

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 500**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/32 (2015.01)

A61K 35/33 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2003 PCT/US2003/09720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2003 WO03083080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2003 E 03718103 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 1490074**

54 Título: **Terapia genética celular mixta**

30 Prioridad:

29.03.2002 US 369162 P

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

28.09.2017

73 Titular/es:

**TISSUEGENE, INC. (100.0%)
9605 Medical Center Drive, Suite 200
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**SONG, SUN;
YI, YOUNGSUK;
LEE, KWAN HEE y
NOH, MOON JONG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 634 500 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

Terapia genética celular mixta

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de células para terapia genética celular somática. La presente invención también se refiere a una mezcla de células que incluye células de tejido conjuntivo transfectadas o transducidas con un gen que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β y células de tejido conjuntivo que no se han transfectado ni transducido con un gen que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β .

15 **Breve descripción de la técnica relacionada**

En el campo ortopédico, la artritis degenerativa u osteoartritis es la enfermedad que se encuentra asociada más frecuentemente con el daño del cartílago. Casi cada articulación del cuerpo, tal como la rodilla, la cadera, el hombro, e incluso el tobillo, se afecta. La patogénesis de esta enfermedad es la degeneración del cartílago articular hialino (Mankin et al., J Bone Joint Surg, 52A: 460-466, 1982). El cartílago hialino de la articulación se deforma, fibrila, y eventualmente se excava. Si el cartílago degenerado se pudiera regenerar de alguna manera, la mayoría de los pacientes disfrutarían de sus vidas sin dolor debilitante.

25 Las vías tradicionales de suministro farmacológico, tal como la administración oral, intravenosa o intramuscular, para transportar el fármaco a la articulación son ineficaces. La semivida de los fármacos inyectados por vía intra-articular generalmente es corta. Otra desventaja de la inyección intra-articular de fármacos es que son necesarias inyecciones repetidas frecuentes para obtener niveles de fármaco aceptables en los espacios articulares para tratar una afección crónica tal como la artritis. Debido a que los agentes terapéuticos anteriores no se podían dirigir selectivamente a las articulaciones, era necesario exponer al huésped mamífero a concentraciones sistémicamente altas de fármacos con el fin de alcanzar una dosis terapéutica intra-articular sostenida. La exposición de los órganos no diana en esta manera aumentaba la tendencia de los fármacos anti-artritis a la producción de efectos secundarios graves, tales como molestias gastrointestinales y cambios en los sistemas hematológico, cardiovascular, hepático y renal del huésped mamífero.

35 El documento WO 01/34166 A desvela un dispositivo de trasplante o implante para el suministro de un compuesto a un huésped humano o animal, que comprende un tejido de una matriz cartilaginosa y condrocitos vitales que producen y mantienen la matriz, y que comprende adicionalmente células responsables de la secreción de dicho compuesto inmovilizadas en la matriz. Las células que son capaces de producir y secretar dicho compuesto pueden ser condrocitos modificados genéticamente. Pueden ser capaces de producir y secretar BMP (proteína morfogénica ósea) para el tratamiento de la pseudoartritis.

45 El documento WO 03/082302 A (del mismo Solicitante que tiene la misma fecha de prioridad y presentación que la presente solicitud) desvela una composición que comprende una población de células somáticas, transfectadas o transducidas con un gen terapéutico, tal como BMP, y un material bioadhesivo.

En el campo ortopédico, se han considerado algunas citosinas como candidatas para el tratamiento de las enfermedades ortopédicas. Se ha considerado que la proteína morfogénica ósea es un estimulante eficaz de la formación de hueso (Ozkaynak et al., EMBO J, 9: 2085-2093, 1990; Sampath y Rueger, Complications in Ortho, 101-107, 1994), y se ha informado del TGF- β como estimulante de la osteogénesis y condrogénesis (Joyce et al., J Cell Biology, 110: 2195-2207, 1990).

55 Se considera que el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citosina multifuncional (Sporn y Roberts, Nature (London), 332: 217-219, 1988), y tiene un papel regulador en el crecimiento, diferenciación celular y síntesis de la proteína de la matriz extracelular (Madri et al., J Cell Biology, 106: 1375-1384, 1988). El TGF- β inhibe el crecimiento de células epiteliales y células tipo osteoclastos in vitro (Chenu et al., Proc Natl Acad Sci, 85: 5683-5687, 1988), pero estimula la osificación endocondral y eventualmente la formación de hueso in vivo (Critchlow et al., Bone, 521-527, 1995; Lind et al., A Orthop Scand, 64 (5): 553-556, 1993 y Matsumoto et al., In vivo, 8: 215-220, 1994). La formación de hueso inducida por el TGF- β está mediada por su estimulación de las células pluripotenciales subperiólicas, que eventualmente se diferencian en células formadoras de cartílago (Joyce et al., J Cell Biology, 110: 2195-2207, 1990; y Miettinen et al., J Cell Biology, 127-6: 2021-2036, 1994).

65 Se ha informado del efecto biológico del TGF- β en ortopedia (Andrew et al., Calcif Tissue Int. 52: 74-78, 1993; Borque et al., Int J Dev Biol., 37: 573-579, 1993; Carrington et al., J Cell Biology, 107: 1969-1975, 1988; Lind et al., A Orthop Scand. 64 (5): 553-556, 1993; Matsumoto et al., In vivo, 8: 215-220, 1994). En los embriones de ratón, la tinción muestra que el TGF- β está estrechamente asociado con los tejidos derivados del mesénquima, tal como el tejido conjuntivo, cartílago y hueso. Además de los hallazgos embriológicos, el TGF- β está presente en el sitio de

formación de hueso y de formación de cartílago. Puede también aumentar la cicatrización de fracturas en la tibia del conejo. Recientemente, se ha informado del valor terapéutico del TGF- β (Critchlow et al., Bone, 521-527,1995; y Lind et al., A Orthop Scand, 64 (5): 553-556, 1993), pero sus efectos de corta duración y su alto coste han limitado una aplicación clínica amplia.

5 La inyección intra-articular de TGF- β para el tratamiento de artritis no es deseable, debido a que el TGF- β inyectado tiene una duración de acción corta, ya que el TGF- β se degrada a una forma inactiva in vivo. Por lo tanto, es necesario un nuevo método de liberación a largo plazo de TGF- β para la regeneración del cartílago hialino.

10 Existen informes de regeneración del cartílago articular con el autotransplante de células de cartílago (Brittberg et al., New Engl J Med 331: 889-895,1994), pero este procedimiento conlleva dos operaciones con una amplia escisión de tejidos blandos. Si la inyección intra-articular fuera suficiente para el tratamiento de la artritis degenerativa, tendría un gran beneficio económico y físico para los pacientes.

15 La terapia genética, que es un método de transferencia de una proteína específica en un sitio específico, puede ser la respuesta a este problema (Wolff y Lecierberg, Gene Therapeutics ed. Jon A. Wolff, 3-25,1994; y Jenks, J Natl Cancer Inst, 89 (16): 1182-1184, 1997).

20 Las patentes de Estados Unidos 5.858.355 y 5.766.585 desvelan la fabricación de una construcción vírica o plasmídica del gen IRAP (proteína antagonista del receptor 1 de interleucina); la transfección de células sinoviales (5.858.355) y células de médula ósea (5.766.585) con la construcción; y la inyección de las células transfectadas en una articulación del conejo, pero no desvela el uso de un gen que pertenezca a la superfamilia del TGF- β para regenerar el tejido conjuntivo.

25 Las patentes de Estados Unidos 5.846.931 y 5.700.774 desvelan la inyección de una composición que incluye una proteína de morfogénesis ósea (BMP), que pertenece a la "superfamilia" del TGF- β , junto con un péptido relacionado con la hormona paratiroidea truncado para producir el mantenimiento del efecto de formación de tejido cartilaginoso, y la inducción de tejido cartilaginoso. Sin embargo, no se desvela un método de terapia genética que utilice el gen BMP.

30 La patente de Estados Unidos 5.842.477 desvela el implante de una combinación de un armazón, tejido perióstico/pericondral, y células del estroma, que incluyen condrocitos, en el área con defecto de cartílago. Como esta divulgación de patente necesita que estos tres elementos estén presentes en el sistema implantado, la referencia falla al desvelar o sugerir el simple método de terapia genética de la invención que no necesita el implante del armazón ni el tejido perióstico/pericondral.

35 La patente de Estados Unidos 6.315.992 desvela que el cartílago hialino se genera en las articulaciones defectuosas de los mamíferos cuando se inyectan células de fibroblasto transfectadas con TGF- β en la articulación de la rodilla defectuosa. Sin embargo, la patente no desvela las ventajas de utilizar una composición celular mixta como en la presente invención.

40 Lee et al. Human Gene Therapy, 12: 1085-1813,2001 desvela que el cartílago hialino se genera en la articulación de mamífero con el defecto cuando se inyectan células de fibroblasto transfectadas con TGF- β 1 en la articulación de la rodilla defectuosa. Sin embargo, Lee et al. No desvela la utilización de una composición celular mixta como en la presente invención.

45 A pesar de estas divulgaciones de la técnica anterior, sigue existiendo una necesidad muy real y sustancial de un tratamiento más eficaz y potente no solo para regenerar tejido conjuntivo en el huésped mamífero, sino también una terapia genética de células somáticas, mejor y más eficaz.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención cubre la necesidad descrita anteriormente en el presente documento.

55 La invención actualmente reivindicada se refiere a una composición celular mixta de acuerdo con la reivindicación 1.

En la invención que se reivindica, la composición celular mixta puede ser una composición inyectable.

60 Además, en la composición la relación de la segunda población de células de fibroblasto o condrocito que no se ha transfectado o transducido con un gen que codifica TGF- β o BMP con respecto a la primera población de células de fibroblasto o de condrocito que se han transfectado o transducido con un gen que codifica TGF- β o BMP es desde aproximadamente 1-20 a 1. En particular, la relación puede ser desde aproximadamente 1-10 a 1, y adicionalmente, aproximadamente 1-3 a 1.

65 En la composición anterior, la primera población de células transfectadas o transducidas con un gen puede estar radiada. Y en particular, la primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas

con un gen que codifica TGF- β o BMP se radia.

