueso y otros tejidos conjuntivos (Caplan A I (1981) en; 39° Simposio Anual de la Sociedad para la Biología del Desarrollo (Society for Developmental Biology) editado por S. Subtelney y A. Abbott, págs. 3768. Nueva York, Alan R. Liss Inc; Elmer *et al.* (1981) *Teratology*, 24: 215-223; Hauschka S.D. (1974) *Developmental Biology* (1974) 37:345-368; Solursh *et al.* (1981) *Developmental Biology*, 83:9-19; Swalla *et al.* (1986) *Developmental Biology*, 116: 31-38. Además, también se ha demostrado que una línea celular de bóveda craneal de feto de rata clónica se diferencia hacia músculo, grasa, cartílago, y hueso (Goshima *et al.* (1991) *Clin Orthop Rel. Res.* 269:274-283. La existencia de MSC en organismos postnatales no se ha estudiado mucho con el objetivo de demostrar la diferenciación de células postembrionarias hacia diversos fenotipos mesodérmicos. Los pocos estudios que se han hecho implican la formación de hueso y cartílago por parte de células de la médula ósea tras su recubrimiento en cámaras de difusión y trasplante *in vivo* (Ashton *et al.* (1980) *Clin Orthop Rel Res.* 151:294-307; Bruder *et al.* (1990) *Bone Mineral*, 11:141-151, 1990). Recientemente, se han aislado, y expandido en cultivo células del periostio del pollo, y, en condiciones *in vitro* de alta densidad, se ha demostrado que se diferencian hacia cartílago y hueso (Ankara *et al.* (1991) *Exp Cell Res.* 195:492-503). Se ha demostrado que células mesenquimatosas derivadas de médula ósea de rata tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos y condrocitos cuando se implantan *in vivo* (Dennis *et al.* (1991) *Cell Transp.*, 1:2332; Goshima *et al.* (1991) *Clin Orthop Rel Res.* 269:274-283). El trabajo de Johnstone *et al.* en la patente de los EE.UU. n° 5.908.784 ha demostrado la capacidad de células mesenquimatosas derivadas de piel para diferenciarse hacia células bioquímica y fenotípicamente similares a los condrocitos.

El microambiente de médula ósea adulta es una fuente potencial para estas células madre mesodérmicas hipotéticas. Se hace referencia a las células aisladas de médula ósea mediante una variedad de nombres, incluyendo células estromales, células madre estromales, células madre mesenquimatosas (MSC), fibroblastos mesenquimatosos, células reticuloendoteliales, y células de Westen-Bainton (Gimble *et al.* (Noviembre de 1996) *Bone* 19 (5): 421-8). Estudios *in vitro* han determinado que estas células pueden diferenciarse a lo largo de múltiples rutas de linajes mesodérmicos o mesenquimatosas. Estas incluyen, pero no se limitan a, adipositos (Gimble *et al.* (1992) *J. Cell Biochem.* 50:73-82, condrocitos; Caplan *et al.* (1998) *J Bone Joint Surg. Am.* 80 (12):1745-57; células de soporte hematopoyético, Gimble, *et al.* (1992) *J. Cell Biochem.* 50:73-82; miocitos, Prockop, *et al.* (1999) *J. Cell Biochem.* 72(4):570-85; miocitos, Charbord, *et al.* (1999) *Exp. Hematol.* 27(12):1782-95; y osteoblastos, Beresford *et al.* (1993) *J. Cell Physiol.* 154:317-328). Se ha propuesto la médula ósea como fuente de células madre estromales para la regeneración de hueso, cartílago, músculo, tejido adiposo, y otros órganos derivados del mesénquima. Las principales limitaciones para utilizar estas células son la dificultad y riesgo que conllevan los procedimientos de biopsia de médula ósea y el bajo rendimiento de las células madre de esta fuente.

El tejido adiposo ofrece una alternativa potencial a la médula ósea como fuente de células estromales multipotenciales. El tejido adiposo es fácilmente accesible y abundante en muchos individuos. La obesidad es un estado de proporciones epidémicas en los Estados Unidos, donde más del 50% de los adultos superan el IMC (índice de masa corporal - body mass index) en base a su altura. Los adipositos pueden recogerse mediante liposucción en un paciente externo. Éste es un procedimiento relativamente no invasivo con efectos cosméticos que son aceptables para la gran mayoría de pacientes. Está bien documentado que los adipositos son una población celular que puede reponerse. Incluso tras la extracción quirúrgica mediante liposucción u otros procedimientos, es frecuente observar la recurrencia de adipositos en un individuo a lo largo del tiempo. Esto sugiere que el tejido adiposo contiene células madre estromales que son capaces de autorenovarse.

Las pruebas patológicas sugieren que las células estromales derivadas del tejido adiposo son capaces de una diferenciación a lo largo de múltiples linajes mesenquimatosos. Los tumores de tejidos blandos, liposarcomas más frecuentes, se desarrollan a partir de células similares a los adipositos. Los tumores de tejidos blandos de origen mixto son

relativamente frecuentes. Éstos pueden incluir elementos de tejido adiposo, músculo (liso o esquelético), cartílago, y/o hueso. Al igual que las células formadoras de hueso de la médula ósea pueden diferenciarse hacia adipositos o células grasas, los adipositos extramedulares son capaces de formar osteoblastos (documento WO 99/28444 de Halvorsen).

5 El cartílago es una estructura hiperhidratada comprendiendo el agua de un 70% a un 80% de su peso. Del 20% al 30% restante comprende colágeno tipo II y proteoglicano. El colágeno normalmente supone un 70% de peso seco del cartílago (en "Pathology" (1988) editores, Rubin & Farber, J.B. Lippincott Company, PA, págs. 1369-1371). Los proteoglicanos se componen de un núcleo de proteína central a partir del cual se extienden largas cadenas de polisacáridos. Estos polisacáridos, llamados glucosaminoglicanos, incluyen: condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, y
10 queratán sulfato. El cartílago tiene una organización estructural característica que consiste en células condrogénicas dispersas dentro de una matriz extracelular secretada y producida de manera endógena. Las cavidades en la matriz que contienen a los condrocitos se llaman lagunas del cartílago. Al contrario que el hueso, el cartílago ni está innervado ni lo penetran los sistemas vascular o linfático (Clemente (1984) in "Gray's Anatomy, 30th Edit", Lea & Febiger).

