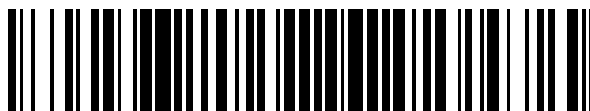


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 235**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2009 PCT/EP2009/050209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09087213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09700353 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2229433**

54 Título: **Diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea y células madre mesenquimatosas usando una combinación de factores de crecimiento**

30 Prioridad:

**11.01.2008 EP 08000458**

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

**17.01.2018**

73 Titular/es:

**BONE THERAPEUTICS S.A. (100.0%)  
Rue Auguste Piccard, 37  
6041 Gosselies, BE**

72 Inventor/es:

**BADOER, CINDY;  
BASTIANELLI, ENRICO y  
PESESSE, XAVIER**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 650 235 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**

Diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea y células madre mesenquimatosas usando una combinación de factores de crecimiento

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a métodos para la diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea (BMSC) y células madre mesenquimatosas (MSC), a células y poblaciones de células que pueden obtenerse mediante dichos métodos y a usos de los mismos particularmente en el campo de terapia ósea.

**Antecedentes de la invención**

10 El trasplante de células madre que pueden experimentar diferenciación osteogénica o de células que están destinadas a diferenciación osteogénica es una vía prometedora para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los huesos, en particular cuando el tratamiento requiere la producción de nuevo hueso.

15 Las células madre de médula ósea (BMSC) y células madre mesenquimatosas (MSC) se han usado anteriormente para tratar trastornos óseos (Gangji *et al.*, 2005 Expert Opin Biol Ther 5: 437-42). Sin embargo, aunque tales células madre relativamente indiferenciadas pueden trasplantarse, no están destinadas a un linaje osteogénico y, por tanto, una proporción considerable de las células madre así trasplantadas pueden no contribuir finalmente a la formación del tejido óseo deseado.

Además, la cantidad de tales células madre que pueden obtenerse a partir de médula ósea u otros tejidos fuente frecuentemente no es satisfactoria y puede incluso reducirse adicionalmente en diversas circunstancias, tales como debido al uso de glucocorticoides o alcoholismo o debido a causas genéticas.

20 El documento WO 2007/093431 da a conocer un método que logró una magnitud adecuada de expansión *in vitro* de BMSC o MSC aisladas y produjo células que ya presentaban fenotipo osteoblástico. En dicho método, se cultivaron BMSC o MSC humanas en presencia de suero o plasma y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF). El documento WO 2007/093431 no enseña el uso de la combinación específica de los factores de crecimiento FGF y TGF para obtener osteoblastos y no sugiere ninguna ventaja de los mismos.

25 Existe la necesidad de métodos sencillos y fiables adicionales para producir osteoprogenitores útiles, osteoblastos o células con fenotipo osteoblástico a partir de BMSC y MSC. Tales métodos se desean particularmente cuando logran un mayor grado de expansión celular y/o producen células con propiedades ventajosas adicionales, tales como por ejemplo, células que provocan menos rechazo de tejidos en sujetos alogénicos.

30 Un objeto de la invención es proporcionar tales métodos y células con fenotipo de osteoblastos que pueden obtenerse de ese modo.

**Sumario de la invención**

35 Los inventores se dieron cuenta de que el potencial de expansión de células madre adultas, más específicamente de células madre de médula ósea (BMSC) y células madre mesenquimatosas (MSC), puede aumentarse considerablemente tras la diferenciación osteogénica cuando dichas células se cultivan en presencia de suero o plasma, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGFB), mediante lo cual pueden lograrse cantidades aumentadas de células y poblaciones de células con fenotipo de osteoblastos u osteoprogenitoras y poblaciones de células.

La presente invención proporciona la materia tal como se expone en todas y cada una de las reivindicaciones 1 a 16.

40 La materia proporcionada por la invención pertenece por tanto específicamente a la divulgación, descripción y enseñanza de la presente memoria descriptiva.

Por tanto, en un aspecto la invención proporciona un método para obtener osteoprogenitores u osteoblastos a partir de células madre de médula ósea (BMSC) o células madre mesenquimatosas (MSC) humanas adultas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende cultivar dichas BMSC o MSC en un medio que incluye suero o plasma humano, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGFB).