Las células de la población mixta de células pueden derivarse del mismo organismo fuente. En particular, en ciertas realizaciones, la primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP y la segunda población de células de fibroblasto o de condrocito no transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP se derivan del mismo organismo fuente.

Las células de la población mixta de células se pueden derivar de organismos fuente diferentes. En particular, en ciertas realizaciones, la primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP y la segunda población de células de fibroblasto o de condrocito no transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP se derivan de organismos fuente diferentes. La primera población de células y la segunda población de células pueden derivarse de diferentes mamíferos fuente. Y en particular, la primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP y la segunda población de células de fibroblasto o de condrocito no transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP se derivan de mamíferos fuente diferentes.

Además, la invención se refiere al uso de acuerdo con la reivindicación 10. La invención que se reivindica también proporciona que en el uso anterior, la primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP está radiada.

Con respecto a la fuente de células descrita anteriormente, la primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP y la segunda población de células de fibroblasto o de condrocito no transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP son singénicas, alogénicas, o xenogénicas con respecto al huésped receptor.

El uso descrito anteriormente puede utilizar un vector recombinante tal como un vector vírico. El vector recombinante puede ser, pero no se limita a, un vector plasmídico. Además, la transfección o transducción puede conseguirse por encapsulación en liposomas, co-precipitación en fosfato cálcico, electroporación, mediación por DEAE-dextrano o mediación por virus.

En la práctica de la invención que se reivindica, las células se pueden almacenar antes del trasplante. Y las células se pueden almacenar en un crioprotector antes del trasplante.

En otra realización de la invención que se reivindica, la invención reivindicada actualmente proporciona un recipiente de almacenamiento para almacenar las células a una temperatura de -70 °C a aproximadamente -196 °C, como se define en la reivindicación 8.

En particular, la presente solicitud proporciona un recipiente de almacenamiento para almacenar las células a una temperatura de aproximadamente -70 °C a aproximadamente -196 °C, que comprenden una composición celular mixta inyectable.

Estos y otros objetivos de la invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de la invención, los dibujos a los que se hace referencia que se adjuntan a la misma y las reivindicaciones adjuntas a la misma.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada que se da en el presente documento posteriormente, y los dibujos adjuntos que solo se dan a modo de ilustración, y por lo tanto no son limitantes de la presente invención y donde:

La Figura 1 muestra la expresión de ARNm de TGF- β 1. El ARN total se aisló a partir de células NIH3T3 o células NIH3T3 transfectadas establemente con el pmT β 1, un vector de expresión de TGF- β 1, que se cultivó en ausencia o presencia de zinc. El ARN total (15 mg) se hibridó con el ADNc de TGF- β 1 o ADNc de actina β como control.

Las Figuras 2A y 2B muestran la expresión de BMP-2 en células NIH3T3-BMP-2. Las Figuras 2A y 2B muestran las células NIH3T3-metalitioeína de control (A) y las células NIH3T3-BMP-2 (B). El color azul del panel (B) muestra la expresión de proteína BMP-2.

Las Figuras 3A-3D muestra la regeneración del cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células NIH3T3-TGF- β 1) en conejos con un defecto parcial. Las Figuras 3A y 3C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon (condrocitos humanos) y células NIH3T3-TGF- β 1 (A) o con hCon solos (C). Las figuras 3B y 3D muestra la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 (b) o con hCon solos (D). Magnificación original: (B y D) x 12,5.

El método descrito anteriormente puede utilizar un vector recombinante tal como un vector vírico. El vector recombinante puede ser, pero no se limita a, un vector plasmídico. Además, la transfección o transducción se puede conseguir por encapsulación en liposomas, co-precipitación en fosfato cálcico, electroporación, mediación por DEAE-dextrano o mediación vírica.

5 En la práctica de la invención reivindicada, se pueden almacenar las células antes del trasplante. Y las células se pueden almacenar en un crioprotector del trasplante.

10 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar la osteoartritis que comprende: a) generar un vector recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) o la proteína morfogénica ósea (BMP), unida operativamente a un promotor; b) transfectar o transducir una población de células de fibroblasto o condrocito in vitro con dicho vector recombinante; y c) inyectar una composición celular mixta inyectable que comprende una cantidad eficaz para la generación de cartílago hialino y el tratamiento de la osteoartritis de, (i) una primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP; (ii) una segunda población de células de fibroblasto o de condrocito no han sido transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP; y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas que no es una estructura tridimensional no viva en el espacio articular de un mamífero de manera que se produce la expresión de la secuencia de ADN que codifica el TGF- β o la BMP en el espacio articular lo que da como resultado la generación de tejido óseo y cartilaginoso en el espacio articular.

15 La presente invención se refiere además a una composición celular mixta inyectable que comprende una cantidad eficaz para generar cartílago y tratar la osteoartritis de: a) una primera población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) o la proteína morfogénica ósea (BMP); b) una segunda población de células de fibroblasto o de condrocito que no han sido transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas.

20 En otra realización de la invención que se reivindica, la invención reivindicada actualmente proporciona un recipiente de almacenamiento para el almacenamiento de células a una temperatura de aproximadamente -70°C a aproximadamente 196°C , que comprende una composición celular mixta para generar una proteína en un sitio de interés, que comprende: a) una primera población de células de mamífero transfectadas o transducidas con un gen que se desea expresar; b) una segunda población de células de mamífero que no han sido transfectadas o transducidas con el gen, donde las formas existentes endógenamente de la segunda población de células de mamífero está disminuida en el sitio diana, y donde la generación de la proteína terapéutica de la primera población de células de mamífero en el sitio diana estimula a la segunda población de células para inducir un efecto terapéutico; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas.

25 En particular, la presente solicitud proporciona un recipiente de almacenamiento para almacenar células a una temperatura de aproximadamente -70°C a aproximadamente -196°C , que comprende una composición celular mixta inyectable que comprende una cantidad eficaz para generar cartílago hialino de: a) una población de células de fibroblasto o de condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP; b) una población de células de fibroblasto o de condrocito que no han sido transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- β o BMP; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas.

30 Estos y otros objetivos de la invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de la invención, los dibujos a los que se hace referencia que se adjuntan a la misma y las reivindicaciones adjuntas a la misma.

50 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada que se da posteriormente en el presente documento, y los dibujos adjuntos que solo se dan a modo de ilustración, y por lo tanto no son limitantes de la presente invención y donde:

55 La Figura 1 muestra la expresión de ARNm de TGF- β 1. El ARN total se aisló a partir de células NIH3T3 o células NIH3T3 transfectadas establemente con el pmT β 1, un vector de expresión de TGF- β 1, que se cultivó en ausencia o presencia de zinc. El ARN total (15 mg) se hibridó con el ADNc de TGF- β 1 o ADNc de actina β como control.

60 Las Figuras 2A y 2B muestra la expresión de BMP2 en células NIH3T3-BMP2. Las Figuras 2A y 2B muestran las células NIH3T3-metalotioneína de control (A) y las células NIH3T3-BMP2 (B). El color azul del panel (B) muestra la expresión de proteína BMP2.

65 Las Figuras 3A-3D muestra la regeneración del cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células NIH3T3-TGF- β 1) en conejos con un defecto parcial. Las Figuras 3A y 3C muestra fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon (condrocitos humanos) y células NIH3T3-TGF- β 1 (A) o con hCon solos (C). Las figuras 3B y 3D muestra la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo

femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF-β1 (b) o con hCon solos (D). Magnificación original: (B y D) x 12,5.

Las Figuras 4A-4E muestran la regeneración de cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células NIH3T3-TGF-β1) en conejos con un defecto del grosor completo. Las Figuras 4A y 4D muestran fotos de los cóndilos femorales 12 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF-β1 (A) o con hCon solos (D). Las Figuras 4B y 4E muestran la tinción tricrómica de Mason, y la Figura 4C muestra la tinción Safranina-O de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF-β1 (B y C) o con hCon solos (E). Magnificación original: (B, C y E) x 12,5.

Las Figuras 5A-5D muestran la regeneración del cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células NIH3T3-BMP-2) en conejos con un defecto parcial. Las Figuras 5A y 5C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (A) o con hCon solos (C). Las Figuras 5B y 5D muestran la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (B) o con hCon solos (D). Magnificación original: (B y D) x 12,5.

Las Figuras 6A-6E muestran la regeneración de cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células NIH3T3-BMP-2) en conejos con un defecto de grosor completo. Las Figuras 6A y 6D muestran fotos de los cóndilos femorales 12 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (A) o con hCon solos (C). Las Figuras 6B y 6E muestran la tinción tricrómica de Mason y la Figura 6C muestra la tinción Safranina-O de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (B y C) o con hCon solos (E). Magnificación original: (B, C y D) x 12,5.

Las Figuras 7A-7D muestran la regeneración de cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células de condrocito humano-TGF-β1) en conejos con un defecto de grosor completo. Las Figuras 7A y 7C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 (A) o con hCon solos (C). Las Figuras 7B y 7D muestran la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 (B) o con hCon solos (D). [Magnificación original: (B y D) x 12,5].

Las Figuras 8A-8D muestran la regeneración de cartílago con la inyección celular mixta (condrocitos humanos y células de condrocito humano-TGF-β1) en conejos con un defecto parcial. Las Figuras 8A y 8C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 (relación 3:1) (A) o una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 (relación 5:1) (C). Las Figuras 8B y 8D muestran la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 con una relación 3:1 (B) o 5:1 (D). [Magnificación original: (B y D) x 12,5].

