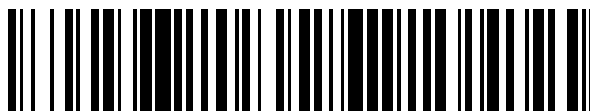


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 278**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077**

(2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014** **E 14738871 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2834349**

54 Título: **Medio que contiene inhibidor de p38 MAPK y método para diferenciación osteogénica**

30 Prioridad:

**20.06.2013 FI 20135675**

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

**07.06.2016**

73 Titular/es:

**TAMPEREEN YLIOPISTO (100.0%)**  
**33014 Tampereen Yliopisto, FI**

72 Inventor/es:

**MIETTINEN, SUSANNA y**  
**VANHATUPA, SARI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

### Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 573 278 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

Medio que contiene inhibidor de p38 MAPK y método para diferenciación osteogénica

## Campo técnico

El campo técnico tratado es el tratamiento de defectos óseos y más específicamente la regeneración de tejido óseo con células madre mesenquimales *in vitro* e *in vivo* en sujetos que lo necesiten. La presente descripción se refiere a la diferenciación de células madre adultas adiposas en células osteoprogenitoras y después en células osteoblastos. Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona un nuevo medio de cultivo que comprende un suplemento que contribuye a la diferenciación rápida y efectiva de células madre en células osteogénicas. Adicionalmente, en la presente memoria se proporciona un componente/medio de cultivo celular que respalda el potencial osteogénico y la capacidad de diferenciación de células madre adiposas humanas, el cultivo celular y el método de diferenciación que utiliza dicho nuevo medio de cultivo suplementado.

## Antecedentes

El consenso actual para la ingeniería de tejidos óseos incluye tres elementos esenciales, a saber, estructura de biomaterial, linaje de célula osteogénica y factores inductores de hueso.

El potencial de tri-linaje de las células madre mesenquimales (MSCs) (linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico) las han convertido en el objeto de la mayoría de estrategias de investigación. Las actividades de investigación se han dirigido al estudio de sus funciones individuales, así como a nuevos conceptos sobre cómo su función colectiva puede ser la estrategia óptima para mejorar la osteogénesis *in vitro* y si esto también podría traducirse en una formación mejorada de hueso *in vivo*.

Los injertos óseos autógenos puede dar como resultado en el paciente morbilidad y dolor en la zona de donante, mientras que los huesos reforzados alogénicos y los materiales sintéticos tienen eficacias variables. Dadas estas limitaciones, los investigadores se han centrado en nuevos tratamientos que permitan una reparación y regeneración ósea segura y exitosa. Las MSCs han atraído la atención por su capacidad para diferenciarse en osteoblastos, células que sintetizan la matriz extracelular y que regulan la mineralización de la matriz. Una regeneración ósea exitosa requiere de tres elementos: MSCs que actúen como progenitores osteoblásticos, factores de crecimiento osteoinductivos y sus rutas que promueven el desarrollo y la diferenciación de las células, así como una estructura de andamio osteoconductiva que soporte el crecimiento celular, la diferenciación y la vascularización. Los tratamientos futuros deberían buscar combinar células madre mesenquimales, estructuras de andamio sembradas con células y factores osteoinductivos para optimizar la eficacia y la seguridad de la reparación tisular y la regeneración ósea.

Según una estrategia tradicional, para fines osteogénicos, lo más prometedor ha sido la médula ósea humana que origina una población de células capaz de diferenciarse a lo largo de múltiples linajes de células mesenquimales. Se han desarrollado técnicas para la purificación y el cultivo-expansión de estas MSCs derivadas de médula ósea humana. Se dispone de sistemas reproducibles para la diferenciación osteogénica *in vitro* de MSC humanas. La diferenciación osteogénica puede obtenerse mediante un medio básico que contenga dexametasona (Dex), 2-fosfato de ácido L-ascórbico (AsAP) o ácido ascórbico, y beta-glicerofosfato (beta GP) y determinarse mediante morfología osteoblástica, expresión de fosfatasa alcalina (APasa), reactividad con anticuerpos monoclonales de superficie celular anti-osteogénicos, modulación de la producción de ARNm de osteocalcina, y la formación de una matriz extracelular mineralizada que contenga hidroxiapatito.

El inhibidor de p38 MAPK SB202190 (ver más adelante) se ha usado para cultivos de condrocitos y dio como resultado una diferenciación osteogénica mejorada de células pericondrales (Stanton & Beier, Experimental Cell Research 313 (2007) 146-155).

## Sumario de la invención

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio efectivo para diferenciar células madre adiposas humanas (hASCs) en células osteoprogenitoras y después en células osteoblastos. Los inventores de la presente han descubierto sorprendentemente que un medio que comprende un inhibidor de p38 MAPK, a una concentración de 0,1  $\mu$ M a menos de 10  $\mu$ M, contribuye a la progresión escalonada de células desde hASCs vía precursores no diferenciados a osteoblastos secretores.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medio simplificado que diferencie de forma efectiva hASCs en células osteoprogenitoras y después en células osteoblastos.

Un objetivo relacionado es proporcionar un medio efectivo para promover y guiar la diferenciación de células madre mesenquimales adicionalmente hasta células osteoblastos.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método que usa dicho medio, especialmente un inhibidor de p38 MAPK.

Un objetivo de las realizaciones de la presente invención es resolver algunos problemas de la técnica anterior. Los inventores de la presente sorprendentemente han conseguido producir células osteoblastos mediante diferenciación de hASCs en un medio de cultivo que comprende un inhibidor de p38 MAPK.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona un medio de diferenciación efectivo para diferenciar hASCs en células osteoprogenitoras y adicionalmente de forma ventajosa en células osteoblastos que comprenden un inhibidor de p38 MAPK. Preferiblemente dicho medio de cultivo celular se usa para la diferenciación de hASCs para producir células osteoblastos o precursores celulares. Por tanto, en la presente memoria se proporciona un método para producir células osteoblastos, células osteoprogenitoras o poblaciones de las mismas, comprendiendo dicho método la diferenciación de hASCs en dicho medio de diferenciación.