45 La memoria descriptiva describe además un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de células madre de médula ósea (BMSC) humanas o células madre mesenquimatosas (MSC) humanas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto dichas BMSC o MSC con suero o plasma humano, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y factor de crecimiento transformante beta (TGFB) o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.

50 Los presentes métodos pueden diferenciar una fracción sustancial, por ejemplo una mayoría, de células madre tratadas hacia fenotipos de osteoprogenitores u osteoblastos. Por tanto, los métodos de la invención pueden

emplearse para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos *per se*.

Sin embargo, se apreciará que los métodos de la invención pueden producir generalmente poblaciones de células que comprenden una porción sustancial, por ejemplo una mayoría, de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos. Tales poblaciones de células pueden incluir opcionalmente tipos de células adicionales.

5 Por consiguiente, la memoria descriptiva contempla un método para obtener una población de células que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC humanas o MSC humanas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto dichas BMSC o MSC con suero o plasma humano, FGF o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y TGFB o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.

10 Los presentes métodos permiten generar números elevados de células osteogénicas para los fines de trasplante. Esto permite reducir adicionalmente la cantidad de tejido que es necesario extraer de un sujeto para obtener las células BMSC o MSC de partida. Esto también permite obtener números adecuados de células osteogénicas a partir de sujetos con recuentos disminuidos de células BMSC o MSC. Además, los métodos permiten el acortamiento del tiempo durante el cual las células diferenciadas pueden trasplantarse a un paciente, dando como resultado por tanto una terapia más rápida.

15 En una realización, los métodos anteriores pueden comprender las etapas de:

(a) recuperar células de una muestra biológica de un sujeto humano que comprenden BMSC o MSC;

(b) opcionalmente, aislar células mononucleadas de las células recuperadas en (a);

20 (c) añadir células de (a) o (b) a un medio que comprende suero o plasma humano, FGF y TGFB, y cultivar la mezcla de células-medio, tal como para permitir la adherencia de las células a una superficie de sustrato;

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

25 En una realización de cualquiera de los métodos anteriores, pueden exponerse células BMSC o MSC a FGF y TGFB de manera concurrente, es decir simultáneamente.

En realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos anteriores, el suero o plasma humano puede ser autólogo con respecto a las células BMSC o MSC, o puede ser alogénico (homólogo) con respecto a las células BMSC o MSC.

30 En una realización adicional de cualquiera de los métodos anteriores, no se usa material de animales no humanos (tal como, por ejemplo, componentes de suero) en el cultivo de las células BMSC o MSC. Esto disminuye el riesgo de rechazo xenogénico de las células cultivadas en seres humanos así como reduce el riesgo de contaminación de pacientes con patógenos.

35 Realizaciones adicionales preferidas de los métodos anteriores se refieren a características adicionales, tales como sin limitación, tiempos de incubación, pases, cantidades de componentes, etc., que solos o en combinación subyacen además a la provisión de las presentes células y poblaciones de células.

40 Los inventores se dieron cuenta además sorprendentemente de que la expresión del complejo de histocompatibilidad principal HLA-DR en células con fenotipo de osteoblastos obtenidas usando los presentes métodos es significativamente inferior que la expresión de HLA-DR observada cuando se aplica el método del documento WO 2007/093431. Tal expresión de HLA-DR inferior puede potenciar el carácter inmunoprivilegiado de las células con fenotipo de osteoblastos tal como se obtienen en el presente documento, reduciendo de ese modo el riesgo de rechazo de tales células y permitiendo una aplicación más amplia de las mismas también en pacientes alogénicos.

45 La invención también proporciona, por tanto, células con fenotipo de osteoblastos que presentan propiedades novedosas y ventajosas con respecto a la técnica anterior. Por consiguiente, en aspectos la invención proporciona una población de células que comprende osteoprogenitores u osteoblastos humanos, caracterizada porque dichos osteoprogenitores u osteoblastos (1) comprenden la expresión de CD90, CD105, CD73, CD63, CD166, fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, (2) no expresan CD45, CD14, CD19, y (3) menos del 15% de las células expresan HLA-DR.

50 La memoria descriptiva describe además osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como poblaciones de células que comprende los mismos, que pueden obtenerse u obtenerse directamente usando los métodos de la invención.