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" incluye miembros del reino animal incluyendo pero sin limitarse a seres humanos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "huésped mamífero" incluye miembros del reino animal incluyendo pero sin limitarse a seres humanos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "tejido conjuntivo" es cualquier tejido que conecta y soporta otros tejidos u órganos, e incluye pero no se limita a un ligamento, un cartílago, un tendón, un hueso, y una sinovia de un huésped mamífero.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "célula de tejido conjuntivo" y "célula de un tejido conjuntivo" incluyen células que se encuentran en el tejido conjuntivo, tales como fibroblastos, células de cartílago (condrocitos) y células óseas (osteoblastos/osteocitos), que segregan una matriz extracelular colágena, así como a las células de grasa (adipocitos) y las células del músculo liso. Preferentemente, las células del tejido conjuntivo son fibroblastos, células de cartílago, y células óseas. Se reconocerá que la invención se puede practicar con un cultivo mixto de células de tejido conjuntivo, así como con células de un único tipo. También se reconocerá que las células de tejido conjuntivo pueden pre-tratarse con compuestos químicos o radiación antes de inyectarlas en el espacio articular de manera que las células expresen establemente el gen de interés en el organismo huésped. Preferentemente, la célula de tejido conjuntivo no produce una respuesta inmunitaria negativa cuando se inyecta en el organismo huésped. Se entiende que las células alogénicas pueden utilizarse a este respecto, así como células autólogas para la terapia genética mediada por células o la terapia con células somáticas.

Como se utiliza en el presente documento, "línea celular de tejido conjuntivo" incluye una pluralidad de células de tejido conjuntivo que se originan de una célula parental común.

Como se utiliza en el presente documento, "disminución" de células se refiere a una disminución de una población de células en comparación con la cantidad que se encontraría normalmente en el sitio. Esto puede significar un porcentaje de reducción de una población de células, tal como al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % en comparación con la población celular normal en el lugar, o puede significar el daño o agotamiento de células en el lugar.

Como se utiliza en el presente documento, "células auxiliares" se refiere a las células que se mezclan con células

que están transfectadas o transducidas con un gen de interés. Las propias células auxiliares no están transfectadas o transducidas con el gen de interés. En particular, las células transfectadas o transducidas con el gen de interés generan una proteína que activa las células auxiliares. La administración de esta mezcla en un sitio de interés donde se producen las células auxiliares endógenamente, pero que han disminuido en el momento de la administración, da como resultado una terapia genética somática ventajosamente eficaz en el sitio de interés.

En una realización, "células auxiliares" puede referirse a células de tejido conjuntivo transfectadas o transducidas con un gen que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β para formar una mezcla de células. Dichas células auxiliares pueden incluir cualquier célula de tejido conjuntivo. En general, estas células no están transfectadas o transducidas con un gen que codifique un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β . En particular, estas células no están transfectadas ni transducidas con ningún gen, y estas células son generalmente residentes en el área del cartílago. Normalmente, la célula es un fibroblasto o un condrocito.

Como se utiliza en el presente documento, "histocompatibilidad" de una célula donante y un huésped receptor se refiere que comparten un número suficiente de agentes de histocompatibilidad de manera que el trasplante sea aceptado y permanezca funcional en el mamífero huésped. En particular, la pareja de donante y receptor deberían coincidir en antígenos de leucocito humano (HLA), tales como el HLA tipo A, B y C (Clase I) y HLA tipo DR (Clase II).

Como se utiliza en el presente documento, "cartílago hialino" se refiere al tejido conjuntivo que cubre la superficie articular. Solo a modo de ejemplo, el cartílago hialino incluye, pero no se limita a, cartílago articular, cartílago costal, y cartílago nasal.

En particular, el cartílago hialino se conoce por auto-renovarse, responder a alteraciones, y proporcionar un movimiento estable con menos fricción. El cartílago hialino que está incluso en la misma articulación o en distintas articulaciones varía en grosor, densidad celular, composición de la matriz y propiedades mecánicas, manteniendo aún la misma estructura y función generales. Algunas de las funciones del cartílago hialino incluyen una sorprendente rigidez a la compresión, elasticidad, y una capacidad excepcional para distribuir las cargas de peso, capacidad para minimizar picos de presión sobre el hueso subcondral, y gran durabilidad.

Macroscópica e histológicamente, el cartílago hialino aparece como una superficie suave, firme que resiste la deformación. La matriz extracelular del cartílago comprende condrocitos, pero carece de vasos sanguíneos, vasos linfáticos o nervios. Una estructura elaborada, altamente ordenada que mantiene la interacción entre los condrocitos y la matriz funciona para mantener la estructura y función el cartílago hialino, mientras que se mantiene un bajo nivel de actividad metabólica. La referencia O'Driscoll, J. Bone Joint Surg., 80A: 1795-1812, 1998 describe en detalle la estructura y función del cartílago hialino, la cual se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Como se utiliza en el presente documento, composición "inyectable" se refiere a una composición que excluye distintos armazones tridimensionales, matrices, estructuras en malla o fieltro, que pueden estar fabricados con cualquier material o forma que permiten a las células unirse a los mismos y permitir que las células crezcan en más de una capa, y cuya estructura se implanta en general, y no se inyecta. En una realización, el método de inyección de la invención se lleva a cabo normalmente con una jeringa. Sin embargo, se puede utilizar cualquier modo de inyección de la composición de interés. Por ejemplo, también se pueden utilizar catéteres, pulverizadores, o geles de polímero dependientes de la temperatura.

Como se utiliza en el presente documento, "células mezcladas" o una "mezcla de células" o "mezcla celular" se refiere a la combinación de una pluralidad de células que incluye una primera población de células que están transfectadas o transducidas con un gen de interés que se expresa para beneficiar a las células auxiliares, y cuyas células auxiliares son la segunda población de células.

En una realización de la invención, células mezcladas se puede referir a la combinación de una pluralidad de células de tejido conjuntivo que incluye células que se han transfectado o transducido con un gen o ADN que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β y células auxiliares que no se han transfectado o transducido con un gen que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β . Normalmente, la relación de células que no se han transfectado o transducido con un gen que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β con respecto a las células que se han transfectado o transducido con un gen de la superfamilia del TGF puede estar en el intervalo de aproximadamente 3-20 a 1. El intervalo puede incluir de aproximadamente 3-10 a 1. En particular, el intervalo puede ser aproximadamente de 10 a 1 en términos de número de células. Sin embargo, se entiende que la relación de estas células no debería estar fijada necesariamente a un intervalo particular siempre que la combinación de estas células sea eficaz para producir cartílago hialino en articulaciones con defectos parciales o totales.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo que se conozca en la técnica para promover la eficacia del transporte de la composición de la invención y prolongar la eficacia de la composición.

Como se utiliza en el presente documento, "células somática" o "célula" en general se refiere a la célula del cuerpo distinta del óvulo o el esperma.

Como se utiliza en el presente documento, células "almacenadas" se refiere a una composición de células mezcladas que se han almacenado individualmente o juntas antes de administrarse en el espacio articular. Las células se pueden almacenar en una unidad de refrigeración. De manera alternativa, las células se pueden congelar a aproximadamente -70 °C a aproximadamente -196 °C en un depósito de nitrógeno líquido o en una unidad de almacenamiento equivalente de manera que las células se conserven para la administración posterior en el espacio articular. Las células se pueden descongelar utilizando protocolos conocidos. La duración de congelación y descongelación puede llevarse a cabo por cualquiera de varias formas, siempre que la viabilidad y potencia de las células estén optimizadas.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "transfección" y "transducción" se mencionan como métodos particulares de transferencia del ADN a la célula huésped y su integración posterior en el ADN cromosómico de la célula receptora. Como se practica la invención, se puede utilizar cualquier método de transferencia de un ADN ajeno a una célula huésped, incluyendo los métodos de transferencia genética víricos y no víricos, siempre que el gen ajeno se introduzca en la célula huésped y el gen ajeno se exprese establemente en la célula huésped. Por lo tanto, como se utiliza en el presente documento, la expresión "transfectada o transducida" incluye cualquier método de suministro genético a las células, tal como la precipitación en fosfato cálcico, DEAE dextrano, electroporación, liposomas, mediación vírica, y otros.

Como se utiliza en el presente documento, la "superfamilia del factor de crecimiento transformante β " engloba un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente, que afectan un amplio intervalo de procesos de diferenciación durante el desarrollo embrionario. La familia incluye, la sustancia inhibidora Mülleriana (MIS), que es necesaria para el desarrollo normal del sexo masculino (Behringer, et al., *Nature*, 345:167, 1990), el producto genético decapentaplégico de *Drosophila* (DPP), que es necesario para la formación del eje dorso-ventral y la morfogénesis de los discos imaginales (Padgett, et al., *Nature*, 325:81-84, 1987), el producto genético de Vg-1 de *Xenopus*, que localiza el polo vegetativo de los huevos (Weeks, et al., *Cell*, 51:861-867, 1987), las activinas (Mason, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135:957-964, 1986), que puede inducir la formación de mesodermo y estructuras anteriores en embriones de *Xenopus* (Thomsen, et al., *Cell*, 63:485, 1990), y las proteínas morfogénicas óseas (BMP, tales como BMP-2, 3, 4, 5, 6 y 7, osteogenina, OP-1) que pueden inducir la formación de cartílago y hueso de novo (Sampath, et al., *J. Biol. Chem.*, 265:13198, 1990). Los productos genéticos de TGF- β pueden tener influencia en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo la adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, hematopoyesis, y diferenciación celular epitelial. Para una revisión, véase Massague, *Cell* 49:437, 1987, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Las proteínas de la familia del TGF- β se sintetizan inicialmente como una proteína precursora grande, que posteriormente se somete a escisión proteolítica en un agrupamiento de restos básicos de aproximadamente 110-140 restos de aminoácido desde el extremo C. Las regiones del extremo C de las proteínas están relacionadas estructuralmente y los diferentes miembros de la familia se pueden clasificar en distintos subgrupos basándose en la extensión de su homología. Aunque las homologías en los subgrupos particulares varían del 70 % al 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, las homologías entre los subgrupos son significativamente menores, variando en general desde solo un 20 % a un 50 %. En cada caso, las especies activas parecen ser un dímero unidos por disulfuro de fragmentos de extremos C. Para la mayoría de los miembros de la familia que se han estudiado, se ha descubierto que las especies homodiméricas son biológicamente activas, pero para otros miembros de la familia, como las inhibinas (Ung, et al., *Nature*, 321:779, 1986) y los TGF- β (Cheifetz, et al., *Cell*, 48:409, 1987), también se han detectado heterodímeros, y parece que tienen propiedades biológicas diferentes que los homodímeros respectivos.