15 En los mamíferos existen tres tipos de cartílago e incluyen: cartílago hialino; fibrocartílago y cartílago elástico (Rubin y Farber, anteriormente). El cartílago hialino consiste en una masa con mucho cartílago (gristly) que tiene una consistencia elástica, firme, es translúcido y de color azul perlado. El cartílago hialino se encuentra fundamentalmente en las superficies articulares de las uniones que articulan (articulating joints). Se encuentra también en las placas epifisarias, cartílago costal, cartílago traqueal, cartílago bronquial y cartílago nasal. El fibrocartílago es esencialmente
20 igual al cartílago hialino excepto que contiene fibrillas de colágeno tipo I que añaden al cartílago resistencia a la tracción. Las fibras de colágeno se disponen en haces, con las células de cartílago localizadas entre los haces. El fibrocartílago se encuentra normalmente en el anillo fibroso del disco intervertebral, las inserciones ligamentosas o tendinosas, meniscos, la sínfisis pubiana, e inserciones de las cápsulas articulares. El cartílago elástico también es similar al cartílago hialino excepto en que contiene fibras de elastina. Es más opaco que el cartílago hialino y es más
25 flexible y maleable. Estas características vienen definidas en parte por las fibras elásticas embebidas en la matriz del cartílago. Normalmente, el cartílago elástico está presente en los pabellones auriculares, la epiglotis y la laringe.

Las superficies de los huesos que articulan en las articulaciones de los mamíferos están cubiertas con cartílago articular. El cartílago articular evita el contacto directo de las superficies óseas que se oponen y permite el movimiento
30 casi sin fricción de los huesos que articulan entre sí (Clemente, anterior). En los mamíferos se observan con frecuencia dos tipos de defectos del cartílago articular e incluyen defectos de espesor completo y de espesor parcial. Ambos tipos de defectos difieren sólo en la extensión de la lesión física pero también en la naturaleza de la respuesta de reparación que cada tipo de lesión provoca.

35 Los defectos de cartílago articular de espesor completo incluyen lesión del cartílago articular, el tejido óseo subcondral subyacente, y la capa calcificada del cartílago localizado entre el cartílago articular y el hueso subcondral. Los defectos en espesor completos surgen normalmente durante los traumatismos graves de la articulación o durante los últimos estadios de enfermedades articulares degenerativas, por ejemplo, durante la osteoartritis. Como el tejido óseo subcondral está tanto innervado, como vascularizado, a menudo la lesión de este tejido es dolorosa. La reacción de
40 reparación inducida por la lesión del hueso subcondral normalmente da como resultado la formación de fibrocartílago en el sitio del defecto de espesor completo. Sin embargo, el fibrocartílago carece de las propiedades bioquímicas del cartílago articular y no persiste en la articulación a largo plazo.

Los defectos de cartílago articular en espesor parciales se restringen al propio tejido cartilaginoso. Estos defectos
45 normalmente incluyen fisuras o grietas en la superficie que articula el cartílago. Los defectos de espesor parcial están producidos por disposiciones mecánicas de la articulación que a su vez inducen el desgaste del tejido cartilaginoso en la articulación. En ausencia de innervación y vasculatura, los defectos en espesor parciales no provocan respuestas de reparación y, por tanto, no tienden a curarse. Aunque los defectos en espesor parciales no son dolorosos, con frecuencia degeneran en defectos de espesor completo.

50 Según la presente invención los inventores han observado que cuando las células estromales derivadas del tejido adiposo humano se asocian en un formato tridimensional pueden inducirse para que se comprometan y se diferencien a lo largo de la ruta condrogénica cuando se ponen en contacto *in vitro* con ciertos agentes o factores condroinductivos. El formato tridimensional es crítico para la condrogénesis *in vitro* de la invención y, preferiblemente, las células se
55 condensan juntas, por ejemplo, como una masa celular empaquetada o sedimentada o en una matriz de alginato. Esta invención presenta ejemplos de métodos para el aislamiento, diferenciación y caracterización de las células estromales del tejido adiposo extramedular humano adulto a lo largo del linaje de condrocitos y esboza su uso para el tratamiento de una serie de estados y enfermedades humanas. Se cree que este procedimiento *in vitro* recapitula lo que ocurre *in vivo* y puede utilizarse para facilitar la reparación del cartílago *in vivo* en los mamíferos.

60 Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para la inducción cuantitativa y sistemática de células estromales derivadas de tejidos adiposos omentales, gonadales o mamarios en condrocitos funcionales. Los métodos comprenden
65 incubación de células estromales derivadas de tejido adiposo aislado, dispuestas en placa a densidades de 500 a 20.000 células/cm² en un medio de cultivo químicamente definido que tiene o se complementa con (1) un agente condroinductor que puede activar cualquier ruta de transducción celular que conduzca al fenotipo de condrocito maduro, en el que el agente condroinductor es un glucocorticoide, individualmente, o en combinación un agente seleccionado del

grupo que consiste en: un miembro de la superfamilia de factor de crecimiento transformante-beta -beta; una molécula de matriz extracelular de colágeno; y un análogo de la vitamina A; (2) un antibiótico; (3) un complemento nutritivo, tal como suero fetal bovino o suero de caballo; y (4) ascorbato o un análogo de la vitamina C relacionado.

5 La presente invención también proporciona un método para diferenciar células estromales derivadas de tejido adiposo hacia células condrocíticas mediante la suspensión de las células en un alginato de calcio u otra redícula o matriz biocompatible capaz de soportar condrogénesis en una configuración tridimensional.

10 Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para la determinación de la capacidad de estas condiciones y agentes de cultivo para dirigir la diferenciación y función de las células estromales derivadas del tejido adiposo, para la transducción de vectores virales que portan genes reguladores en las células estromales, para la transfección de vectores de plásmido que portan genes reguladores en las células estromales, para el seguimiento y detección de las proteínas funcionales codificadas por estos genes, y para el desarrollo de vehículos mecánicos para la reintroducción de estas células en un organismo vivo.

15 Además, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para la introducción de estos condrocitos en áreas con defecto en el cartílago para la reparación.

20 Los métodos tienen uso en el descubrimiento de fármacos para compuestos y proteínas con relevancia en los estados de enfermedad relacionados con células diferenciadas y lesiones traumáticas que incluyen pero no se limitan a: desgarramientos de ligamento cruzado anterior, defectos de cartílago articular de espesor completo, defectos de cartílago articular de espesor parcial.

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la inmunodetección del colágeno tipo II en células estromales adiposas humanas de cultivos monocapa. En el panel superior se utiliza un microscopio de contraste de fase; en el panel inferior se utiliza inmunofluorescencia.

30 La figura 2 muestra la inmunodetección del colágeno tipo II en células estromales adiposas humanas de cultivos de sedimento (pellet cultures). En el panel superior se utiliza un microscopio de contraste de fase; en el panel inferior se utiliza inmunofluorescencia.