Los inventores también analizaron las células osteoblásticas logradas en el presente documento para definir un nuevo tipo de células y poblaciones de células que comprenden las mismas, que pueden ofrecer una superioridad

particular en la terapia, especialmente en la terapia de trasplante óseo.

5 Por tanto, la memoria descriptiva proporciona osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos, así como poblaciones de células que comprenden los mismos, caracterizados porque dichas células (1) comprenden la expresión de CD90, CD105, CD73, CD63, CD166 y fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, (2) no expresan CD45, CD14, CD19, y (3) menos del 25% de las células, preferiblemente menos del 20% de las células e incluso más preferiblemente menos del 15% de las células.

En determinadas realizaciones, menos del 10% de las células o menos del 7% de las células expresan HLA-DR (es decir, una proporción considerable de las células no expresan HLA-DR).

10 Tal como se mencionó, la invención también contempla poblaciones de células que comprenden los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se definen en el presente documento. Una población de células a modo de ejemplo puede comprender al menos el 10%, preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 50%, por ejemplo, al menos el 60%, aún más preferiblemente al menos el 70%, por ejemplo, al menos el 80%, e incluso más preferiblemente al menos el 90%, por ejemplo, al menos el 95% de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se definen en el presente documento. Por ejemplo, la población de células puede comprender menos del 50%, preferiblemente menos del 40%, incluso más preferiblemente menos del 30%, aún más preferiblemente menos del 20% y todavía más preferiblemente menos del 10%, por ejemplo, menos del 7%, menos del 5% o menos del 2% de tipos de células distintas de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se definen en el presente documento.

20 Aspectos relacionados se refieren a usos terapéuticos de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o de poblaciones de células que comprenden los mismos, tal como enseña la invención, en trastornos relacionados con los huesos y formulaciones farmacéuticas correspondientes que comprenden dichas células o poblaciones de células.

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

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la comparación de gráficos de caja y bigotes del rendimiento de un cultivo primario de osteoblastos en medio que contiene plasma y TGFB-1 10 ng/ml o que contiene plasma y tanto FGF2 10 ng/ml como TGFb-1 10 ng/ml (n=4).

30 La figura 2 muestra la comparación del rendimiento de cultivo de osteoblastos en medio complementado frente a no complementado con TGFb-1 10 ng/ml. (A) cultivo primario, (B) cultivo secundario, (C) global.

La figura 3 muestra la mineralización por células cultivadas en presencia de (A) FGF2 sólo o (B) FGF2 y TGFb-1, sometida a ensayo mediante tinción con rojo de alizarina de la matriz.

35 La figura 4 ilustra el efecto inmunosupresor de células cultivadas en TGFb-1/FGF2 sobre PBMC estimuladas por PHA.

#### Descripción detallada de la invención

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

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

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

45 El término “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similar, pretende abarcar variaciones de +/- 10% o menos, preferiblemente +/- 5% o menos, más preferiblemente +/- 1% o menos, y todavía más preferiblemente +/- 0,1% o menos de y desde el valor especificado, en tanto que tales variaciones sean apropiadas para realizarse en la invención dada a conocer. Ha de entenderse que el valor al que se refiere el modificador “aproximadamente” también se da a conocer por sí mismo específicamente, y preferiblemente.

50 Todos los documentos mencionados en la presente memoria descriptiva se incorporan por el presente documento por referencia en su totalidad. En particular, las enseñanzas de todos los documentos a los que se hace referencia específicamente en el presente documento se incorporan por referencia.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos usados al dar a conocer la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

### 1. Métodos de la invención

5 Tal como se detalla en la sección de Sumario, en un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, así como para obtener poblaciones de células que comprenden osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, a partir de células madre de médula ósea humanas *in vitro* o *ex vivo*.

10 Tal como se usa en el presente documento, la mención de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos abarca generalmente células que pueden contribuir a, o pueden desarrollarse a células que pueden contribuir a, la formación de material óseo o matriz ósea. En particular, los métodos de la invención dan como resultado células y poblaciones de células que, tal como sustancian experimentalmente los inventores, son útiles para restaurar la formación de hueso en entornos terapéuticos. En consecuencia, la mención de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos debe interpretarse como que se desea abarcar cualquiera de  
15 tales células útiles del linaje osteogénico que resultan de los métodos de la invención.