Los genes de los miembros de la superfamilia de TGF- β incluyen TGF- β 3, TGF- β 2, TGF- β 4 (pollo), TGF- β 1, TGF- β 5 (*Xenopus*), BMP-2, BMP-4, DPP de *Drosophila*, BMP-5, BMP-6, Vgr1, OP-1/BMP-7, 60A de *Drosophila*, GDF-1, Vgf de *Xenopus*, BMP-3, Inhibina- β A, Inhibina- β B, Inhibina- α , y MIS. Estos genes se exponen en Massague, *Ann. Rev. Biochem.* 67:753-791, 1998, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Preferentemente, los genes del miembro de la superfamilia de TGF- β son TGF- β y BMP. Más preferentemente, el miembro es TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, o BMP-7. Más preferentemente, el miembro es el TGF- β 1 o BMP-2 humano o porcino.

Como se utiliza en el presente documento, "marcador genético" incluye un producto genético que se expresa por una célula que mantiene establemente el ADN introducido, y produce que la célula exprese un fenotipo alterado tal como una transformación morfológica, o una actividad enzimática. El aislamiento de células que expresan un gen transfectado o transducido se consigue por la introducción opcional en las mismas células de un segundo gen que codifica un marcador genético, tal como el que tiene una actividad enzimática que confiere resistencia a un antibiótico u otro fármaco. Ejemplos de marcadores genéticos incluyen, pero no se limitan a, timidina cinasa, dihidrofolato reductasa, aminoglucósido fosfotransferasa, que confieren resistencia a los antibióticos aminoglucósidos tales como kanamicina, neomicina y geneticina, higromicina B fosfotransferasa, xantina-guanina

fosforribosil transferasa, CAD (una proteína sencilla que posee las primeras tres actividades enzimáticas de la biosíntesis de novo de uridina – carbamil fosfato sintetasa, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa), adenosina desaminasa, y asparagina sintetasa (Sambrook et al. Molecular Cloning, Capítulo 16. 1989), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se entiende que la utilización de un marcador genético no es imprescindible para la práctica de la invención reivindicada. De hecho, en una realización, no se incorpora un marcador genético en la construcción genética de la invención reivindicada.

Como se utiliza en el presente documento, un “promotor” puede ser cualquier secuencia de ADN que es activo, y controla la transcripción en una célula eucariota. El promotor puede ser activo en ambas células eucariotas y procariotas. Preferentemente, el promotor es activo en células de mamífero. El promotor se puede expresar constitutivamente o ser inducible. Preferentemente, el promotor es inducible. Preferentemente el promotor es inducible por un estímulo externo. Más preferentemente, el promotor es inducible por hormonas o metales. Más preferentemente, el promotor es un promotor del gen de la metalotioneína o un promotor inducible por glucocorticoides. Al igual, se pueden insertar “elementos amplificadores”, que también controlan la transcripción, en la construcción del vector de ADN, y utilizarse con la construcción de la presente invención para aumentar la expresión del gen de interés.

Como se utiliza en el presente documento, “DC-col” significa un liposoma catiónico que contiene derivados de colesterol catiónico. La molécula de “DC-col” incluye un grupo amino terciario, un brazo espaciador de longitud media (dos átomos) y una unión por un enlazador carbamilo (Gao et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179:280-285, 1991).

Como se utiliza en el presente documento, “SF-col” se define como un tipo de liposoma catiónico.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “biológicamente activo” cuando se utiliza en relación a liposomas denota la capacidad para introducir un ADN funcional y/o proteínas en la célula diana.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “biológicamente activo” en referencia a un ácido nucleico, proteína, fragmento de proteína o derivado de la misma se define como una capacidad del ácido nucleico o secuencia de aminoácidos para imitar una función biológica conocida producida por la forma de tipo silvestre del ácido nucleico o proteína.

Como se utiliza en el presente documento, el término “mantenimiento”, cuando se utiliza en el contexto del suministro por liposomas, denota la capacidad del ADN introducido para permanecer presente en la células. Cuando se utiliza en otros contextos, significa la capacidad del ADN dirigido para permanecer presente en las células o tejido diana de manera que se imparta un efecto terapéutico.

La presente invención engloba la administración de una mezcla de células en un sitio que necesita las mismas en un mamífero, donde la primera población de células está transfectada o transducida con un gen de interés para expresarse en el sitio de interés de un mamífero. Como se intenta una terapia genética somática, la presente invención proporciona la inclusión de una segunda población de células que no están transfectadas o transducidas con el gen de interés, y cuyas células están disminuidas endógenamente en el sitio de interés herido o enfermo o debilitado de otra manera, que por lo tanto necesitan la activación por la expresión del gen de interés en el sitio de interés junto con la segunda población de células para activar de esta manera el crecimiento de las células del segundo tipo de población que se producen endógenamente o se administran exógenamente.

En particular, la presente invención desvela técnicas ex vivo e in vivo para el suministro de una secuencia de ADN de interés en células de tejido conjuntivo del huésped mamífero. La técnica ex vivo implica el cultivo de las células de tejido conjuntivo, la transfección o transducción in vitro de la secuencia de ADN, el vector de ADN u otro vehículo de suministro de interés en las células de tejido conjuntivo, seguido por el trasplante de las células de tejido conjuntivo modificadas en la articulación diana del huésped mamífero, para efectuar de esta manera la expresión in vivo del producto genético de interés.

Se entiende que aunque sea posible que se puedan implantar sustancias tales como un armazón o una matriz así como distintos tejidos extraños junto con el protocolo de terapia genética de la presente invención, también es posible que dicho armazón o tejido no se incluya en el sistema de inyección de la invención. En una realización preferida, en una terapia genética mediada por células o terapia celular somática, la invención se refiere a un simple método de inyección de una población de células de tejido conjuntivo transfectadas o transducidas en el espacio articular de manera que se exprese una proteína exógena de la superfamilia del TGF en el espacio articular.

Un método ex vivo de tratamiento de un trastorno en el tejido conjuntivo mediante esta memoria descriptiva comprende inicialmente la generación de un vector vírico o plasmídico recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica una proteína o fragmento biológicamente activo de la misma. Este vector recombinante se utiliza entonces para infectar o transfectar una población de células de tejido conjuntivo cultivadas in vitro, dando como resultado una población de células conjuntivas que contienen el vector. Estas células de tejido conjuntivo se trasplantan entonces a un espacio articular diana de manera que se produce una mezcla dentro de la articulación,

efectuando de esta manera la expresión posterior de la proteína o fragmento de proteína en el espacio articular. La expresión de esta secuencia de ADN de interés es útil para reducir sustancialmente al menos una patología perjudicial articular asociada con un trastorno del tejido conjuntivo.

5 Se entenderá por el experto habituado en la técnica que la fuente de células para tratar un paciente humano pueden ser células de tejido conjuntivo propias del paciente, tales como fibroblastos autólogos o células de condrocito, pero también se pueden utilizar células alogénicas así como células xenogénicas sin considerar la histocompatibilidad de las células. De manera alternativa, en una realización de la invención se pueden utilizar células alogénicas que tienen una coincidencia de histocompatibilidad con el huésped mamífero. Para describirlo con mayor detalle, la histocompatibilidad del donante y el paciente se determinan de manera que se administren células histocompatibles con el huésped mamífero.

Más específicamente, este método incluye el empleo como gen de un gen capaz de codificar un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β , o un derivado biológicamente activo y un marcador genético, o un derivado biológicamente activo o fragmento del mismo.

Una realización adicional incluye el empleo como gen un gen capaz de codificar al menos un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β o un derivado biológicamente activo o fragmento del mismo, y el empleo como el vector de ADN plasmídico cualquier vector de ADN plasmídico conocido por un experto habituado en la técnica capaz del mantenimiento estable en la células o tejido diana al suministrarlo, independientemente del método de suministro que se utilice.

Otra realización proporciona la introducción de al menos un gen que codifica un producto en al menos una célula de un tejido conjuntivo para su uso en el tratamiento de un huésped mamífero. Esto incluye el empleo de medios no víricos para la introducción del gen que codifica el producto en la célula de tejido conjuntivo. Más específicamente, esto incluye una encapsulación en liposomas, co-precipitación en fosfato cálcico, electroporación, o mediación de DEAE-dextrano, e incluye el empleo como gen de un gen capaz de codificar un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento de transformación o un derivado biológicamente activo o fragmento del mismo, y un marcador genético, o un derivado biológicamente activo o fragmento del mismo.

Otra realización proporciona un método adicional para introducir al menos un gen que codifica un producto en al menos una célula de un tejido conjuntivo para su uso en el tratamiento del huésped mamífero. Esto incluye el empleo de medios biológicos de utilización de un virus para suministrar la molécula de vector ADN en la célula o tejido diana. Preferentemente, el virus es un pseudovirus, habiéndose alterado el genoma de manera que el pseudovirus es capaz solo del suministro y mantenimiento en la célula diana, pero no mantiene la capacidad para replicarse en la célula o tejido diana. El genoma vírico alterado se manipula adicionalmente por técnicas de ADN recombinante de manera que el genoma vírico actúa como una molécula de vector ADN que contiene el gen heterólogo de interés para expresarse en la célula o tejido diana.

Una realización preferida es el suministro de TGF- β o BMP a un espacio articular diana mediante el suministro del gen de TGF- β o BMP al tejido conjuntivo de un huésped mamífero mediante el uso de un vector retroviral con la técnica ex vivo desvelada en esta memoria descriptiva. En otras palabras, una secuencia de interés que codifica un TGF- β o proteína BMP o fragmento proteico funcionales se subclona en un vector retroviral de transferencia de elección. Los retrovirus recombinantes se producen en células empaquetadas y después se cultivan hasta un título adecuado y se utilizan para infectar las células de tejido conjuntivo cultivadas in vitro. La célula de tejido conjuntivo transducidas, preferentemente las células auto-injertadas, se trasplantan a la articulación de interés en combinación con una muestra no transfectada o transducida de células de tejido conjuntivo tal como condrocitos preferentemente por inyección intra-articular.