35 La figura 3 muestra la inmunodetección del colágeno tipo II en células estromales adiposas humanas de cultivos con alginato. En el panel superior se utiliza un microscopio de contraste de fase; en el panel inferior se utiliza inmunofluorescencia.

40 La figura 4 muestra la expresión de colágeno tipo VI cuando se cultivaron las células en una matriz de alginato a las 2 semanas sin TGF-beta (control) y con TGF-beta.

La figura 5 muestra una inmunotransferencia de tipo Western cuando se hizo crecer las células como monocapas o en una suspensión de alginato para la expresión de diferentes proteínas incluyendo: colágeno tipo VI, proteína de unión (link), agregano, colágeno tipo I, y actina.

45 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para la diferenciación y el cultivo de células estromales derivadas de tejido adiposo hacia condrocitos. Las células producidas mediante los métodos de la invención son útiles para proporcionar una fuente de células funcionales y completamente diferenciadas para investigación, trasplante, y desarrollo de productos de modificación tisular (tissue engineering products) para el tratamiento de enfermedad humana y la reparación de lesión traumática. Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para diferenciar células estromales derivadas del tejido adiposo hacia condrocitos que comprende el cultivo de células estromales en una composición que comprende un medio capaz de soportar el crecimiento y la diferenciación de células estromales hacia condrocitos funcionales.

55 “Células estromales adiposas” se refiere a células estromales que se originan a partir del tejido adiposo. Por “adiposo” se quiere decir cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo pardo o blanco, derivado de tejido subcutáneo, omental/visceral, mamario, gonadal, u otro sitio de tejido adiposo. Preferiblemente, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. Tales 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 mamífero, lo más preferiblemente es que el tejido adiposo sea humano. Una fuente conveniente de tejido adiposo 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 desea a las células estromales para un trasplante autólogo en un sujeto, el tejido adiposo se aislará de ese sujeto.

65 Los “condrocitos (células de cartílago)” hace referencia a las células que son capaces de expresar marcadores bioquímicos característicos de condrocitos, incluyendo pero no limitándose a colágeno tipo II, condroitín sulfato, queratín sulfato y marcadores morfológicos característicos del músculo liso, incluyendo pero no limitándose a la

morfología redondeada observada en el cultivo y que son capaces de secretar colágeno tipo II, incluyendo pero no limitándose a la generación de tejidos o matrices con propiedades hemodinámicas del cartílago *in vitro*.

Puede utilizarse cualquier medio capaz de soportar las células estromales en cultivo tisular. Las formulaciones de medios que soportarán el crecimiento de fibroblastos incluyen, pero no se limitan a Medio de Dulbecco modificado por Tagle (DMEM), medio esencial mínimo α modificado (α MEM), y medios 1640 del Roswell Park Memorial Institute (medios RPMI 1640) y similares. Normalmente, a los medios anteriores se añadirá de un 0 a un 20% de suero fetal bovino (SFB) o de 1 - 20% de suero de caballo con el fin de soportar el crecimiento de células estromales y/o condrocitos. Sin embargo, podría utilizarse un medio definido si se identifican y proporcionan los factores de crecimiento, citocinas y hormonas necesarios en el SFB para las células estromales y condrocitos a concentraciones apropiadas en el medio de crecimiento. Los medios útiles en los métodos de la invención pueden contener uno o más compuestos de interés, incluyendo pero no limitándose a antibióticos mitógenos o compuestos diferenciadores para células estromales. Se harán crecer las células a temperaturas de entre 31°C a 37°C en una incubadora humidificada. El contenido en dióxido de carbono se mantendrá de entre un 2% a un 10% y el contenido en oxígeno de entre un 1% y un 22%. Las células permanecerán en este medio durante un periodo de hasta 4 semanas.

Los antibióticos que pueden aportarse como complemento en el medio incluyen, pero no se limitan a penicilina y estreptomicina. La concentración de penicilina en el medio de cultivo químicamente definido es aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomicina en el medio de cultivo químicamente definido es aproximadamente de 10 a aproximadamente de 200 μ g/ml.

Los glucocorticoides que pueden utilizarse en la invención incluyen pero no se limitan a hidrocortisona y dexametasona. La concentración de dexametasona en el medio es aproximadamente de 1 hasta aproximadamente de 100 nM. La concentración de hidrocortisona en el medio es aproximadamente de 1 a aproximadamente 100 nM.

El agente condroinductor se selecciona preferiblemente, de manera individual o en combinación, del grupo que consiste en (i) un glucocorticoide tal como dexametasona; (ii) un miembro de la superfamilia de factor de crecimiento transformante- β tal como proteína morfogénica ósea (bone morphogenic protein - BMP) (preferiblemente BMP-2 o BMP-4), TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFBF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFBF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratocitos (KGF), proteínas osteogénicas (OP-1, OP-2 y OP-3), inhibina A o factor de actividad estimuladora condrogénica (CSA); (iii) un componente de la matriz extracelular de colágeno tal como colágeno I (particularmente en forma de gel); y (iv) un análogo de la vitamina A tal como ácido retinoico y; (v) ascorbato u otro análogo relacionado a la vitamina C.

La concentración del factor de crecimiento transformante-beta es aproximadamente de 1 hasta aproximadamente de 100 ng/ml. La concentración del ácido retinoico es aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 1 μ g/ml.

Ejemplos de compuestos que son mitógenos de células estromales incluyen pero no se limitan al factor de crecimiento transformante- β ; factor de crecimiento de fibroblastos, proteína morfogénica ósea y factores diferenciadores de células estromales incluyen pero no se limitan a dexametasona, hidrocortisona, factor de crecimiento transformante- β , factor de crecimiento de fibroblastos y proteína morfogénica ósea y similares.

Preferiblemente, las células estromales derivadas de tejido adiposo se aíslan de tejido adiposo del sujeto en el que se van a introducir las células diferenciadas finales. Sin embargo, las células estromales también pueden aislarse de cualquier organismo de la misma o diferente especie de la del sujeto. Cualquier organismo con tejido adiposo puede ser un posible candidato. Preferiblemente, el organismo es mamífero, lo más preferiblemente el organismo es un ser humano.