Otros objetivos, realizaciones, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, la siguiente descripción detallada, los siguientes ejemplos y las siguientes reivindicaciones dependientes.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra un perfil de expresión de marcador superficial de hASCs usadas en ensayos de diferenciación osteogénica.

Figura 2: ilustra el análisis de fosfatasa alcalina (ALP) en varios medios y para varias líneas celulares. Los resultados han sido normalizados a la cantidad de ADN. BM denota medio basal, SB un inhibidor de p38 MAP quinasa y OM medio osteogénico. En la Figura 2A dichos medios de diferenciación (BM+SB y OM) son comparados con BM como control. En las Figuras 2B y 2C se analizan dos líneas celulares a dos tiempos (después de 7 y de 14 días) para demostrar la aplicabilidad del presente medio para diferenciar individuos y la predictibilidad en ese sentido.

Figura 3: muestra los resultados de un análisis cuantitativo de Rojo de Alizarina/mineralización de la línea celular de paciente 41/12 con y sin inhibidor SB en el punto temporal de 21 días. Estos resultados ilustran el potencial del inhibidor SB como potenciador de procesos avanzados de osteogénesis.

Figura 4: ilustra los rangos de concentración efectiva de inhibidores de p38 MAPK en la diferenciación osteogénica de hASCs. En la Figura 4A, se muestra el efecto del inhibidor SB 202190 (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M ó 10  $\mu$ M) en medio básico (BM) sobre la actividad de fosfatasa alcalina cuantitativa de hASCs (línea celular de paciente 1/13) en el día 14. En la Figura 4B, se muestra el efecto del inhibidor JX401 (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M ó 10  $\mu$ M) en medio básico (BM) y medio osteogénico (OM) sobre la actividad de fosfatasa alcalina cuantitativa de hASCs (línea celular de paciente 15/12) en los días 7 y 14. La Figura 4C muestra el efecto del inhibidor SB 202190 (2  $\mu$ M ó 5  $\mu$ M) en BM y OM sobre los niveles de mineralización cuantitativa (Rojo de Alizarina) de hASCs (línea celular de paciente 11/13) en el día 14. BM denota DMEM/F12+ suero humano al 5% (HS, PAA Laboratories, Pasching, Austria); OM denota DMEM/F12+ 5% HS + 2-fosfato de ácido L-ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato, dexametasona.

### Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona un medio y un método para la diferenciación de hASCs en precursores osteogénicos o células osteoblastos, comprendiendo dicho método un inhibidor de p38 MAP quinasa. Se ha descubierto que dicho medio mejora la eficacia de diferenciación en células osteoprogenitoras, según se determina con un marcador de proteína (ALP) y/o mediante mineralización en condiciones de cultivo celular. Este medio de diferenciación contribuye muy probablemente a la inhibición de dichas hASCs frente a la diferenciación adipogénica y las guía hacia células osteogénicas. Más específicamente, controla las proteínas de señalización implicadas en la adipogénesis y en particular proporciona moléculas para inhibir dichas proteínas de señalización. Con esto, los prerequisites para la diferenciación osteogénica están favorecidos frente a los del tejido adiposo.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan varias ventajas. El uso de hASCs permite transferencia de células autólogas. El uso de las propias células del paciente alivia o elimina los problemas relacionados con el rechazo. Las células madre adiposas humanas pueden usarse con seguridad y se pueden aislar fácilmente en adultos humanos en grandes cantidades, son fáciles de mantener en cultivo, y por lo tanto representan una fuente autóloga de células ideal. En humanos, muchos tipos de células, tales como las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana, no son fácilmente accesibles sin llevar a cabo procedimientos altamente invasivos y a veces arriesgados. Además, algunas fuentes de células son poco frecuentes y no están disponibles en cantidades grandes, lo que las convierte en malos candidatos para reprogramación en una instalación clínica.

Las ASCs humanas tienen tendencia a formar células grasas. Ahora se ha demostrado sorprendentemente que con el medio y/o el método según las presentes reivindicaciones, se puede inhibir la susceptibilidad hacia la diferenciación en células grasas y, por tanto, dichas células madre se diferenciaron en células osteoblastos.

Ahora se ha proporcionado un medio eficaz para diferenciar hASCs en células osteoprogenitoras y después en células osteoblastos. Los inventores de la presente han descubiertos sorprendentemente que un medio que comprende un inhibidor de p38 MAPK contribuye a la progresión por etapas de células a partir de precursores no diferenciados en osteoblastos secretores.

**p38 MAPK e inhibición de la misma**

Las proteína quinasas están implicadas en varias respuestas celulares a señales extracelulares. La proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAP, del inglés “p38 Mitogen-Activated Protein”) (también denominada quinasa p38 ó “quinasa de respuesta de glicerol de alta osmolaridad” (HOG, del inglés “High Osmolarity Glycerol response kinase”)) es un miembro de una familia de moléculas de señalización conocida como familia de proteína quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasa o MAPK). Otros miembros de la familia de MAP quinasa incluyen las MAPKs clásicas denominadas quinasas reguladas por señal extracelular (ERK, del inglés “Extracellular signal Regulated Kinases”), que son activadas por una variedad de estímulos mitogénicos, así como por señales de diferenciación.