La médula ósea es el tejido blando que ocupa las cavidades de huesos largos, algunos canales haversianos y los espacios entre las trabéculas de hueso canceloso o esponjoso. El término abarca particularmente pero sin limitación médula ósea roja, que se encuentra en todos los huesos en los primeros años de vida y en ubicaciones restringidas en la edad adulta (por ejemplo, en el hueso esponjoso), así como médula ósea amarilla.

20 Como un todo, la médula ósea es un tejido complejo compuesto entre otros por células madre hematopoyéticas, glóbulos rojos y blancos y sus precursores, células madre mesenquimatosas (MSC), células estromales y sus precursores, y un grupo de células que incluyen fibroblastos, reticulocitos, adipocitos, y células que forman una red de tejido conjuntivo denominada "estroma".

25 Las células de la médula ósea contribuyen a muchos tejidos diversos tras el trasplante sistémico tanto en ratones como en seres humanos. Esta capacidad puede reflejar las actividades de múltiples células madre presentes en la médula ósea, tales como, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas y/o células madre multipotentes de médula ósea.

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

35 El término "aislar" con referencia a un componente particular indica la separación de ese componente de al menos otro componente de una composición de la que el primer componente está aislándose. El término "aislado" tal como se usa en el presente documento en relación con cualquier población de células también implica que tal población de células no forma parte de un cuerpo humano o animal.

40 El término "célula madre" se refiere generalmente a una célula no especializada o relativamente menos especializada y de proliferación competente, que puede autorrenovarse, es decir, puede proliferar sin diferenciación, y la cual o la progenie de la cual puede dar lugar a al menos un tipo de célula relativamente más especializado. El término abarca células madre que pueden autorrenovarse sustancialmente sin limitación, es decir, en las que la progenie de una célula madre o al menos parte de la misma conserva sustancialmente el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación y la capacidad de proliferación de la célula madre progenitora, así como células madre que presentan autorrenovación limitada, es decir, en las que la capacidad de la progenie o parte de la misma para una proliferación y/o diferenciación adicional está reducida de manera demostrable en comparación con la célula progenitora. A modo de ejemplo y no de limitación, una célula madre puede dar lugar a descendientes que pueden diferenciarse a lo largo de uno o más linajes para producir células relativamente cada vez más especializadas, en la que tales descendientes y/o células relativamente cada vez más  
45 especializadas pueden ser por sí mismas células madre tal como se definen en el presente documento, o incluso para producir células diferenciadas de manera terminal, es decir, células completamente especializadas, que pueden ser posmitóticas.

El término "célula madre adulta" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre presente en u obtenida de (tal como aislada de) un organismo en la fase fetal o tras el nacimiento.

50 Las células madre de médula ósea preferibles tal como se definen en el presente documento tienen el potencial de generar células de al menos el linaje osteogénico (hueso), tal como, por ejemplo, células osteogénicas y/u osteoprogenitores y/o preosteoblastos y/o osteoblastos y/o osteocitos, etc.

Preferiblemente, al menos algunas células madre de médula ósea tal como se definen en el presente documento pueden tener también el potencial de generar células adicionales comprendidas en las poblaciones de células que resultan de los métodos de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje endotelial, por ejemplo células progenitoras endoteliales y/o células endoteliales.

- 5 Un tipo a modo de ejemplo, pero no limitativo de BMSC que tiene el potencial de generar células de al menos el linaje osteogénico son células madre mesenquimatosas. El término “célula madre mesenquimatosas” o “MSC” tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre adulta, derivada del mesodermo que puede generar células de linajes mesenquimatosos, normalmente de dos o más linajes mesenquimatosos, por ejemplo, linaje osteocítico (hueso), condrocítico (cartilago), miocítico (músculo), tendocítico (tendón), fibroblástico (tejido conjuntivo), adipocítico (grasa) y estromogénico (estroma de la médula ósea). Pueden aislarse MSC de, por ejemplo, médula ósea, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periosteo y tejido adiposo. Se han descrito MSC humanas, su aislamiento, expansión y diferenciación *in vitro* en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.486.359; patente estadounidense n.º 5.811.094; patente estadounidense n.º 5.736.396; patente estadounidense n.º 5.837.539; o patente estadounidense n.º 5.827.740.
- 10
- 15 Cualquier MSC descrita en la técnica y aislada mediante cualquier método descrito en la técnica puede ser adecuado en la presente invención, siempre que tales MSC puedan generar células de al menos el linaje osteocítico (hueso).