La presente invención también proporciona un método para diferenciar células estromales derivadas de tejido adiposo hacia células condrocíticas mediante la suspensión de células en un alginato de calcio u otra retícula o matriz biocompatible capaz de soportar condrogénesis en una configuración tridimensional. Ejemplos de materiales de retícula incluyen (1) alginato de calcio, un polisacárido de ácido L-glucurónico y D-manurónico reticulado, a concentración de entre un 1% a un 4%, (2) fibrina; (3) colágeno tipo II; o (4) gel de agarosa. Las retículas o matrices que contienen las células se transfieren a placas de cultivo que contienen: (1) un agente condroinductor que puede activar cualquier ruta de transducción celular que conduce al fenotipo de condrocito maduro, en la que el agente condroinductor es un glucocorticoide, individualmente, o en combinación con un agente seleccionado del grupo que consiste en: un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta una molécula de matriz extracelular de colágeno; y un análogo de la vitamina A; (2) un antibiótico; (3) un complemento nutritivo tal como suero fetal bovino y suero de caballo; y (4) ascorbato o un análogo relacionado a la vitamina C.

Las células estromales derivadas de tejido adiposo pueden transfectarse o transducirse de manera estable o transitoria con un ácido nucleico de interés utilizando un plásmido o una estrategia de vector viral o alternativo. Los ácidos nucleicos de interés incluyen, pero no se limitan a, los productos génicos codificantes que potencian la producción de componentes de matriz extracelular que se encuentran en el cartílago; ejemplos incluyen factor de crecimiento transformante- β proteína morfogénica ósea, activita y factor de crecimiento similar a la insulina.

La transducción de vectores virales que portan genes reguladores en células estromales puede llevarse a cabo con vectores virales (adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados, u otro vector) purificados mediante bandeo con cloruro de cesio u otro método con una multiplicidad de infección (unidades virales: células) de entre 10:1 a 2000:1. Las células se expondrán al virus en un medio libre de suero o que contiene suero en ausencia o presencia de un detergente catiónico tal como polietileneimina o Lipofectamine™ durante un período de 1 hora a 24 horas (Byk T. *et al.* (1998) Human Gene Therapy 9:2493-2502; Sommer B *et al.* (1999) Calcio. Tissue Int. 64:45-49).

La transfección de vectores de plásmido que portan genes reguladores en células estromales pueden introducirse en las células en cultivos monocapa mediante el uso de precipitación de ADN con fosfato de calcio o métodos con detergentes catiónicos (Lipofectamine™, DOTAP) o en cultivos tridimensionales mediante incorporación de los vectores de ADN de plásmido de manera directa en el polímero biocompatible (Bonadio J. *et al.* (1999) Nat. Med. 5:753-759).

Para el seguimiento y detección de proteínas funcionales codificadas por estos genes, los vectores de ADN de plásmido o viral contendrá un gen marcador fácilmente detectable, tal como la proteína fluorescente verde o la enzima beta-galactosidasa, dos de las cuales puede realizarse el seguimiento por medios histoquímicos.

Para el desarrollo de vehículos biomecánicos o para la reintroducción de las células estromales en un organismo vivo, los vehículos incluyen pero no se limitan a alginato de calcio, agarosa, colágenos tipos II, III, IV u otra isoforma, fibrina, ácido poli-láctico/poli-glicólico, derivados de hialuronato u otros materiales (Perka C. *et al.* (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:305-311; Sechriest VF. *et al.* (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:534-541; Chu CR *et al.* (1995) J. Biomed. Mater. Res. 29:1147-1154; Hendrickson DA *et al.* (1994) Orthop. res. 12:485-497).

La invención puede utilizarse para la identificación y el estudio de compuestos que potencian la diferenciación de células estromales derivadas de tejido adiposo hacia condrocitos. Los compuestos que potencian la diferenciación pueden ser valiosos en el tratamiento de defectos de cartílago parciales o completos; osteoartritis, cartílago con traumatismo, cirugía cosméticas de defectos congénitos incluyendo fisura del paladar o tabique desviado. Los métodos incluyen pero no se limitan al desarrollo de cultivos *in vitro* tridimensionales que mantienen las células estromales derivadas de tejido adiposo como condrocitos que posteriormente pueden exponerse a compuestos novedosos de interés.

Puede someterse a prueba cualquier compuesto por su capacidad para afectar la diferenciación de las células estromales derivadas del tejido adiposo hacia condrocitos. Los expertos en la técnica conocen excipientes apropiados compatibles con el compuesto que va a someterse a prueba y pueden encontrarse en la edición actual de Remington's Pharmaceutical Sciences (1995, Mack Publishing Co., Easton, PA) cuyo contenido se incorpora en el presente documento mediante referencia.

Las características y ventajas de la presente invención se comprenderán de manera más clara mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes para la invención.

Parte experimental

Diferenciación de células estromales derivadas de tejido adiposo hacia condrocitos

Ejemplo 1

Condrogénesis in vitro utilizando Dexametasona

Se aíslan células estromales de tejido adiposo subcutáneo humano según los métodos descritos en el documento "Métodos y Composición de la diferenciación de preadipocitos humanos hacia adipocitos" número de serie 09/240.029 presentado el 20 de enero de 1999. Las células se disponen en placa a una densidad de 500 a 20.000 células por cm². La presente invención contempla que la creación de una condensación de percartílago *in vitro* favorece la condrogénesis en células progenitoras mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano. Esto se lleva a cabo mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a:

(1) sistema de cultivo de sedimento, que se desarrolló para utilizar en células en placa de crecimiento aislado (Kato *et al.* (1988) PNAS 85:9552-9556; Ballock & Reddi, J. Cell Biol. (1994) 126(5):1311-1318) y se ha utilizado para mantener la expresión del fenotipo de cartílago de los condrocitos situados en el cultivo (Solursh (1991) J. Cell Biochem. 45:258-260).

(2) El método de suspensión en alginato, en el que las células se mantienen en una suspensión de alginato de calcio para evitar el contacto de célula - célula y mantener una morfología redondeada característica que favorece el mantenimiento o adquisición del fenotipo de condrocito.

Se aíslan células derivadas de tejido adiposo tal como se describe anteriormente. Para los cultivos de sedimento, se centrifugaron alícuotas de 200.000 células a 500 g durante 10 minutos en tubos de propileno cónicos estériles de 15 ml en DMEM con un 10% de suero fetal bovino, 50 ng/ml de ascorbato-2-fosfato, dexametasona (DEX) 100 nM y a continuación se incubaron a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂ durante hasta 3 semanas. Para los cultivos

en alginato, las células se suspendieron a una densidad de 1 millón de células por ml en alginato de calcio al 1,2% y se mantuvieron en DMEM con un 10% de suero fetal bovino, 50 ng/ml de ascorbato-2-fosfato, dexametasona (DEX) 100 nM y a continuación se incubaron a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂ durante hasta 3 semanas. Tras 2 ó 4 semanas, se aislaron las células, se fijaron y se analizaron para determinar los marcadores de linaje de condrocito mediante inmunohistoquímica con reactivos de anticuerpo apropiados o mediante tinción con azul de toluidina para detectar la presencia de proteoglicanos sulfatados en la matriz extracelular.