Otro método preferido implica el suministro in vivo directo de un gen de la superfamilia TGF- β al tejido conjuntivo de un huésped mamífero mediante el uso de un vector retroviral, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado (AVV) o vector del virus del herpes simple (HSV). En otras palabras, una secuencia de ADN de interés que codifica un TGF- β o proteína BMP o fragmento proteico funcionales se subclona en el vector vírico respectivo. El virus recombinante que contiene el TGF- β o BMP se cultiva entonces hasta un título adecuado y se dirige al interior del espacio articular, preferentemente mediante inyección intra-articular.

Los métodos de presentación de la molécula de ADN al tejido conjuntivo diana de la articulación incluye, pero no se limita a, la encapsulación de la molécula de ADN en liposomas catiónicos, la subclonación de la secuencia de ADN de interés en un vector retroviral o plasmídico, o la inyección directa de la propia molécula de ADN en la articulación. La molécula de ADN, independientemente de la forma de presentación a la articulación de la rodilla, se presenta preferentemente como una molécula de vector de ADN, como una molécula de vector ADN vírico recombinante o una molécula de vector de ADN plasmídico recombinante. La expresión del gen heterólogo de interés se asegura insertando un fragmento de promotor activo en células eucariotas directamente corriente arriba de la región codificante del gen heterólogo. Un experto habituado en la técnica puede utilizar estrategias y técnicas conocidas de construcción de vectores para asegurar niveles apropiados de expresión posteriores a la entrada de la molécula de ADN en el tejido conjuntivo.

- En una realización preferida, los fibroblastos y condrocitos se cultivan in vitro para la utilización posterior como un sistema de suministro para terapia genética. Será evidente que los Solicitantes no se limitan al uso del tejido conjuntivo específico desvelado. Sería posible utilizar otras fuentes de tejidos para las técnicas de cultivo in vitro. El método de utilización del gen de la presente invención se puede emplear tanto profilácticamente y en el tratamiento terapéutico de osteoartritis y cicatrización de heridas. También será evidente que la invención no se limita a aplicaciones profilácticas o terapéuticas para tratar solamente la articulación de la rodilla. Sería posible utilizar la presente invención profiláctica o terapéuticamente para tratar la osteoartritis en cualquier articulación susceptible o cualquier daño resultante de una lesión producida por cualquier rasgadura o degradación del cartílago.
- En otra realización, se proporciona un compuesto para la administración parenteral a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz que contenga un gen que codifica una proteína de la superfamilia del TGF- β y un vehículo farmacéutico adecuado.
- Otra realización proporciona un compuesto para la administración parenteral a un paciente en una cantidad profilácticamente eficaz que incluye un gen que codifica una proteína de la superfamilia del TGF- β y un vehículo farmacéutico adecuado.
- En una realización adicional, las células se almacenan antes de la administración al espacio articular. Las células transfectadas o transducidas se pueden almacenar solas, o se pueden almacenar las células auxiliares sin transfectar solas, o se puede almacenar la mezcla, pero no simultáneamente necesariamente. Además, la duración de necesidad de almacenamiento no es durante el mismo periodo de tiempo. Por lo tanto, las células almacenadas individualmente se pueden mezclar antes de la inyección. De manera alternativa, las células se pueden almacenar e inyectar por separado para formar una mezcla de células en el espacio articular. Se apreciará por los expertos en la técnica que estas células se pueden almacenar congeladas en un crioprotector tal como pero sin limitarse a una composición de aproximadamente un 10 por ciento de DMSO en nitrógeno líquido o un medio de almacenamiento equivalente.
- Otra realización incluye la introducción de al menos un gen que codifica un producto en al menos una células de un tejido conjuntivo de un huésped mamífero para su uso en el tratamiento del huésped mamífero como se ha descrito anteriormente en el presente documento que incluye efectuar la infección in vivo de la células introduciendo el vector vírico que contiene el gen que codifica el producto directamente en el huésped mamífero. Preferentemente, este incluye efectuar la introducción directa en el huésped mamífero mediante inyección intra-articular. Esto incluye evitar sustancialmente el desarrollo de artritis en un huésped mamífero que tiene una alta susceptibilidad de desarrollar artritis. También incluye el empleo del método en un mamífero artrítico para su uso terapéutico. Además, esto también incluye el empleo del método para reparar y regenerar el tejido conjuntivo como se ha definido anteriormente en el presente documento.
- Los expertos en la técnica apreciarán que los vectores víricos que emplean un liposoma no se limitan por la división celular como es necesario para los retrovirus para efectuar la infección y la integración en las células de tejido conjuntivo. El empleo de medios no víricos como se ha descrito anteriormente en el presente documento incluye el empleo como gen un gen capaz de codificar un miembro que pertenece a la superfamilia del TGF- β y opcionalmente con un gen de marcador genético, tal como un gen de resistencia a antibióticos. Y también se entiende que un marcador genético no es imprescindible.
- Otra realización de la presente invención es el suministro de una secuencia de ADN que codifica un miembro de la superfamilia del TGF- β al tejido conjuntivo de un huésped mamífero por cualquiera de los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva de manera que efectúe la expresión in vivo de colágeno para regenerar el tejido conjuntivo, tal como el cartílago.
- Los tejidos conjuntivos son órganos difíciles de alcanzar terapéuticamente. Las vías intravenosa y oral de suministro de fármacos que se conocen en la técnica proporcionan un acceso pobre a estos tejidos conjuntivos y tienen la desventaja de la exposición del cuerpo del huésped mamífero sistémicamente al agente terapéutico. Más específicamente, la inyección conocida de proteínas en las articulaciones proporciona un acceso directo a una articulación. Sin embargo, la mayoría de los fármacos inyectados en forma de proteínas encapsuladas tienen una semivida intra-articular corta. La presente invención resuelve estos problemas introduciendo en el tejido conjuntivo de un huésped mamífero los genes que codifican las proteínas que se pueden utilizar para tratar el huésped mamífero. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para introducir en el tejido conjuntivo de un huésped mamífero los genes que codifican proteínas con propiedades anti-artríticas.
- En los Ejemplos que se proporcionan en el presente documento, las células NIH3T3-TGF- β 1 y NIH3T3-BMP-2 mezcladas con las células de condrocito auxiliares sin transducir estimulan la síntesis de colágeno en la articulación. En los Ejemplos, se inyectó en la articulación una concentración de 2×10^6 células/ml de una mezcla de células NIH3T3-TGF- β 1 o NIH3T3-BMP-2 y células de condrocito auxiliares sin transducir con una relación de 1:10 de células transfectadas con respecto a las células auxiliares. Los especímenes se recolectaron desde 6 semanas a 12 semanas tras la inyección. Las células se mueven libremente en la articulación y se mueven al área con afinidad específica para estas células. La sinovial, meniscos y los defectos de cartílago pueden ser sitios posibles para la

adhesión celular. A las seis y doce semanas tras la inyección, los tejidos regenerados se observaban tanto en las áreas con defecto de cartílago parcial o totalmente dañadas. Esta afinidad específica por el área dañada es otra ventaja de la utilización de células mezcladas para la aplicación clínica. Si se puede curar la artritis degenerativa solo con la inyección de células en la articulación sin incluir distintos aparatos físicos tales como un armazón o cualquier otra estructura tridimensional, los pacientes se pueden tratar convenientemente sin una cirugía mayor.

Cualquiera que sea el mecanismo de acción, y sin quedar ligados por ninguna teoría en particular con respecto al mecanismo de acción, el hallazgo de la síntesis de cartílago hialino utilizando la composición de células mezcladas de la invención indica que una larga duración de una concentración alta de TGF- β o BMP puede estimular la regeneración de cartílago hialino. Las propiedades del tejido formado de nuevo se determinaron por métodos histológicos. Mediante la tinción tricrómica de Mason y Safranina-O, indicaban que el tejido recién formado era idéntico al cartílago hialino circundante (Figuras 3 hasta 7).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo I – Materiales y Métodos

Construcción de plásmidos

Se generó el plásmido pMTMLV β 1 subclonando un fragmento Bgl de 1,2 kb que contenía la secuencia codificante de TGF- β 1 y un sitio poliA de la hormona de crecimiento en el extremo 3' en el sitio BamHI del pMTMLV. Se generó el plásmido pMTBMP2 subclonando un fragmento Sall-NotI de 1,2 kb que contenía la secuencia codificante de BMP2 en los sitios Sall-NotI de pMTMLV. El vector pMTMLV se derivaba del vector retroviral MFG eliminando las secuencias gag y env completas así como alguna secuencia del paquete ψ .

Cultivo celular y transducción – El ADNc de TGF- β y BMP-2 clonado en los vectores retrovirales se transdujeron individualmente en fibroblastos (NIH3T3-TGF- β 1 y NIH3T3-BMP-2) y condrocitos (hCon-TGF- β 1). Se cultivaron en un medio de Eagle modificado de Dulbecco (GIBCO-BRL, Rockville, MD) con una concentración del 10 % de suero fetal bovino.

Para seleccionar las células con la secuencia genética transducida, se añadió neomicina (300 μ g/ml) en el medio. Las células que expresaban TGF- β 1 y BMP-2 a veces se almacenaron en nitrógeno líquido y se cultivaron justo antes de la inyección.

La transfección del gen TGF- β se llevó a cabo utilizando el método de co-precipitación en fosfato cálcico (Fig. 1). Aproximadamente el 80 % de las colonias supervivientes expresaban el ARNm del transgén. Estas células productoras de TGF- β 1 seleccionadas se incubaron en una solución de sulfato de zinc. Cuando las células se cultivaron en una solución de 100 mM de sulfato de zinc, producían ARNm. La tasa de secreción de TGF- β era aproximadamente de 32 ng/10⁶ células/24 h.

Para ensayar y confirmar la producción de proteínas BMP-2 biológicamente activas por las células de fibroblasto NIH3T3 infectadas por los vectores retrovirales que contenían ADNc de BMP-2, se llevaron a cabo ensayos de actividad de fosfatasa alcalina (ALP) con células NIH3T3-metalotioneína de control (Fig. 2A) y NIH3T3-BMP-2 (Fig. 2B). El color azul en la Fig. 2B muestra la expresión de proteína BMP-2.