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

- 20 Posiblemente, pero sin limitación, al menos algunas MSC también podrían generar células adicionales comprendidas en las poblaciones de células que resultan de los métodos de la invención.

Tal como se muestra en los ejemplos, el presente método supone la selección de las células BMSC que en las condiciones de cultivo especificadas se adhieren a una superficie de sustrato. Se conoce en la técnica que pueden aislarse MSC de la médula ósea (u otras fuentes) seleccionando las células (mononucleares) que pueden adherirse a una superficie de sustrato, por ejemplo, superficie de plástico. Por tanto, sin limitarse a ninguna hipótesis, los presentes inventores especulan que en el presente método, las MSC pueden contribuir al menos parcialmente a la obtención de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC.

25

Por tanto, la presente memoria descriptiva también contempla un método para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) humanas *in vitro* o *ex vivo* que comprende poner en contacto dichas células MSC con suero o plasma humano, FGF o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y TGFB o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.

30

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

35

Las células BMSC pretenden abarcar todos y cada uno de los subtipos de las mismas, tales como sin limitación, “células que se autorrenuevan rápidamente” RS-1 o RS-2 tal como se describen en Colter *et al.* 2000 (PNAS 97(7): 3213-8); células de una “población lateral” (SP) tal como se describen por Goodell *et al.* 1997 (Nat Med 3(12): 1337-45); células precursoras osteogénicas (OP) que se identifican inicialmente por su baja densidad (por ejemplo, tras centrifugación en gradiente de densidad), naturaleza no adherente y bajo nivel de expresión de marcadores osteogénicos (tal como se describen por Long *et al.* 1995. J Clin Invest. 95(2): 881-7; documento US 5.972.703); células precursoras primitivas que pueden generar células de los linajes tanto hematopoyético como no hematopoyético tal como se describen por Krause *et al.* 2001 (Cell 105: 369-377) y Dominici *et al.* 2004. (PNAS 101 (32): 11761-6); y otras.

40

45

Debe entenderse que, dada la complejidad de las poblaciones de células madre de médula ósea, la presente invención no debe considerarse limitada a uno o más tipos de BMSC particulares. Más bien, en el presente método, uno o más tipos de células BMSC, por ejemplo, tal como se describieron anteriormente, pueden contribuir, quizás en una magnitud diferente, a la obtención de osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o a la obtención de poblaciones de células que comprenden tales. Por otro lado, ha de entenderse que el presente método también puede emplear una población de BMSC particular, por ejemplo, MSC, aislada al menos parcialmente de otras poblaciones de BMSC.

50

El término “*in vitro*” indica generalmente fuera de, o externo a, el cuerpo humano o animal. El término “*ex vivo*” se refiere normalmente a tejidos o células retirados de un cuerpo humano o animal y mantenidos o propagados fuera del cuerpo, por ejemplo, en un recipiente de cultivo. El término “*in vitro*” tal como se usa en el presente documento debe entenderse que incluye “*ex vivo*”.

55

En una realización, se obtienen BMSC o MSC de una muestra biológica de un sujeto.

El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a un animal, más particularmente a mamíferos no humanos y un organismo humano. Los sujetos animales no humanos pueden incluir también formas prenatales de animales, tales como, por ejemplo, embriones o fetos. Los sujetos humanos también pueden incluir fetos, pero como preferencia no embriones. Se prefieren sujetos humanos.

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

Una muestra biológica útil de un sujeto comprende BMSC o MSC del mismo. Tal muestra puede obtenerse normalmente de médula ósea, por ejemplo, de la cresta iliaca, fémur, tibia, columna vertebral, costillas u otros espacios medulares de un sujeto. Otra muestra biológica útil que comprende MSC puede derivarse, por ejemplo, de, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periosteo o tejido adiposo de un sujeto.  
15

En una realización, pueden obtenerse BMSC o MSC de un sujeto sano, lo que puede ayudar a garantizar la funcionalidad de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos obtenidos de dichas BMSC o MSC.