En las figuras 1 a 3 se muestran los resultados obtenidos con un anticuerpo que detecta una proteína marcadora de condrocito representativa, el colágeno II. Las células mantenidas en el cultivo de sedimento (figura 2) o con alginato de calcio (figura 3) se tiñeron positivas mediante inmunofluorescencia por la presencia intracelular de la proteína de colágeno II. Los resultados han de contrastarse con un análisis idéntico de células derivadas de tejido adiposo mantenidas durante 3 semanas en cultivo monocapa tal como se muestra en la figura 1; en este caso, no se observó ninguna tinción.

En la figura 4 se muestran los resultados inmunohistoquímicos con un reactivo de anticuerpo que detecta una proteína marcadora de condrocito, el colágeno VI. Las células estromales derivadas de tejido adiposo se mantuvieron en alginato de calcio al 1,2% y se mantuvieron en DMEM con un 10% de suero fetal bovino, 50 ng/ml de ascorbato-2-fosfato, dexametasona (DEX) 100 nM en ausencia o presencia de factor de crecimiento transformante- β (10 ng/ml) y a continuación se incubaron a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂ durante hasta 2 semanas. La inmunohistoquímica reveló una deposición densa de proteína de colágeno VI que rodean esas células en presencias, pero no en ausencia, del factor de crecimiento transformante- β .

En la figura 5 se muestran los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa que detecta los marcadores génicos representativos asociados con la condrogénesis. Las células estromales derivadas de tejido adiposo se mantuvieron en alginato (Alg) de calcio al 1,2% o en cultivos monocapa (Mono) y se mantuvieron en DMEM con un 10% de suero fetal bovino, 50 ng/ml de ascorbato-2-fosfato, dexametasona (DEX) 100 nM en ausencia (TGF β -) o presencia (TGF β +) de factor de crecimiento transformante- β (10 ng/ml) durante un periodo de 4 semanas. Se aisló el ARN total de cultivos individuales y se utilizó en reacciones en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para colágenos tipos I o VI, la proteína de proteoglicano de unión (Link), agregano, o actina. Los marcadores de colágeno y la actina se detectaron en todas las condiciones de crecimiento, sin embargo los ARN_m de link fueron más abundantes en condiciones de suspensión en alginato y el agregano sólo estuvo presente en condiciones de alginato en presencia de TGF β .

Estos resultados demuestran que, a través de una combinación de crear una condensación celular *in vitro* y añadir los factores permisivos apropiados, se puede producir la expresión de marcadores de condrocito compatibles con condrogénesis en células de tejido adiposo subcutáneo.

Ejemplo 2

Preparación de placa de cartílago sintético

Tras la proliferación, pueden cultivarse las células condrogénicas que todavía tienen un potencial condrogénico de una manera independiente de anclaje, es decir, en un pocillo que tiene una superficie adhesiva a las células, de contacto con las células, con el fin de estimular la secreción de componentes de matriz extracelular específicos.

Hasta ahora, se ha observado que las células condrogénicas se expandían de una manera dependiente de anclaje normalmente desdiferenciándose y perdiendo su capacidad para secretar colágeno tipo II y proteoglicanos sulfatados específicos de cartílago (Mayne *et al.* (1984) Exp. Cell. Res. 151(1):171-82; Mayne *et al.* (1976) PNAS 73(5):1674-8; Okayama *et al.* (1976) PNAS 73(9):3224-8; Pacifici *et al.* (1981) J. Biol. Chem. 256 (2):1029-37; Pacifici *et al.* (1980) Cancer Res. 40(7):2461-4; Pacifici *et al.* (1977) Cell 4:891-9; von der Mark *et al.* (1977) Nature 267 (5611):531-2; West *et al.* (1979) Cell 17 (3):491-501; Oegama *et al.* (1981) J. Biol. Chem. 256(2):1015-22; Benya *et al.* (1982) Cell 30 (1):215-24).

Se ha descubierto que cuando se siembran y cultivan células condrogénicas indiferenciadas en un pocillo que tiene una superficie que contacta con las células que evita la adhesión de las células a la superficie que contacta con las células; las células se vuelven a diferenciar y empiezan a secretar colágeno específico de cartílago y proteoglicanos sulfatados para formar *in vitro* así una placa de cartílago sintético (patentes de los EE.UU. números 5.902.741 y 5.723.331).

Además, se ha encontrado que el cultivo de células en un pocillo preformado, permite fabricar placas de cartílago sintético de un espesor y volumen predeterminados. Se aprecia, sin embargo, que el volumen de la placa de cartílago resultante depende no sólo del volumen del pocillo, sino también del número de células condrogénicas sembradas en el pocillo. Puede prepararse un cartílago de un volumen predeterminado óptimo mediante experimentación de rutina alterando cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente, o ambos.

A. Preparación de pocillo preformado

Hay disponibles diversos enfoques para preparar pocillos preformados con superficies adhesivas a las células, de contacto con las células.

La superficie de contacto con las células del pocillo puede recubrirse con una molécula que evite la adhesión de células condrogénicas a las superficies de contacto con las células. Reactivos de recubrimiento preferidos incluyen reactivos a base de silicona, es decir, reactivos a base de diclorodimetilsilano o politetrafluoroetileno, es decir, Teflón. RTM. En la técnica se conocen muy bien procedimientos para recubrir materiales con reactivos a base de silicona, específicamente diclorodimetilsilano. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, cuya descripción se incorpora en el presente documento mediante referencia. Se comprende que en la puesta en práctica de la presente invención son útiles otros reactivos biocompatibles que evitan la unión de las células a la superficie del pocillo.

De manera alternativa, el pocillo puede fundirse a partir de un material biocompatible maleable o moldeable que de por sí no permita la unión de las células. Materiales preferidos que evitan tal unión celular incluyen, pero no se limitan a, agarosa, vidrio, plástico para cultivo celular sin tratar y politetrafluoroetileno, es decir, Teflón. RTM. Están disponibles en el mercado plásticos para cultivo celular sin tratar, es decir, plásticos que no se han tratado con o que se han hecho con materiales que tienen carga electrostática, y pueden comprarse a, por ejemplo, Falcon Labware, Becton-Dickinson, Lincoln Park, N.J. Sin embargo, los materiales anteriormente mencionados, no pretenden ser limitantes. Se comprende que puede ser útil cualquier otro material biocompatible maleable o moldeable que evite, de manera inherente, la unión de las células condrogénicas en la puesta en práctica de la presente invención.