Se cultivaron 1,5 x 10⁶ células NIH3T3 durante una noche en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos. Se colocaron 0,5 x 10⁵ células indicadoras (MC3T3E1) en inserciones de cultivo celular y se cultivaron durante una noche. El medio de cultivo se aspiró de la inserción de cultivo y se transfirió la inserción de cultivo en una placa de 6 pocillos y se incubó durante 48-72 horas. El medio de cultivo se aspiró de las inserciones de cultivo. Se añadieron 5 ml de 1x de solución salina de tampón fosfato (PBS) para lavar las células. Se añadieron 4 ml de formaldehído el 3,7 %/1x solución PBS a cada inserción, y se fijaron las células durante 20 min a 4 °C. Se lavaron las células dos veces con 1x PBS. Se añadieron 3 ml de solución de tinción ALP a cada inserción de cultivo, y se incubó la inserción de cultivo durante aproximadamente 20 min a 1 h a temperatura ambiente en oscuridad para el desarrollo del color azul. La solución de tinción de ALP, ES 0,1 mg/ml de fosfato de naftol AS-MX (Sigma N5000), un 0,5 % de N-dimetilformamida (Sigma D8654), 2 mM de MgCl₂, 0,3 mg/ml de sal Fast Blue BB (Sigma F3378) en 0,1 M de Tris-HCl, pH 8,5.

Ejemplo II – Métodos experimentales y resultados

Regeneración del defecto de cartílago articular en conejo – Se seleccionaron conejos blancos Nueva Zelanda de 2,0 – 2,5 kg de peso para el estudio con animales. Estos conejos eran maduros y tenían un cerco. Se expuso la articulación de la rodilla y se hizo un defecto de cartílago parcial (3 mm x 6 mm, 1-2 mm de profundidad) o un defecto de grosor completo (3 mm x 6 mm, 2-3 mm de profundidad) en la capa de cartílago hialino del cóndilo femoral con un escalpelo. Se inyectaron o bien condrocitos humanos de control (hCon), o una mezcla de hCon y

células NIH3T3-TGF- β 1, o células NIH3T3-BMP-2 en la articulación de la rodilla con defecto de los conejos. Estas células (15-20 μ l de 2×10^6 células/ml) se cargaron en la parte superior del defecto y luego se dejaron en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. En el experimento en el que las mezclas de hCon y células NIH3T3-BMP-2 se inyectaron en los conejos con un defecto de grosor completo, se inyectaron estas composiciones de células mixtas en el defecto 3 semanas después de producir el defecto. Los cóndilos femorales se recolectaron a las 6 o 12 semanas tras la inyección de las células y se examinaron.

Regeneración del cartílago con células mezcladas (Condrocitos humanos y células NIH3T3-TGF- β 1) Inyección en conejos con un defecto parcial – Se inyectaron los hCon de control o una composición que comprendía una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 en la articulación de la rodilla de los conejos que contenían un defecto parcial del cartílago (3 mm x 5 mm, 1-2 mm de profundidad) en el cóndilo femoral. La mezcla de células (15-20 μ l de 2×10^6 células/ml, relación 10:1 de hCon y NIH3T3-TGF- β 1) se cargó en la parte superior del defecto y entonces se dejó en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. Los especímenes se recolectaron a las 6 semanas tras la inyección y se observaron microscópicamente. Las Figuras 3A y 3C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 (A) o hCon solos (C). Las Figuras 3B y 3D muestran la tinción tricrómica de Mason del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 (B) o hCon solos (D). [Magnificación original: (B y D) x12,5].

Regeneración de cartílago con células mezcladas (condrocitos humanos y células NIH3T3-TGF- β 1) Inyección en conejos con un defecto de grosor completo – Se inyectaron hCon de control o una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 en la articulación de la rodilla de conejos que contenían un defecto de grosor completo en el cartílago (3 mm x 5 mm, 2-3 mm de profundidad) en el cóndilo femoral. La mezcla celular (20-25 μ l de 2×10^6 células/ml, relación 10:1 de hCon y NIH3T3-TGF- β 1) se cargó en la parte superior del defecto y luego se dejó en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. Los especímenes se recolectaron a las 12 semanas tras la inyección y se observaron microscópicamente. Las Figuras 4A y 4D muestran fotos de los cóndilos femorales 12 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 (A) o hCon solos (D). Las Figuras 4B, 4C y 4E muestran la tinción tricrómica de Mason (B y E) y la tinción con Safranina-O (C) de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-TGF- β 1 (B y C) o hCon solos (E). [Magnificación original: (B, C y E) x12,5].

Regeneración de cartílago con células mezcladas (condrocitos humanos y células NIH3T3-BMP-2) Inyección en conejos con un defecto parcial – Se inyectaron los hCon de control o una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 en la articulación de la rodilla de los conejos que contenían un defecto parcial del cartílago (3 mm x 5 mm, 1-2 mm de profundidad) en el cóndilo femoral. La mezcla de células (15-20 μ l de 2×10^6 células/ml, relación 10:1 de hCon y NIH3T3-BMP-2) se cargó en la parte superior del defecto y entonces se dejó en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. Los especímenes se recolectaron a las 6 semanas tras la inyección y se observaron microscópicamente. Las Figuras 5A y 5C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (A) o hCon solos (C). Las Figuras 5B y 5D muestran la tinción tricrómica de Mason del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (B) o hCon solos (D). [Magnificación original: (B y D) x12,5].

Regeneración de cartílago con células mezcladas (condrocitos humanos y células NIH3T3-BMP-2) Inyección en conejos con un defecto de grosor completo – Se inyectaron hCon de control o una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 en la articulación de la rodilla de conejos que contenían un defecto de grosor completo en el cartílago (3 mm x 5 mm, 2-3 mm de profundidad) en el cóndilo femoral. En este caso, las células se inyectaron 3 semanas tras la producción del defecto. La mezcla celular (20-25 μ l de 2×10^6 células/ml, relación 10:1 de hCon y NIH3T3-BMP-2) se cargó en la parte superior del defecto y luego se dejó en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. Los especímenes se recolectaron a las 6 semanas tras la inyección y se observaron microscópicamente. Las Figuras 6A y 6D muestran fotos de los cóndilos femorales 12 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (A) o hCon solos (D). Las Figuras 6B, 6C y 6E muestran la tinción tricrómica de Mason (B y E) y la tinción con Safranina-O (C) de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células NIH3T3-BMP-2 (B y C) o hCon solos (E). [Magnificación original: (B, C y E) x12,5].

Regeneración del cartílago con células mezcladas (condrocitos humanos y células de condrocito humano-TGF- β 1) Inyección en conejos con un defecto de grosor completo – Se inyectaron condrocitos humanos (hCon) de control o una mezcla de hCon y hCon-TGF- β 1 en la articulación de la rodilla de los conejos que contenían un defecto de grosor completo del cartílago (3 mm x 5 mm, 2-3 mm de profundidad) en el cóndilo femoral. La mezcla de células (20-25 μ l de 2×10^6 células/ml, relación 1:1 de hCon y hCon-TGF- β 1) se cargó en la parte superior del defecto y entonces se dejó en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. Los especímenes se recolectaron a las 6 semanas tras la inyección y se observaron microscópicamente. Las Figuras 7A y 7C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y hCon-TGF- β 1 (A) o hCon solos (C). Las Figuras 7B y 7D muestran la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y hCon-TGF- β 1 (B) o hCon solos (D). [Magnificación original: (B y D) x12,5].

Regeneración del cartílago con células mezcladas (Condrocitos humanos y células de condrocito humano-TGF-β1)

Inyección en conejos con un defecto parcial – Se inyectó una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 en la articulación de la rodilla de los conejos que contenía un defecto parcial del cartílago (3 mm x 5 mm, 1-2 mm de profundidad) en el cóndilo femoral. La mezcla de células (15-20 µl de 2×10^6 células/ml, relación 3:1 o 5:1 de hCon y hCon-TGF-β1) se cargó en la parte superior del defecto y entonces se dejó en el defecto durante 15-20 min para permitir que las células penetraran en la herida antes de la sutura. Los especímenes se recolectaron a las 6 semanas tras la inyección y se observaron microscópicamente. Las Figuras 8A y 8C muestran fotos de los cóndilos femorales 6 semanas tras la inyección con una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 (relación 3:1) (A) o una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 (relación 5:1) (C). Las Figuras 8B y 8D muestran la tinción tricrómica de Mason de secciones del cóndilo femoral inyectado con una mezcla de hCon y células hCon-TGF-β1 con una relación 3:1 (B) o 5:1 (D). [Magnificación original: (B y D) x12,5].

Mientras que las realizaciones particulares de la presente invención se han descrito anteriormente con fines de ilustración, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden hacer numerosas variaciones de los detalles de la presente invención sin alejarse de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición celular mixta que consiste en

- 5 a) una primera población de células de fibroblasto o condrocito transfectadas o transducidas con un gen que codifica el factor $\beta 1$ de crecimiento de transformación (TGF- $\beta 1$) o la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2);
 b) una segunda población de células de fibroblasto o condrocito que no han sido transfectadas o transducidas con el gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2, donde las formas de células de condrocito existentes endógenamente están disminuidas en el sitio diana, y donde la generación de TGF- $\beta 1$ o BMP-2 por la primera población de
 10 células de fibroblasto o condrocito en el sitio diana estimula a la segunda población de células para que generen cartílago hialino; y
 c) un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas,

15 donde la relación en la composición de la segunda población de células que no han sido transfectadas o transducidas con el gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 con respecto a la primera población de células de fibroblasto o condrocito que han sido transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 es desde 1:1 a 20:1.

20 2. Una composición celular mixta de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la relación es desde 1:1 a 10:1.

3. Una composición celular mixta de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la relación es de 10:1.

4. Una composición celular mixta de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha composición es una composición inyectable.

25 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 está radiada.

30 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 y la segunda población de células no transfectadas o transducidas con el gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 se obtienen de la misma fuente de mamífero.

35 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con un gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 y la segunda población de células no transfectadas ni transducidas con el gen que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 se obtienen de diferentes fuentes de mamífero.

40 8. Un recipiente de almacenamiento que comprende la composición celular mixta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un recipiente para almacenar las células a una temperatura de aproximadamente -70 °C a aproximadamente -196 °C.

45 9. Un recipiente de almacenamiento que comprende una composición celular mixta inyectable de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un recipiente para almacenar las células a una temperatura de aproximadamente -70 °C a aproximadamente -196 °C.