En otra realización, pueden obtenerse BMSC o MSC de un sujeto que corre el riesgo de o tiene un trastorno relacionado con los huesos, y que por tanto puede beneficiarse particularmente de la administración de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos obtenidos de dichas BMSC o MSC según los métodos de la invención.  
20

El término “trastorno relacionado con los huesos” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de enfermedad ósea, cuyo tratamiento puede beneficiarse de la administración de células de linaje osteogénico, por ejemplo, osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a un sujeto que tiene el trastorno. En particular, tales trastornos pueden caracterizarse, por ejemplo, por una disminución de la formación ósea o excesiva resorción ósea, por una disminución del número, la viabilidad o la función de osteoblastos u osteocitos presentes en el hueso, una disminución de la masa ósea en un sujeto, adelgazamiento del hueso, resistencia o elasticidad del hueso comprometidas, etc.  
25

A modo de ejemplo, pero no limitación, los trastornos relacionados con los huesos que pueden beneficiarse de la administración de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos tal como se describe en el presente documento pueden incluir trastornos locales o sistémicos, tales como, cualquier tipo de osteoporosis u osteopenia, por ejemplo, osteonecrosis primaria, posmenopáusica, senil, inducida por corticoides, cualquier osteonecrosis secundaria, osteonecrosis de un único sitio o de múltiples sitios, cualquier tipo de fractura, por ejemplo, compresión o fracturas de unión retardada, sin unión, con unión mala, estados que requieren fusión ósea (por ejemplo, fusiones espinales y remodelación), fracturas maxilofaciales, reconstrucción ósea, por ejemplo, tras lesión traumática o cirugía de cáncer, reconstrucción ósea craneofacial, osteogénesis imperfecta, cáncer de huesos osteolítico, enfermedad de Paget, trastornos endrocrinológicos, hipofosfatemia, hipocalcemia, osteodistrofia renal, osteomalacia, enfermedad ósea adinámica, artritis reumatoide, hiperparatiroidismo, hiperparatiroidismo primario, hiperparatiroidismo secundario, enfermedad periodontal, enfermedad de Gorham-Stout y síndrome de McCune-Albright.  
30  
35

En los presentes métodos, se ponen en contacto BMSC o MSC con suero o plasma humano, FGF o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y TGFB o una variante o derivado biológicamente activo del mismo.  
40

El término “poner en contacto” tal como se usa en el presente documento significa juntar, o bien directamente o bien indirectamente, una o más moléculas, componentes o materiales entre sí, facilitando de ese modo interacciones entre sí. Normalmente, un factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo, y suero o plasma humano, pueden ponerse en contacto con BMSC por medio de su inclusión en los medios, en los que se cultivan las BMSC.  
45

Un experto aprecia que el suero y el plasma humanos son composiciones biológicas complejas, que pueden comprender uno o más factores de crecimiento, citocinas u hormonas. Por tanto, se pretende que los factores de crecimiento mencionados FGF y TGFB o sus respectivos derivados o variantes biológicamente activos se proporcionen además de, es decir, de manera exógena a o en complemento a, el plasma o suero.  
50

En una realización adicional, pueden ponerse en contacto BMSC o MSC, además de con FGF y TGFB, con uno o más factores de crecimiento adicionales añadidos de manera exógena distintos de FGF y TGFB. El término “factor de crecimiento” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia biológicamente activa que influye en la proliferación, el crecimiento, la diferenciación, la supervivencia y/o la migración de diversos tipos de células, y puede efectuar cambios de desarrollo, morfológicos y funcionales en un organismo, o bien sola o bien cuando se modula por otras sustancias. Un factor de crecimiento puede actuar normalmente mediante unión, como un ligando, a un receptor (por ejemplo, receptor de superficie o intracelular) presente en células sensible al factor de crecimiento. Un factor de crecimiento en el presente documento puede ser particularmente una entidad proteínica  
55

que comprende una o más cadenas de polipéptido.