Puede determinarse el tamaño y la forma del pocillo según el tamaño y forma del defecto de cartílago articular que vaya a repararse. Por ejemplo, se contempla que el pocillo puede tener un área de superficie transversal de 25 cm². Este es el área de superficie transversal promedio de un cóndilo femoral humano adulto. Por consiguiente, se anticipa que puede prepararse una única pieza de cartílago sintético según la invención con el fin de revestir el cóndilo femoral entero. Preferiblemente, la profundidad del pocillo es superior a aproximadamente 0,3 cm y preferiblemente aproximadamente a 0,6 cm en profundidad. El espesor del cartílago articular natural en una unión que articula adulta es, normalmente, de aproximadamente 0,3 cm. Por consiguiente, la profundidad del pocillo debe ser lo suficientemente grande como para permitir que se forme una placa de cartílago de aproximadamente 0,3 cm. Sin embargo, el pocillo también debe ser lo suficientemente profundo como para contener el medio de crecimiento que cubre la placa de cartílago.

También se contempla que un cirujano que lleve a cabo la reparación quirúrgica del cartílago lesionado puede "cortar" una pieza grande de cartílago, preparado según la invención, hasta un tamaño y forma seleccionados previamente. El corte puede llevarse a cabo con el uso de un instrumento de corte afilado, es decir, un bisturí; un par de tijeras o un dispositivo de artroscopia equipado con un borde cortante, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

El pocillo preformado se funde preferiblemente en un bloque de gel de agarosa en condiciones asépticas. La agarosa es un material barato, biocompatible, maleable y moldeable que puede utilizarse para fundir pocillos preformados, de manera rápida y sencilla. Tal como se menciona anteriormente, las dimensiones del pocillo pueden depender del tamaño del parche de cartílago resultante (cartilage plug) que se desee.

Puede prepararse un pocillo preformado mediante el vertido de una disolución caliente de agarosa LT (Biorad, Richmond, CA) en una placa de cultivo tisular que contiene un cilindro. Teniendo el cilindro dimensiones que reflejan la forma del pocillo que va a formarse. El experto puede seleccionar el tamaño y forma del pocillo y pueden depender de la forma del defecto del cartílago articular que va a repararse. Una vez que la agarosa se haya enfriado y solidificado alrededor del cilindro, el cilindro se extrae cuidadosamente con fórceps. La superficie de la placa de cultivo que está expuesta por la extracción del cilindro se cubre con agarosa fundida. Esto sella la parte inferior del pocillo y proporciona una superficie adhesiva a las células en la base del pocillo. Cuando la agarosa LT recién añadida se enfría y solidifica, el pocillo preformado resultante es adecuado para cultivar, y estimular la rediferenciación de las células condrogénicas proliferadas. Sin embargo, se comprende que pueden utilizarse métodos alternativos para preparar un pocillo preformado útil en la puesta en práctica de la invención.

B. Crecimiento de placa de cartílago

En el pocillo preformado pueden sembrarse y cultivarse células condrogénicas proliferadas. Las células pueden diluirse mediante la adición de un medio de cultivo celular a una densidad celular de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^9 células condrogénicas por ml. Un medio de cultivo celular preferido comprende DMEM complementado con un 10% de suero fetal bovino.

En un plazo de aproximadamente cuatro horas desde la siembra de las células condrogénicas en el pocillo, las células pueden fusionarse para formar un tapón cohesivo de células (cohesive plug of cells). A los aproximadamente 4 - 10 días, las células empezarán a secretar proteoglicanos sulfatados y colágeno tipo II específicos de cartílago. Tras periodos prolongados de tiempos en cultivo el colágeno expresado por parte de las células condrogénicas en el pocillo será fundamentalmente colágeno tipo II. Se contempla, sin embargo, que puede extraerse del pocillo el tapón cohesivo de células formado en un plazo de cuatro horas e implantarse en el defecto de cartílago. Se anticipa que las células

condrogénicas indiferenciadas pueden volver a diferenciarse posteriormente *in situ* para formar así cartílago sintético dentro de la articulación.

Se contempla que pueden añadirse factores estimulantes o de diferenciación condrocítica a las células condrogénicas en el pocillo preformado para potenciar o estimular la producción de proteoglucanos y/o colágeno específicos de cartílago articular (Luyten & Reddi (1992) en "Biological Regulation of the Chondrocytes", CRC Presss, Boca Raton, Ann Arbor, Londres y Tokio, págs. 227-236). Factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan al factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFBF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFBF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factores morfogénicos óseos (BMP), es decir, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5 y BMP-6 y las proteínas osteogénicas (OP), es decir, OP-1, OP-2 y OP-3. Concentraciones preferidas de TGF- β , IGF, PDGF, EGF, aFBF, bFBF, HGF, y KGF, oscilan desde aproximadamente de 1 a 100 ng/ml. Concentraciones preferidas de BMP y OP oscilan desde aproximadamente de 1 hasta aproximadamente 500 ng/ml.

Sin embargo, estos factores de crecimiento particulares no son limitantes. Puede ser útil cualquier factor de crecimiento de polipéptido capaz de estimular o inducir la producción de proteoglucanos y colágeno específicos de cartílago en la puesta en práctica de la presente invención.

Además, se contempla que puede añadirse ascorbato a las células condrogénicas en el pocillo preformado para potenciar y estimular la producción de proteoglucanos y colágeno específicos de cartílago. Concentraciones preferidas de ascorbato oscilan de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 μ g/ml.

Ejemplo 3

Reparación quirúrgica de defecto de cartílago articular

En los mamíferos, los defectos de cartílago son fácilmente identificables de manera visual durante un examen artroscópico o durante una cirugía abierta de la articulación. Los defectos de cartílago también pueden identificarse de manera deductiva usando tomografía asistida por ordenador (exploración por TAC), examen con rayos X, imagen por resonancia magnética (IRM), análisis del líquido sinovial o marcadores en suero o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. El tratamiento de los defectos puede efectuarse durante un procedimiento artroscópico o procedimiento quirúrgico abierto usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Por consiguiente, una vez que se ha identificado el defecto, el defecto puede tratarse mediante las siguientes etapas de (1) implantar quirúrgicamente en un sitio predeterminado, una pieza de cartílago articular sintético preparado mediante las metodologías descritas en el presente documento, y (2) permitir que el cartílago articular sintético se integre en el sitio predeterminado.