10. El uso de una cantidad eficaz de la composición celular mixta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para la generación de cartílago hialino en un sitio diana, donde

- 50 (i) una primera población de células de fibroblasto o condrocito transfectadas o transducidas in vitro con un vector recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica TGF- $\beta 1$ o BMP-2 unida operativamente a un promotor; (ii) una segunda población de células de fibroblasto o condrocito no transfectadas ni transducidas con dicha secuencia de ADN; y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en un mamífero para generar TGF- $\beta 1$ o BMP-2 a partir de la primera población de células en el sitio diana del mamífero y de esta manera
 55 estimular a la segunda población de células para que genere cartílago hialino, y donde las formas de células de condrocito existentes endógenamente están disminuidas en el sitio diana, y donde la segunda población de células es singénica, alogénica o xenogénica respecto a dicho mamífero, donde la relación de la segunda población de células no transfectadas ni transducidas con respecto a la primera población de células que han sido transfectadas o transducidas con el gen que codifica el TGF- β o BMP es desde 1:1 a 20:1.

60 11. El uso de la reivindicación 10, donde el sitio diana es un espacio articular y la primera población de células genera TGF- β o BMP en el espacio articular, dando como resultado la generación de cartílago hialino en el espacio articular.

65 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, donde dicha relación es de desde 1:1 a 10:1.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, donde dicha relación es de 10:1.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con el gen que codifica el TGF- β o BMP está radiada.
- 5 15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con el gen que codifica el TGF- β o BMP y la segunda población de células no transfectadas ni transducidas son singénicas con respecto al huésped receptor.
- 10 16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con el gen que codifica el TGF- β o BMP y la segunda población de células no transfectadas ni transducidas son alogénicas con respecto al huésped receptor.
- 15 17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde la primera población de células transfectadas o transducidas con el gen que codifica el TGF- β o BMP y la segunda población de células no transfectadas ni transducidas son xenogénicas con respecto al huésped receptor.
18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, donde dicho vector recombinante es un vector vírico.
- 20 19. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, donde dicho vector recombinante es un vector plasmídico.
20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, donde dichas células se almacenan antes de su uso.
- 25 21. El uso de la reivindicación 20, donde dichas células se almacenan en un crioprotector antes de su uso.
22. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21, donde dicha transfección o transducción se consigue mediante un método que se selecciona de entre el grupo que consiste en encapsulación en liposomas, co-precipitación en fosfato cálcico, electroporación, mediación de DEAE-dextrano y mediación vírica.
- 30 23. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 22, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es distinto de una estructura tridimensional no viva y el uso da como resultado la generación de hueso y cartílago hialino en el espacio articular para tratar la osteoartritis.
- 35 24. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 22, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es para la preparación de una composición inyectable y el uso da como resultado la generación de hueso y cartílago hialino en el espacio articular para tratar la osteoartritis.

Figura 1

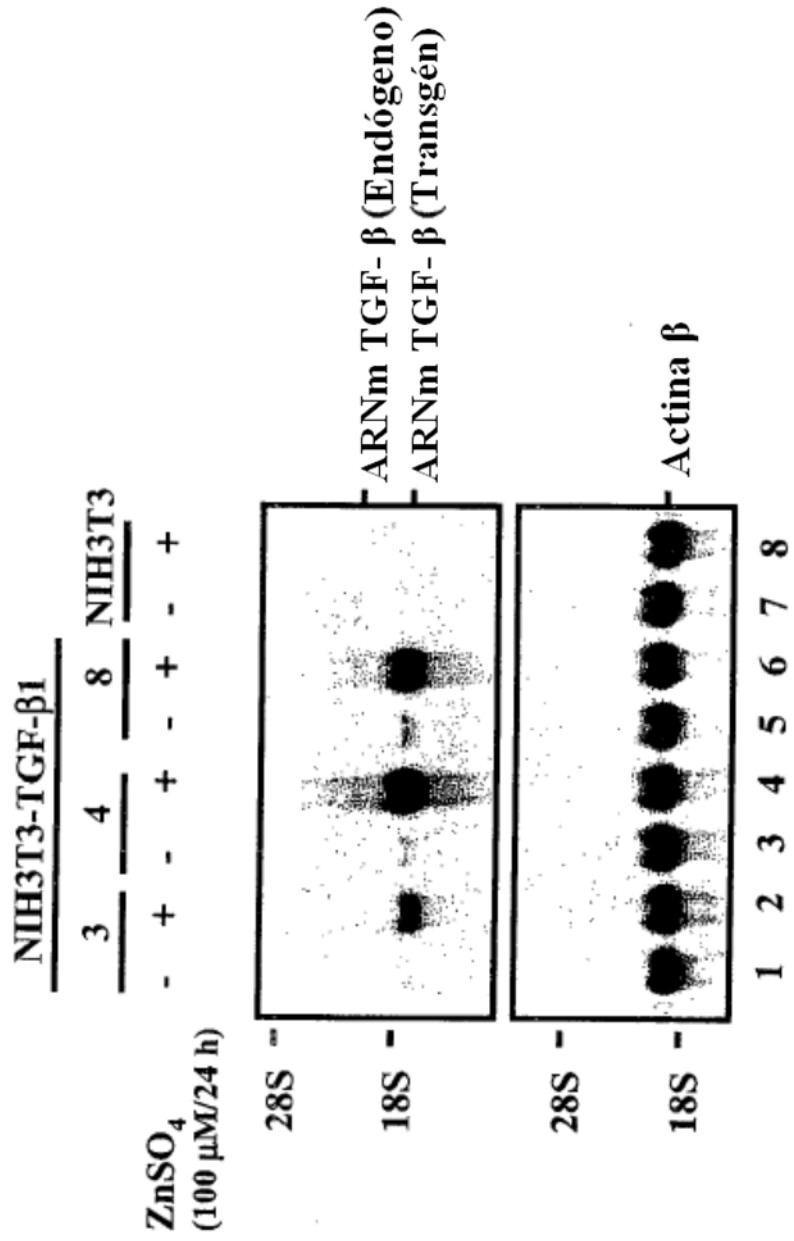
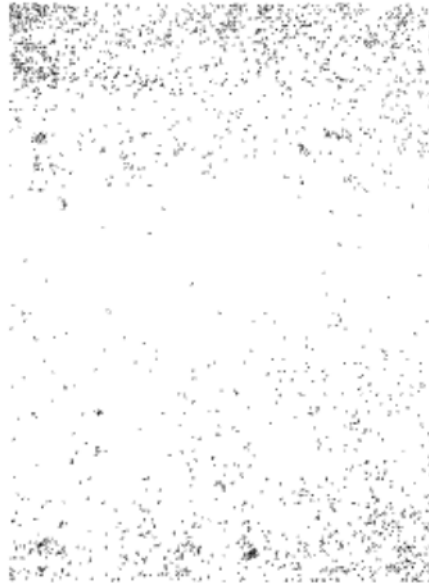