La p38 MAP quinasa es activada por una variedad de estresadores celulares, que incluyen la radiación ultravioleta, el choque osmótico y las citocinas inflamatorias, tales como la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral-[alfa] (TNF-[alfa]). Una vez activada, la p38 MAP quinasa media en la inducción de la síntesis de ARNm para una variedad de mediadores inflamatorios, que incluyen la IL-1[beta], el TNF-[alfa], la IL-6 y la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2). Se han identificado cuatro isoformas de la p38 MAP quinasa y se han designado como p38[alfa], p38[beta], p38[gamma] y p38[delta]. La p38[alfa] también se denomina p38. La p38[beta] también se denomina p38-2. La p38[gamma] también se denomina ERK6. La p38[delta] también se denomina SAPK4. Estas isoformas difieren en los patrones de expresión de tejido, la utilización de sustrato, la respuesta a estímulos directos e indirectos y la susceptibilidad a inhibidores de quinasa. (Yang et al., 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que la activación de p38[beta] MAP quinasa da como resultado hipertrofia de miocitos, mientras que la activación de p38[alfa] MAP quinasa conduce a apoptosis de miocitos. En el contexto de la presente invención de los inhibidores de p38 MAPK, la p38[alfa] ha mostrado experimentalmente resultados prometedores.

La inhibición de la p38 MAP quinasa conduce al bloqueo de la producción de IL-1 y TNF. La IL-1 y el TNF estimulan la producción de otras citocinas proinflamatorias tales como la IL-6 y la IL-8 y han sido implicadas en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y en la osteoporosis postmenopáusica. En base a este descubrimiento, se cree que la p38 MAP quinasa, junto con otras MAPKs, desempeñan una función de mediación en la respuesta celular a estímulos inflamatorios, tales como la acumulación de leucocitos, la activación de macrófagos/monocitos, la resorción de tejido, la fiebre, las respuestas de fase aguda y la neutrofilia. Adicionalmente, las MAPKs, tales como la p38 MAP quinasa, han sido implicadas en el cáncer, la agregación de plaquetas inducida por trombina, trastornos de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes, muerte celular, alergias, osteoporosis y trastornos neurodegenerativos.

Las moléculas que actúan como inhibidores de p38 MAPK han sido estudiadas ampliamente y están disponibles comercialmente. Las publicaciones que discuten los diferentes inhibidores de p38 MAPK son, p.ej., WO 0012074 (A2), WO 0026209 (A1) y EP1142890 (B1). Los ejemplos de moléculas pequeñas disponibles comercialmente son, p.ej., trans-1-(4-hidroxyciclohexil)-4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxipirimidin-4-il)imidazol (SB 239063, Sigma-Aldrich), LY3007113 (Lilly) y 2,2'-Sulfonil-bis-(3,4,6-triclorofenol) (Calbiochem). La selección del inhibidor de p38 MAPK a partir de moléculas pequeñas proporciona beneficios en la administración. Preferiblemente, dicho inhibidor es una molécula orgánica que tiene una masa molar relativamente baja, p.ej., una molécula pequeña que tiene una masa molecular inferior a 800 g/mol, preferiblemente inferior a 500 g/mol.

Cuando se selecciona dicho inhibidor de p38 MAPK a partir de sustancias obtenibles mediante síntesis química o producción recombinante, se puede proporcionar un medio definido. En la presente memoria, el término “medio definido” se refiere a una composición, en donde el medio tiene cantidades conocidas de todos los ingredientes. Dicho inhibidor también puede usarse en un medio de diferenciación que está suplementado con HS autólogas (del propio individuo) (autoHS). Típicamente, el contenido del inhibidor de p38 MAPK en el medio de diferenciación está entre 0,1  $\mu$ M y menos de 10  $\mu$ M, preferiblemente entre 1  $\mu$ M y 8  $\mu$ M y más preferiblemente entre 2  $\mu$ M y 6  $\mu$ M. En algunos ejemplos específicos, la concentración del inhibidor de p38 MAPK es de 2  $\mu$ M ó 5  $\mu$ M.

En una realización, el inhibidor de p38 MAPK es 4-(4-Fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol (SB 202190) disponible, p.ej., en Sigma-Aldrich. En una realización preferida, la concentración del mismo está entre 0,1  $\mu$ M y menos de 10  $\mu$ M, preferiblemente entre 1  $\mu$ M y 8  $\mu$ M, y más preferiblemente entre 2  $\mu$ M y 6  $\mu$ M. En algunos ejemplos específicos, la concentración de SB 202190 es de 2  $\mu$ M ó 5  $\mu$ M.

En otra realización, el inhibidor de p38 MAPK es 1-[2-Metoxi-4-(metiltio)benzoil]-4-bencilpiperidina (JX401) disponible, p.ej., en Calbiochem. En una realización preferida, la concentración de JX401 está entre 0,1  $\mu$ M y menos de 10  $\mu$ M, preferiblemente entre 1  $\mu$ M y 8  $\mu$ M, y más preferiblemente entre 2  $\mu$ M y 6  $\mu$ M. En algunos ejemplos específicos, la concentración de JX401 es de 2  $\mu$ M ó 5  $\mu$ M.

**Kit**

El especialista en la técnica está familiarizado con diferentes concentraciones de medio de cultivo. A menudo, el medio de cultivo es diluido y preparado en la composición final inmediatamente antes de su uso. Por lo tanto, se entiende que también se describe cualquier disolución de reserva o kit de preparación adecuado para su uso en dicha preparación inmediata. Por ejemplo, para la preparación de un medio de diferenciación según la presente descripción, un kit de diferenciación es una herramienta común. En la presente memoria se describe un kit de

diferenciación que comprende un inhibidor de p38 MAPK para la preparación de un medio de diferenciación. Se entiende que después de la preparación de dicho medio, las células madre adiposas son incubadas en él durante un periodo de tiempo y se obtienen las células osteoprogenitoras u osteoblastos. Por ejemplo, para la preparación de un medio de cultivo según la presente descripción, un kit de diferenciación comprende un inhibidor de p38 MAPK y opcionalmente otros componentes, tal como un medio basal o también los suministros para la preparación del mismo.