La placa de cartílago sintético tiene un tamaño y forma de manera óptima de manera que cuando se implanta la placa en el defecto, los bordes del tejido implantado se ponen en contacto directamente con los bordes del defecto. Además, durante el procedimiento quirúrgico, puede fijarse en el lugar la placa de cartílago sintético. Esto puede efectuarse fijando la placa de manera quirúrgica en el defecto con suturas biodegradables, es decir, (Ethicon, Jonson & Jonson) y/o aplicando un bioadhesivo a la región que conecta la placa con el defecto. Los bioadhesivos preferidos incluyen, pero no se limitan a: pegamentos de fibrina - trombina similares a los descritos en la patente francesa nº 2 448 900; patente francesa nº 2 448 901 y patente europea número de serie 88401961.3 y bioadhesivos sintéticos similares a los descritos en la patente de los EE.UU. nº 5.197.973. Sin embargo, se contempla que pueden ser útiles tipos de suturas y pegamentos biocompatibles alternativos en la puesta en práctica de la invención.

En algunos casos, puede extirparse quirúrgicamente el cartílago articular lesionado antes de la implantación de la placa de cartílago sintético. Además, puede potenciarse la adhesión de la placa de cartílago sintético al defecto de cartílago articular tratando el defecto con transglutaminasa (Ichinose *et al.* (1990) J. Biol. Chem. 265(3):13411 - 13414; Naijar *et al.* (1984) in "Transflutaminases", Boston, Martinuse-Nijhoff). Inicialmente, se seca el defecto del cartílago, por ejemplo, utilizando un material algodón (cottonoid), y se rellena con una disolución de transglutaminasa. Posteriormente se extrae la disolución, por ejemplo, por aspiración, dejando sobre el cartílago una película que contiene transglutaminasa. Posteriormente, se implanta la placa de cartílago sintético en el defecto mediante los métodos descritos anteriormente.

Además el cartílago sintético puede ser útil en la reparación de defectos de cartílago articular humano. Por consiguiente, pueden diferenciarse células condrogénicas a partir de células estromales derivadas de tejido adiposo humano, es decir, tejido adiposo subcutáneo humano.

En la técnica se conocen bien procedimientos quirúrgicos para efectuar la reparación de defectos de cartílago articular. Véase por ejemplo: Luyten & Reddi (1992) en "Biological Regulation of the Chondrocytes", CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Londres, y Tokio, págs. 227-236, cuya descripción se incorpora en el presente documento mediante referencia.

ES 2 265 873 T3

Lo anterior demuestra un sistema de cultivo en el que células estromales derivadas de tejido adiposo humano hacia condrocitos hipertróficos. Como se definen todos los componentes, el sistema puede utilizarse para estudios de los efectos de los factores de crecimiento, etc. sobre la progresión de la condrogénesis. Se han utilizado sistemas *in vitro* para demostrar que estas poblaciones celulares tienen potencial osteogénico y adipocítico. En el presente documento se demuestra que esta población tiene potencial condrogénico. Esto tiene aplicabilidad para la reparación de cartílago.

La invención también se refiere a un procedimiento para inducir condrogénesis en células estromales derivadas de tejido adiposo mediante la puesta en contacto *in vitro* de tales células con un agente condroinductor en el que las células estromales se asocian en un formato tridimensional.

Pueden utilizarse condrocitos diferenciados *in vitro* de células estromales derivadas de tejido adiposo en la reparación de tejido articular en mamíferos, incluyendo seres humanos.

En los métodos anteriores, preferiblemente se aíslan y se expanden en cultivo células estromales derivadas de tejido adiposo humano en un medio químicamente definido y se condensan de manera muy próxima, tal como en la forma de una masa celular tridimensional, por ejemplo, células empaquetadas o un sedimento celular de centrifugación (centrifugal cell pellet). Además, la puesta en contacto comprende, preferiblemente, el cultivo de un sedimento de células estromales derivadas de tejido adiposo humano en un medio químicamente definido que comprende DMEM con un 10% de suero, 50 ng/ml de ascorbato-2-fosfato, dexametasona 10^{-7} M. A continuación, las células diferenciadas del se introducen en el sitio quirúrgico para reparar cartílago. Como se definen todos los componentes del sistema, el sistema puede utilizarse como un producto para la reparación de cartílago en mamíferos, incluyendo el hombre y caballos.

REIVINDICACIONES

1. Método para diferenciar células estromales derivadas de tejido adiposo hacia células condrocíticas, que comprende:

a) sedimentar dichas células estromales centrifugando de entre 50.000 a 5 millones de células a 500 x g durante de 2 a 20 minutos en tubos estériles que contienen un medio;

b) disponer en placas células estromales aisladas a una densidad de 500 a 20.000 células/cm² en un medio diferenciador;

c) complementar dicho medio con

i) un agente condroinductor capaz de activar cualquier ruta de transducción de señales celulares que conduce al fenotipo de condrocito maduro, en el que el agente condroinductor es un glucocorticoide, individualmente, o en combinación con un agente seleccionado del grupo que consiste en: un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta; una molécula de matriz extracelular de colágeno; y un análogo de la vitamina A

ii) un antibiótico

iii) un complemento nutritivo con de un 1 a un 20% de suero fetal bovino o de un 1 a un 20% de suero de caballo o cualquier otra combinación equivalente sintética o biológica de proteínas;

iv) ascorbato o análogo de la vitamina C relacionado;

d) incubar dichas células a de aproximadamente 31°C a 37°C durante aproximadamente de 3 - 4 semanas con un 5% de CO₂ y de entre un 1% a un 20% de oxígeno; y,

e) determinar el grado de diferenciación de las células aisladas.

2. Método para diferenciar células estromales derivadas de tejido adiposo hacia células condrocíticas, que comprende:

a) suspender células estromales a una concentración de 0,5 a 10 millones de células por ml en alginato de calcio o cualquier otra retícula o matriz biocompatible capaz de soportar la condrogénesis en una configuración tridimensional;

b) transferir células a placas de cultivo de 35 mm y disponer en placas células a una densidad de 500 a 20.000 células / cm² en un medio diferenciador que comprende un medio de cultivo químicamente definido que tiene o se complementa con;

i) un agente condroinductor capaz de activar cualquier ruta de transducción celular que conduce al fenotipo de condrocito maduro, en el que el agente condroinductor es un glucocorticoide, individualmente, o en combinación con un agente seleccionado del grupo que consiste en: un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta; una molécula de matriz extracelular de colágeno; y un análogo de la vitamina A

ii) un antibiótico

iii) un complemento nutritivo con de un 1 a un 20% de suero fetal bovino o de un 1 a un 20% de suero de caballo o cualquier otra combinación equivalente sintética o biológica de proteínas;

iv) ascorbato o análogo de la vitamina C relacionado;

c) incubar dichas células a de aproximadamente 31°C a 37°C durante aproximadamente de 3 - 4 semanas en una incubadora con un 5% de CO₂ y de entre un 1% a un 20% de oxígeno; y,

d) determinar el grado de diferenciación de las células aisladas.