Figura 2

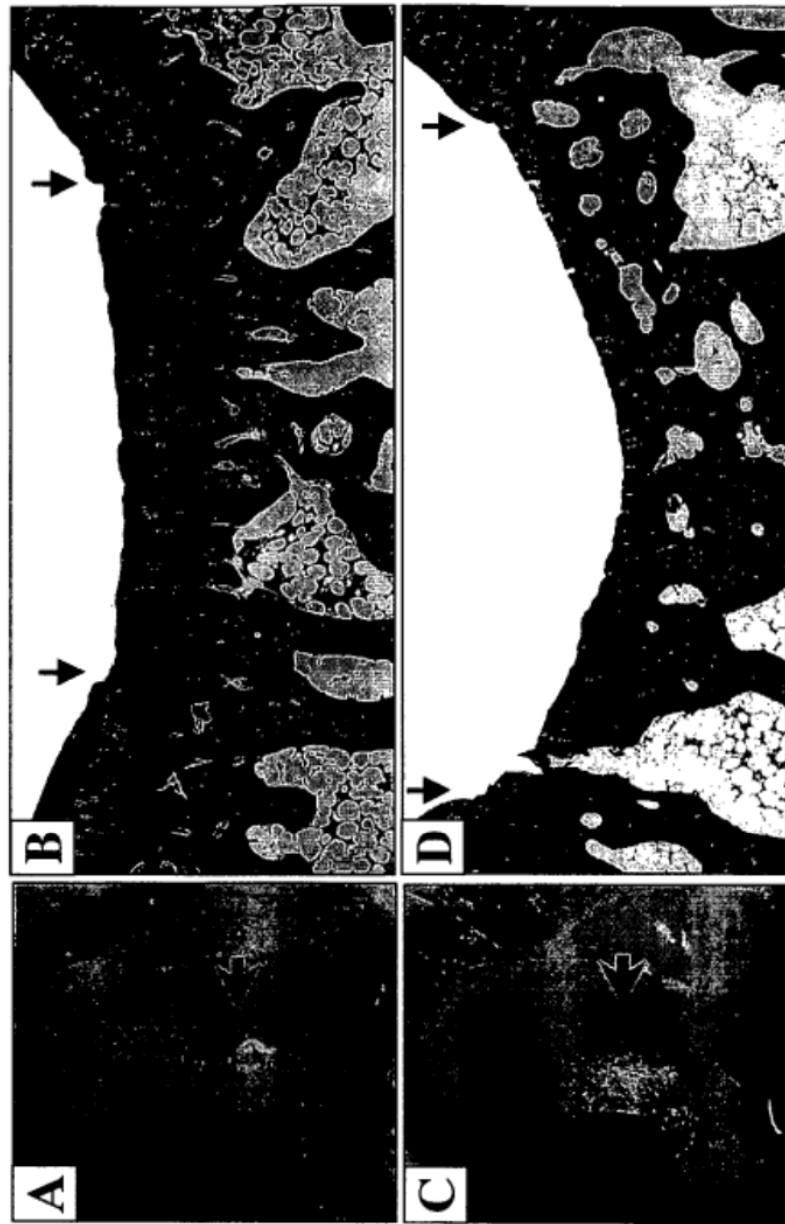


B



A

Figura 3

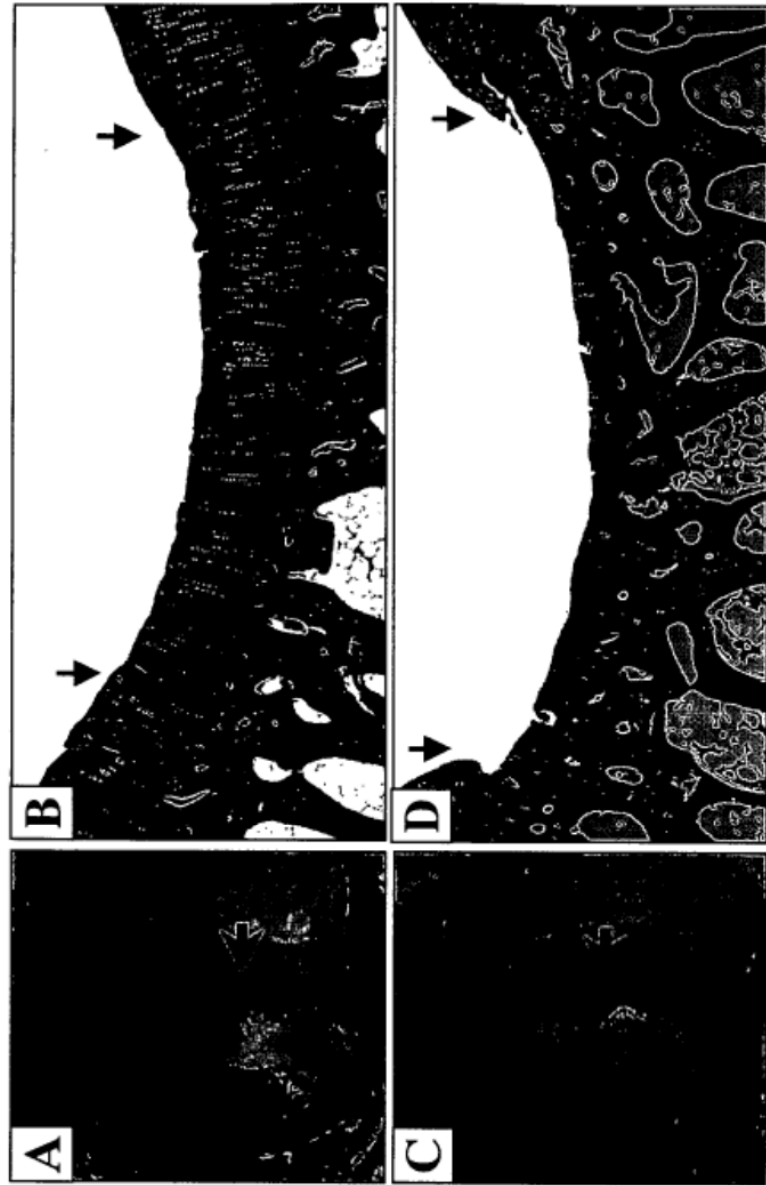


**hCon+3T3-TGF β 1
(6 sem)**

**Control
(6 sem)**



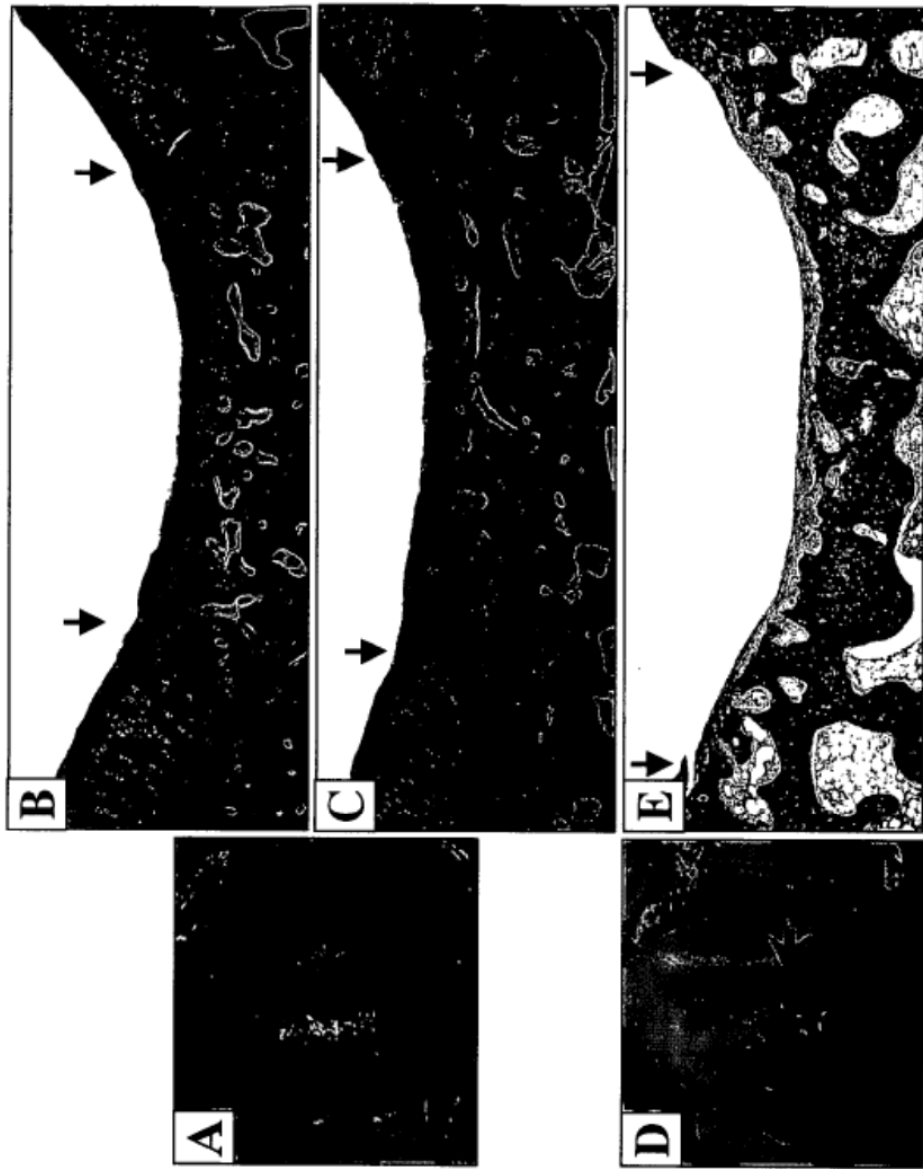
Figura 5



**hCon +3T3-hBMP-2
(6 sem)**

**Control
(6 sem)**

Figura 6



**hCon+3T3-hBMP2
(6 sem)**

**Control
(6 sem)**

Figura 7

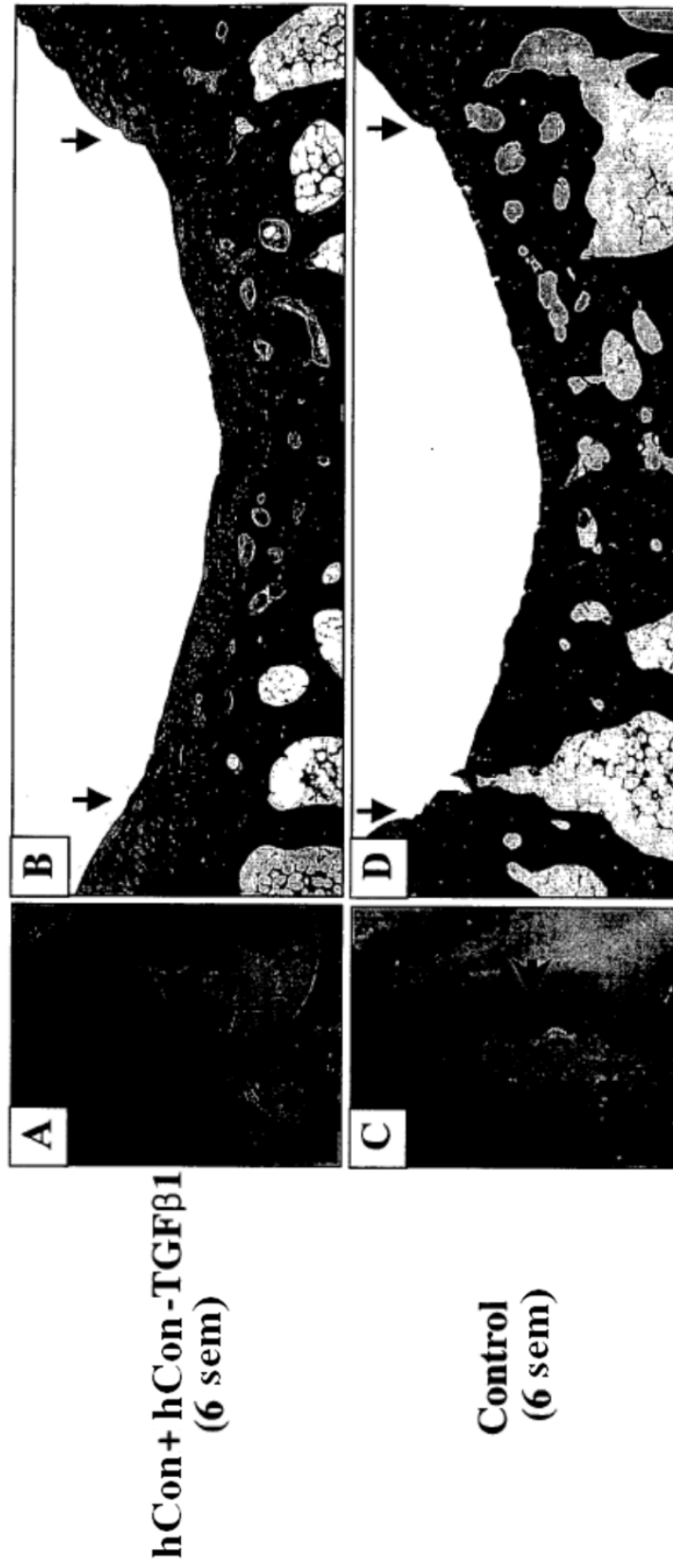


Figura 8