### Células madre adiposas

Las ASCs humanas (hASCs) son una fuente de células madre atractiva y abundante con aplicabilidad terapéutica en diversos campos para la reparación y la regeneración de tejidos dañados de forma aguda y crónica. Cabe destacar que, al contrario que las células madre/estromales de médula ósea humanas (BMSCs) que están presentes con una frecuencia muy baja en la médula ósea, las hASCs pueden recuperarse en un número elevado de tejidos aspirados en liposucción o de fragmentos de tejido adiposo subcutáneo, y pueden expandirse *in vitro* fácilmente. Las ASCs presentan propiedades similares a las observadas en las BMSCs y, tras inducción, se ven sometidas a diferenciación osteogénica, condrogénica, adipogénica y neurogénica *in vitro*. Adicionalmente, se ha demostrado que las hASCs son inmunoprivilegiadas, previenen la enfermedad injerto-contrahospedante grave *in vitro* e *in vivo* y son genéticamente estables en cultivos de larga duración. También han demostrado aplicabilidad en otras funciones, tales como proporcionar soporte hematopoiético y transferencia génica. Debido a estas características, las hASCs han avanzado rápidamente a ensayos clínicos para el tratamiento de un amplio rango de afecciones (Lindroos et al., 2010).

Un beneficio de la presente invención es que proporciona un medio simplificado para la diferenciación de células madre adultas adiposas en células osteoprogenitoras y después en células osteoblastos. Aquí simplificado se refiere a la comparación con los medios del estado de la técnica, en donde son necesarios varios componentes que contribuyen a la diferenciación. En el medio osteogénico del estado de la técnica, el mecanismo y la contribución de cada uno de los suplementos al medio de base, 2-fosfato-ácido L-ascórbico (AsAP),  $\beta$ -glicerofosfato, dexametasona, son desconocidos y por tanto son difíciles de controlar para responder a las diversas necesidades y situaciones.

Otra ventaja del presente método es la eficacia de diferenciar hASCs en células osteoprogenitoras y después en células osteoblastos. Es especialmente apreciable la diferenciación preferida en células osteogénicas en lugar de en células adipogénicas.

Otra ventaja adicional es que la presente composición de diferenciación proporciona una alternativa al medio osteogénico del estado de la técnica, que contiene varios componentes cuyo mecanismo de diferenciación no se conoce completamente.

Según una realización de la invención, se proporciona un inhibidor de p38 MAPK junto con biomaterial osteoinductivo, que libera moléculas de inhibidor según se descompone *in vivo*. En la presente memoria, un material osteoinductivo se refiere a cualquier material biocompatible que es capaz de inducir la osteogénesis, esto es, formación de hueso, de ASCs.

### Medio de diferenciación

Los medios usados para el cultivo celular tienen un impacto importante en el crecimiento y la diferenciación de ASCs. En el contexto de la presente invención, las hASCs pueden llevarse a placa y ser expandidas en medios de cultivo clásicos que contienen disoluciones salinas equilibradas tales como el Medio Esencial Mínimo MEM, el medio de Eagle modificado de Dulbecco, DMEM, el medio desarrollado por Moore et al., en el Roswell Park National Institute,  $\alpha$ MEM, y DMEM:F-12 (Mezcla Nutriente F-12) suplementado con suero bovino fetal (FBS) o con suero humano (HS).

En algunas realizaciones, el medio puede estar suplementado con suero. Desde el punto de vista del cultivo, la suplementación con suero es ventajosa porque proporciona a las células nutrientes vitales, factores de unión y factores de crecimiento. Sin embargo, las especies de origen y las concentraciones de suero afectan a la proliferación de las ASCs. Por ejemplo, se sabe que el FBS es rico en factores de crecimiento y estimula la acumulación de proteínas en los cultivos celulares. Sin embargo, la sustitución del FBS por derivados de HS, tales como el suero AB alogeneico, el plasma rico en plaquetas activado por trombina y el lisato de plaquetas humanas dan lugar a tasas de proliferación iguales o superiores y a una capacidad de diferenciación multilínea en las ASCs.

Por tanto, como realización de la presente invención, proporcionar un medio de diferenciación autoHS solventa estos problemas. El autoHS elimina el problema de introducir anticuerpos xenogéneos o alogéneos en el paciente. Sin embargo, los resultados en términos de tasa de proliferación y de potencial de diferenciación pueden estar comprometidos.

Adicionalmente, la utilización de autoHS para la producción de células madre a gran escala para aplicaciones clínicas está impedida debido a la limitada disponibilidad y a la alta variabilidad en el crecimiento celular en autoHS. La composición de suero permanece ampliamente sin caracterizar, conteniendo cantidades variables de citocinas y

factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), BMPs y factor de crecimiento epidérmico (EGF), y mostrando alguna variabilidad significativa entre lotes que puede afectar a la reproducibilidad.

#### Uso del medio de diferenciación

- 5 El medio o el método de diferenciación encuentran uso en la producción de células osteoprogenitoras, población de células osteoprogenitoras, células osteoblastos o población de células osteoblastos. Éstos son productos que es de esperar contribuyan al tratamiento y la investigación de afecciones, enfermedades y patologías esqueléticas, así como a la toxicología y el desarrollo de fármacos.

#### Cultivo celular

- 10 Cuando se explotan los medios de diferenciación según la presente invención, en condiciones adecuadas conocidas por el especialista en la técnica, se establece un cultivo celular. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionar un cultivo celular que comprende una célula madre adulta adiposa y un medio de diferenciación según las reivindicaciones de la presente invención. Cultivando dicho cultivo según el método descrito en la presente invención, se pueden recolectar células osteoprogenitoras y/u osteoblastos para un uso posterior.

#### 15 Método para diferenciar células osteoprogenitoras

- El método para diferenciar células osteoprogenitoras *in vitro* comprende cultivar células madre en un medio de diferenciación que comprende un inhibidor de p38 MAPK. El tiempo requerido para la diferenciación depende del propósito, pero son ventajosas las aplicaciones *in vitro* con una duración de 7 d y 14 d. En el método, se puede seleccionar cualquier realización descrita cuando se discute el medio de diferenciación y alternativas de la misma, dependiendo de los objetivos y las condiciones considerados.