3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho antibiótico es penicilina.

4. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho antibiótico es estreptomicina.

5. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de penicilina es aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 unidades por ml.

ES 2 265 873 T3

6. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de estreptomicina es aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 μg por ml.

7. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente condroinductor es hidrocortisona.

8. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente condroinductor es dexametasona.

9. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de dexametasona es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM.

10. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de hidrocortisona es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM.

11. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho factor de crecimiento transformante beta se selecciona del grupo que consiste en: proteína morfogénica ósea-2, proteína morfogénica ósea-4, TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante-beta-1), TGF- β 2 (factor de crecimiento transformante-beta-2), TGF- β 3 (factor de crecimiento transformante-beta-3), IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico), aFGF (factor de crecimiento de fibroblastos ácido), bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), KGF (factor de crecimiento de queratocitos), inhibina A, y un factor estimulante condrogénico.

12. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de factor de crecimiento transformante-beta es aproximadamente de 1 a aproximadamente 100 ng por ml.

13. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de TGF- β 1 es aproximadamente de 1 ng/ml a aproximadamente 10 ng/ml.

14. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la molécula de matriz extracelular de colágeno es colágeno I.

15. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el análogo de la vitamina A es ácido retinoico.

16. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de ácido retinoico es aproximadamente de 0,1 ng por ml a aproximadamente 1 μg por ml.

17. Método según la reivindicación 2, en el que la concentración de alginato de calcio es de entre un 1% a un 4%.

18. Método según la reivindicación 2, en el que la redícula biocompatible se selecciona de fibrina, colágeno tipo II o gel de agarosa.

19. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células estromales derivadas de tejido adiposo son células estromales derivadas de tejido adiposo humano.

20. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la célula estromal derivada de tejido adiposo expresa un marcador de condrocito.

FIGURA 1

- Inmunodetección del colágeno tipo II en células estromales adiposas humanas de cultivos monocapa: contraste de fase (parte superior), inmunofluorescencia (parte inferior)

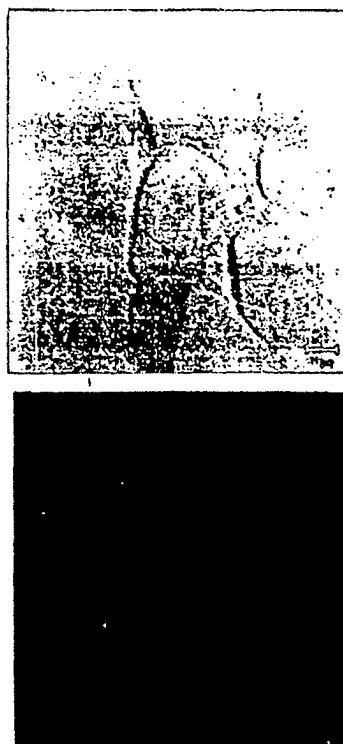


FIGURA 2

- Inmunodetección del colágeno tipo II en células estromales adiposas humanas de cultivos de sedimento: contraste de fase (parte superior), inmunofluorescencia (parte inferior)

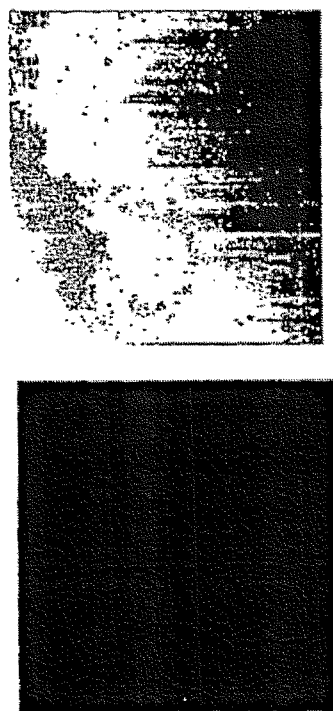


FIGURA 3

- Inmunodetección del colágeno tipo II en células estromales adiposas humanas de cultivos en alginato: contraste de fase (parte superior), inmunofluorescencia (parte inferior)

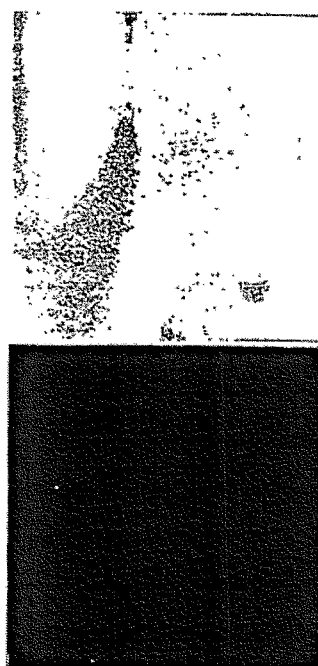


FIGURA 4: Colágeno VI
Alginato a las 2 semanas

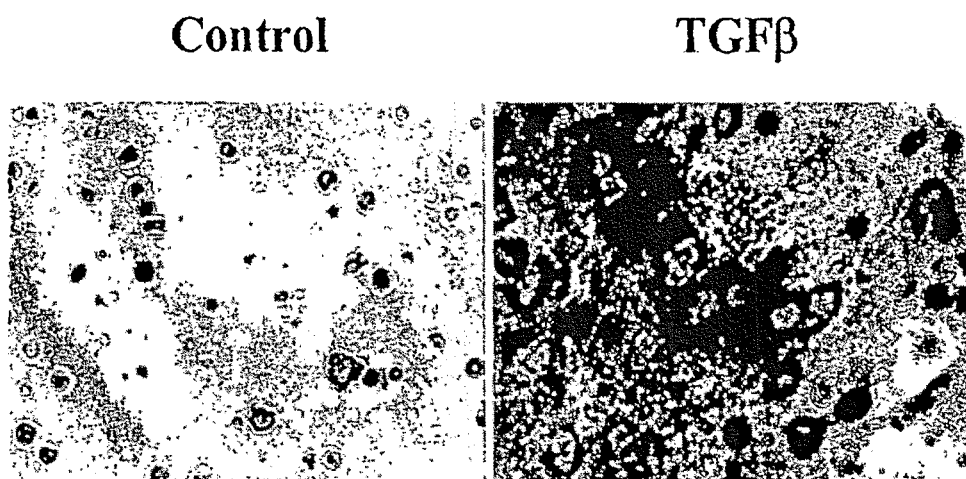


FIGURA 5