- 20 Cuando se aplica el presente método, la diferenciación se puede seguir a través de indicadores conocidos. El más habitual son las proteínas expresadas o que pueden analizarse de algún modo a partir de las células, el medio o el cultivo celular. Preferiblemente, la diferenciación, y con ella la presencia de células osteoprogenitoras, se monitoriza y se confirma analizando la expresión de un marcador de osteoblasto, de los cuales el más preferible es la fosfatasa alcalina (ALP). La indicación positiva puede detectarse cuando la mayoría de dichas células osteoprogenitoras expresan un marcador osteoblasto. Otra indicación en la mineralización. En presencia de condiciones osteogénicas apropiadas, las ASCs maduran hacia osteoblastos cuando comienzan a producir mineral de fosfato cálcico dentro de la matriz extracelular. La mineralización puede detectarse mediante el método de tinción con Rojo de Alizarina.

#### Reparación de tejido óseo

- 30 La capacidad de las ASCs en la reparación de tejido óseo no ha sido investigada de forma amplia. En la técnica anterior se conoce un caso en el que un defecto de hueso calvaria se trató con células de fracción vascular estromal (SVF) autólogas aisladas y aplicadas en un único procedimiento operativo en combinación con hueso autólogo molido procedente de la cresta ilíaca. Las células SVF fueron soportadas en el lugar usando pegamento de fibrina autóloga, y la fijación mecánica se consiguió mediante dos láminas macroporosas reabsorbibles grandes que actuaron como barrera de tejido blando. El curso postoperatorio no tuvo episodios y se observó la formación de hueso y una continuidad del hueso calvaria casi completa tres meses después de la reconstrucción (Lendeckel et al., 2004).

- En otro caso de la técnica anterior, el problema con la recolección de hueso autólogo se solventó usando un injerto de material compuesto que consistió en ASCs autólogas combinadas con un material sintético sustitutivo de hueso, beta-fosfato tricálcico,  $\beta$ TCP y rhBMP-2. Para este propósito, se expandieron las ASCs *ex vivo* y se combinaron con  $\beta$ TCP y rhBMP-2 antes de los procedimientos clínicos de trasplante. Adicionalmente, las ASCs autólogas fueron manejadas en cuartos limpios según las regulaciones GMP actuales. La curación de postoperatorio no tuvo episodios, se habían desarrollado estructuras óseas maduras dentro de la construcción, y se llevó a cabo una rehabilitación adicional con implantes dentales (Mesimäki et al., 2009). Hasta el momento, 25 pacientes con defectos craneomaxilofaciales han sido tratados usando construcciones similares. Los detalles de los protocolos relacionados con la regeneración ósea y el uso de biomaterial en los mismos se describen más específicamente en Sándor et al. 2013 y en Thesleff et al. 2013, ambas incorporadas a modo de referencia a la presente memoria.

- Según una realización de la invención, se proporciona un inhibidor de p38 MAPK junto a un biomaterial osteoinductivo, que libera moléculas de inhibidor según se descompone *in vivo*, contribuyendo dicho inhibidor de p38 MAPK liberado a la diferenciación de células madre adiposas en células osteoprogenitoras, células osteoblastos, población celular osteoprogenitora, población celular osteoblasto o tejido óseo. Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona un método para diferenciar células madre adultas adiposas en células osteoprogenitoras *in vivo* que comprende la administración de un inhibidor de p38 MAPK al sujeto que lo necesite. Una realización es un trasplante que comprende una célula madre adulta adiposa, un inhibidor de p38 MAPK y biomaterial osteoinductivo. Alternativamente, puede considerarse que una célula madre adulta adiposa no es trasplantada necesariamente sino

que el inhibidor de p38 MAPK contribuye a la diferenciación de las células madre adultas adiposas presentes en el sitio del trasplante.

### Procedimiento experimental

El estudio se llevó a cabo de acuerdo al comité de ética del "Pirkanmaa Hospital District", Tampere, Finlandia (R03058). Las ASCs fueron aisladas de muestras de tejido adiposo subcutáneo obtenido bajo consentimiento escrito de 4 donantes femeninas (edad,  $44 \pm 7$  años) que fueron sometidas a procedimientos quirúrgicos en el Departamento de Cirugía Plástica, Hospital Universitario de Tampere, Finlandia. El aislamiento de hASCs de muestras de tejido adiposo se llevó a cabo usando un método mecánico y enzimático. El tejido adiposo se picó manualmente para obtener fragmentos pequeños y se sometió a digestión con collagenasa NB 6 GMP Grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania) en un baño de agua a 37°C con agitación. El tejido digerido fue sometido a centrifugación y se filtró en etapas secuenciales a través de un filtro con tamaño de poro 100 µm para separar las ASCs del tejido circundante. Las células fueron expandidas en matraces T75 y se sometieron a pasaje tras alcanzar un 80% de confluencia. La expansión se llevó a cabo en DMEM/F-12 1:1 (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con un 1% de l-anilil-l-glutamina (GlutaMAX I; Life Technologies, Gibco), 1% de antibióticos (p/s; 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomycin; Lonza, BioWittaker, Verviers, Bélgica) y 10% de HS (PAA Laboratories). Las ASCs fueron separadas usando TrypLE Select (Life Technologies, Gibco). Se analizó el perfil de marcador de superficie celular (Figura 1) usando citometría de flujo (FACSria; BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) como se describe en Patrikoski et al. (2013).

Se estudió experimentalmente el efecto obtenible con el presente medio y el presente método. La diferenciación en células osteogénicas se analizó siguiendo fosfatasa alcalina (ALP) como marcador osteogénico temprano y la mineralización como marcador del proceso osteogénico avanzado. La Figura 2 ilustra la expresión de proteína del análisis de fosfatasa alcalina (ALP) en varios medios. Los resultados han sido normalizados a la cantidad de ADN. BM denota medio basal, SB un inhibidor de p38 MAP quinasa SB 202190 y OM un medio osteogénico. En la Figura 2A se comparan los resultados de estos medios de diferenciación (BM+SB y OM) con BM como control. En la Figura 2B y 2C se analizan los resultados de dos líneas celulares procedentes de pacientes diferentes a dos tiempos (tras 7 y 14 días) para mostrar la independencia de la fuente (líneas de paciente) del presente medio y la predictibilidad inter-paciente en ese sentido. En estos experimentos, se usó SB a una concentración de 2 µM.

Los resultados indicaron que la proteína p38 MAPK tiene un impacto decisivo en la prevención de la diferenciación osteogénica. Por otro lado, la inhibición de dicha proteína con una molécula inhibidora, aquí SB202190, condujo a la diferenciación osteogénica en un medio basal a un nivel casi igual al obtenido mediante el uso de un medio osteogénico. Un descubrimiento muy importante fue que el marcador de fosfatasa alcalina, y por tanto la diferenciación, pudo detectarse en todas las líneas celulares de pacientes.

La Figura 3 representa un análisis de mineralización cuantificado de rojo de alizarina de ASCs en medio basal, medio osteogénico, con y sin inhibidor de SB (2 µM) a los 21 días.

En experimentos adicionales, se analizó el efecto de un gradiente de concentración de dos inhibidores de p38 MAPK diferentes, es decir SB 202190 y JX401, sobre la diferenciación osteogénica de hASCs. En primer lugar, se estudió el efecto del inhibidor SB202190 en un rango de concentración de 2 a 10 µM sobre hASCs en condiciones de cultivo de BM. Los resultados indicaron que las concentraciones de 2 y 5 µM claramente potenciaron la actividad de ALP de las células. Sin embargo, a 10 µM, la actividad de ALP disminuyó en comparación con las otras dos concentraciones (Figura 4A). Para confirmar estos resultados, se analizó el efecto de otro inhibidor de p38 MAPK, el JX401, sobre la actividad de ALP de hASCs. En este caso, el análisis se llevó a cabo tanto en medio BM como en medio osteogénico (OM). En BM, el máximo de concentración funcional fue a 5 µM pero también fue efectivo a 2 µM en comparación con la mayor concentración, 10 µM. Sin embargo, en OM la concentración más efectiva de inhibidor JX401 fue de 2 µM (Figura 4B).

Para analizar cómo afectan los inhibidores de p38 MAPK a la progresión de la diferenciación osteogénica, se llevó a cabo un ensayo de mineralización con rojo de alizarina en condiciones tanto BM como OM. En ambas condiciones de cultivo, el inhibidor SB202190 obtuvo un máximo a la concentración de 2 µM, pero en OM también se mostró funcional a 5 µM (Figura 4C).

Considerados en conjunto, estos resultados indican que concentraciones inferiores a 10 µM, preferiblemente de 0,1 a 5 µM, constituyen el rango de concentración funcional de los inhibidores de p38 MAPK para inducir la diferenciación osteogénica de hASCs en condiciones tanto BM como OM.

En los anteriores experimentos, el medio basal usado fue DMEM/F12 + 5% de suero HSPaa. Dicho inhibidor de p38 MAP quinasa, SB 202190, procedía de Sigma-Aldrich, mientras que el JX401 era de Calbiochem. El medio osteogénico que representa el estado de la técnica era un medio de base suplementado con 2-fosfato-ácido L-ascórbico (AsAP), β-glicerolfosfato y dexametasona.

El mecanismo subyacente no está claro para los inventores de la presente. Sin embargo, como explicación más probable, se cree que la diferenciación es efectuada vía inhibición de p38 MAPK y el alejamiento de la misma de las

células grasas. Los resultados experimentales apoyan esta teoría, ya que un experimento similar con células madre derivadas de célula ósea no exhibió un efecto similar en la diferenciación (resultados no mostrados).

#### Referencias

- 5 Lendeckel, S., Jodicke, A., Christophis, P., et al. (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, 32, 370-373.
- Lindroos, B., Suuronen, R., Miettinen, S., (2010). The Potential Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem. Cell Rev and Per*, Humana Press, DOI 10.1007/s12015-010-9193-7.
- 10 Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S., Suuronen, R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar; 38 (3): 201-9.
- Sándor, G.K., Tuovinen, V.J., Wolff, J., Patrikoski, M., Jokinen, J., Nieminen, E., Mannerström, B., Lappalainen, O.-P., Seppänen, R., Miettinen, S. Adipose Stem Cell Tissue-Engineered Construct Used to Treat Large Anterior Mandibular Defect: A Case Report and Review of the Clinical Application of Good Manufacturing Practice –Level Adipose Stem Cells for Bone Regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 May; 71 (5): 938-50.
- 15 Thesleff, T., Lehtimäki, K., Niskakangas, T., Mannerström, B., Miettinen, S. Suuronen, R., Öhman, J. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial. A novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery*. 2011 Jun; 68 (6): 1535-40.



# REIVINDICACIONES

1. Un medio de diferenciación osteoinductivo para la diferenciación de células madre adiposas humanas (hASCs) en células osteoprogenitoras, comprendiendo el medio un inhibidor de p38 MAPK a una concentración de 0,1 a menos de 10  $\mu$ M, en donde el inhibidor de p38 MAPK es
- 5        4-(4-Fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol
- 6
- 1-[2-Metoxi-4-(metiltio)-benzoil]-4-bencilpiperidina.
2. El medio de diferenciación osteoinductivo según la reivindicación 1, en donde la concentración del inhibidor de p38 MAPK está entre 2 y 6  $\mu$ M.
- 10    3. El medio de diferenciación osteoinductivo según la reivindicación 1, en donde la concentración del inhibidor de p38 MAPK está entre 2 y 5  $\mu$ M.
4. El medio de diferenciación osteoinductivo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en suero humano sustancialmente autólogo (autoHS) y/o componentes definidos.
- 15    5. Un cultivo celular que comprende hASCs y medio de diferenciación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un método para diferenciar células osteoprogenitoras in vitro que comprende cultivar hASCs en un medio de diferenciación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. El método según la reivindicación 6, en donde la mayoría de dichas células osteoprogenitoras expresan un marcador de osteoblastos.
- 20    8. El método según la reivindicación 7, en donde dicho marcador de osteoblastos es fosfatasa alcalina (ALP).
9. El método según la reivindicación 7 u 8, en donde la mayoría de dichas células osteoprogenitoras exhiben un resultado positivo en el ensayo con rojo de alizarina.
10. El uso del medio de diferenciación osteoinductivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o del método según una cualquiera de las reivindicaciones 6-9 para producir células osteoprogenitoras, población celular osteoprogenitora, células osteoblastos o población celular osteoblasto.
- 25    11. Un trasplante aislado que comprende un inhibidor de p38 MAPK 4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol ó 1-[2-metoxi-4-(metiltio)-benzoil]-4-bencilpiperidina a una concentración de 0,1 a menos de 10  $\mu$ M; un biomaterial osteoinductivo; y opcionalmente células madre adultas adiposas.

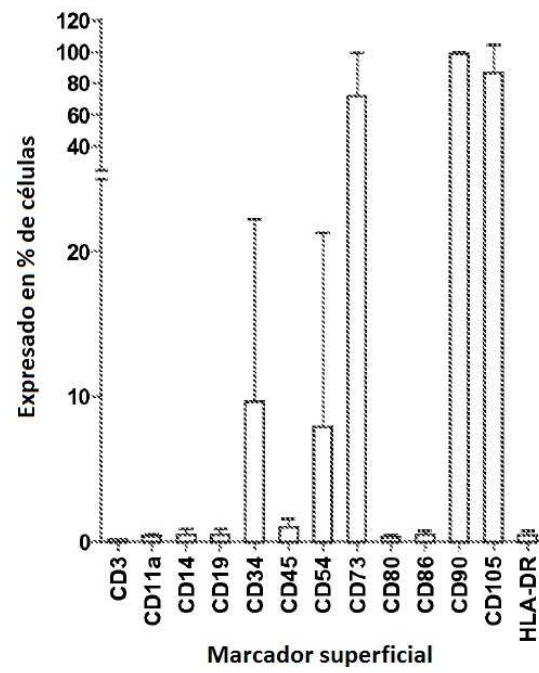


Fig. 1

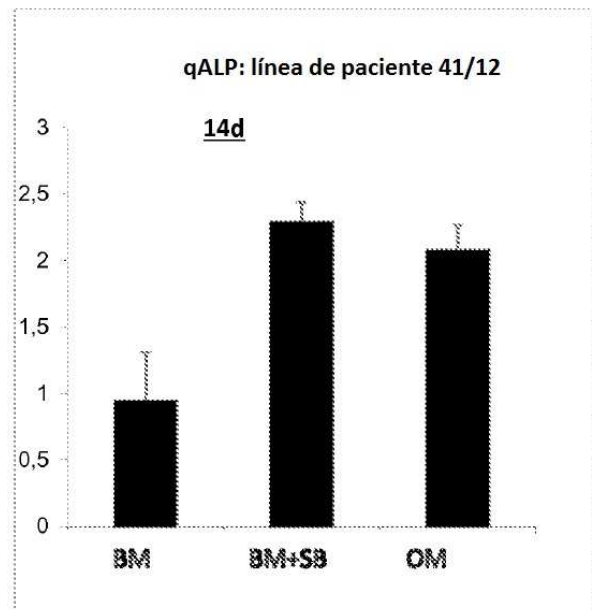


Fig. 2A

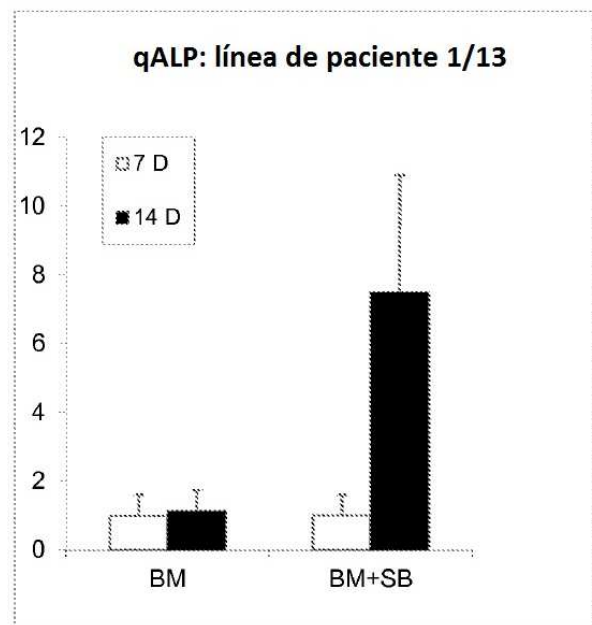


Fig. 2B

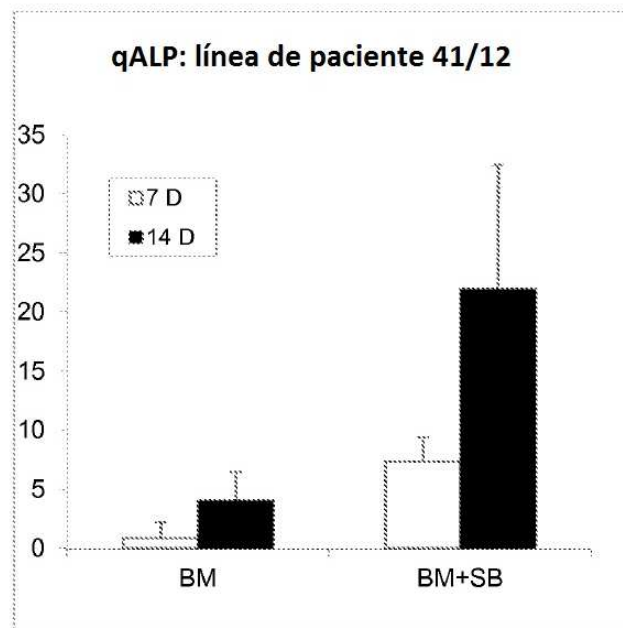


Fig. 2C

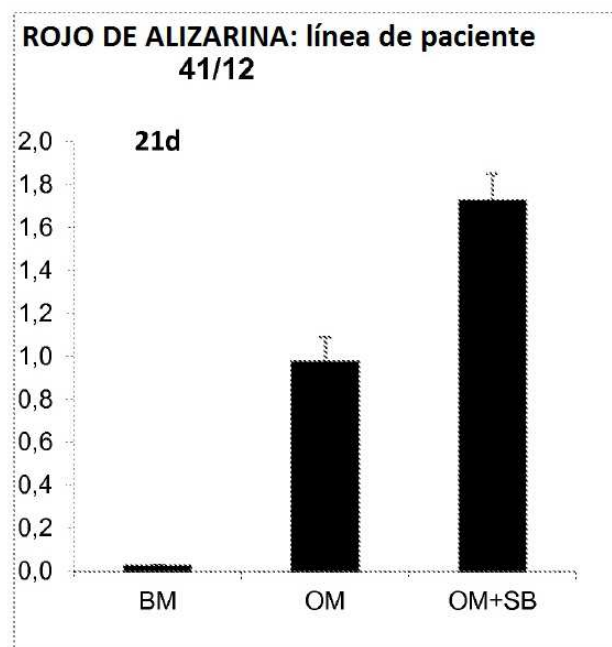


Fig. 3

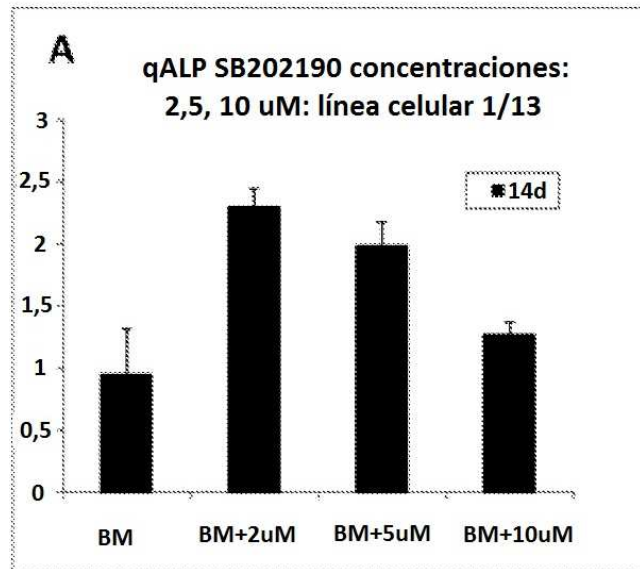


Fig. 4A

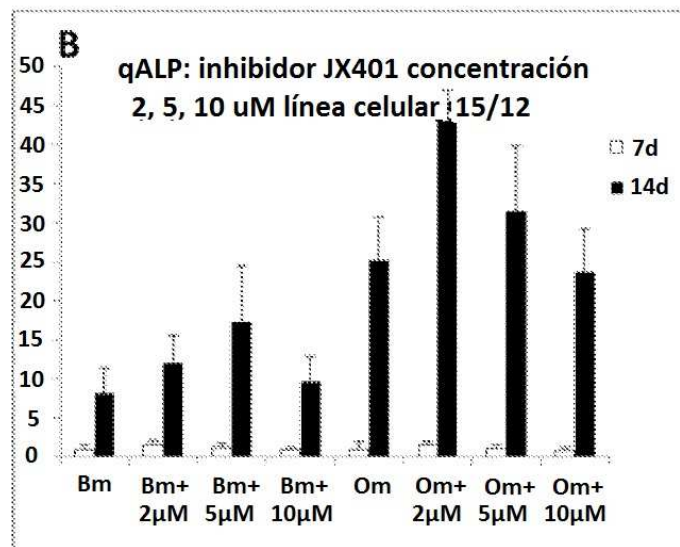


Fig. 4B

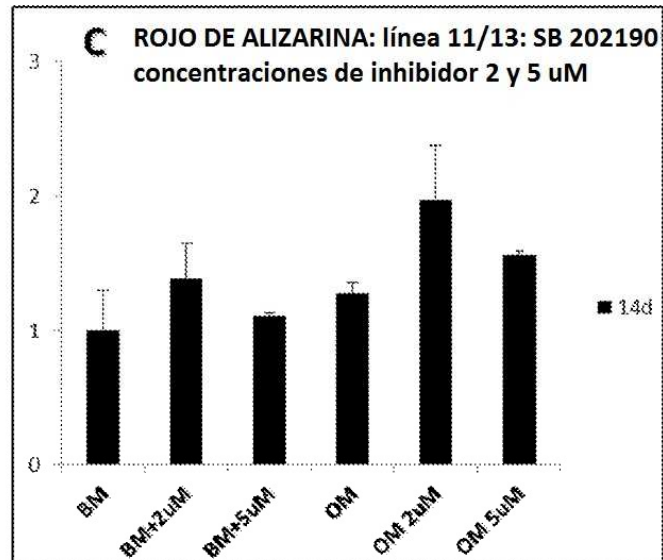


Fig. 4C