En una realización preferida, uno cualquiera o más o todos los factores de crecimiento usados en el presente método (la referencia general a un factor de crecimiento tal como se usa en el presente documento abarca particularmente los factores de crecimiento FGF y TGFB, así como el uno o más factores de crecimiento adicionales opcionales) es un factor de crecimiento humano. Tal como se usa en el presente documento, el término “factor de crecimiento humano” se refiere a un factor de crecimiento sustancialmente igual que un factor de crecimiento humano que se produce de manera natural. Por ejemplo, cuando el factor de crecimiento es una entidad proteínica, el/los péptido(s) constituyente(s) o polipéptido(s) del/de los mismo(s) pueden tener una secuencia de aminoácidos primaria idéntica a un factor de crecimiento humano que se produce de manera natural. Se prefiere el uso de factores de crecimiento humanos en el presente método, ya que se espera que tales factores de crecimiento provoquen un efecto deseable sobre la función celular humana.

El término “que se produce de manera natural” se usa para describir un objeto o entidad que puede encontrarse en la naturaleza distinto de producirse artificialmente por el hombre. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido presente en un organismo, que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado deliberadamente por el hombre en el laboratorio, se produce de manera natural. Cuando se hace referencia a una entidad particular, por ejemplo, a un polipéptido o una proteína, el término abarca todas las formas y variantes de las mismas que se producen en la naturaleza, por ejemplo, debido a una variación normal entre especies e individuos. Por ejemplo, cuando se hace referencia a un factor de crecimiento proteínico, el término “que se produce de manera natural” abarca factores de crecimiento que tienen diferencias en la secuencia primaria de su(s) péptido(s) o polipéptido(s) constituyente(s) debido a divergencia genética entre especies y variación alélica normal entre individuos.

El término “FGF” tal como se usa en el presente documento abarca todos y cada uno de la familia de factores de crecimiento del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). En particular, el FGF usado en los presentes métodos puede elegirse de FGF-1, FGF-2 y FGF-3, más preferiblemente es FGF-2.

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1) ácido se conoce también comúnmente como factor de crecimiento de unión a heparina 1 (HBGF-1), aFGF, factor de crecimiento de células endoteliales beta, o ECGF-beta. FGF-1 humano a modo de ejemplo incluye, sin limitación, FGF-1 que tiene una secuencia de aminoácidos primaria tal como se indica en el número de registro de Uniprot/Swissprot (<http://www.expasy.org/>) P05230. Un experto puede apreciar que dicha secuencia es de un FGF-1 precursor y puede incluir partes que se eliminan por procesamiento de FGF-1 maduro. FGF-1 humano a modo de ejemplo también se ha descrito entre otros por Jaye *et al.* 1986 (Science 233: 541-545) y Harper *et al.* 1986 (Biochemistry 25: 4097-4103).

El factor de crecimiento de fibroblastos básico se conoce también comúnmente como FGF-b, FGF-2, BFGF, HBGH-2, prostatropina o precursor de factor de crecimiento de unión a heparina 2 (HBGF-2). FGF-2 humano a modo de ejemplo incluye, sin limitación, FGF-2 que tiene una secuencia de aminoácidos primaria tal como se indica en el número de registro de Uniprot/Swissprot P09038. Un experto puede apreciar que dicha secuencia es de un FGF-2 precursor y puede incluir partes que se eliminan por procesamiento de FGF-2 maduro. FGF-2 humano a modo de ejemplo también se ha descrito entre otros por Abraham *et al.* 1986 (EMBO J 5: 2523-8) y Kurokawa *et al.* 1987 (FEBS Lett 213: 189-94).

El factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGF-3) también se conoce comúnmente como proteína de protooncogén INT-2, o HBGF-3. FGF-3 humano a modo de ejemplo incluye, sin limitación, FGF-3 que tiene una secuencia de aminoácidos primaria tal como se indica en el número de registro de Uniprot/Swissprot P11487. Un experto puede apreciar que dicha secuencia es de un FGF-3 precursor y puede incluir partes que se eliminan por procesamiento de FGF-3 maduro. FGF-3 humano a modo de ejemplo también se ha descrito entre otros por Brooks *et al.* 1989 (Oncogene 4: 429-436).

Los términos “TGF beta” o “TGFB” tal como se usa en el presente documento abarcan todos y cada uno de los miembros de la familia de factores de crecimiento del factor de crecimiento transformante beta (TGFB). En particular, el TGFB usado en los presentes métodos puede elegirse de TGFB-1, TGFB-2 y TGFB-3, más preferiblemente es TGFB-1.

El factor de crecimiento transformante beta-1 también se conoce como TGFB-1 y TGF-beta-1. TGFB-1 humano a modo de ejemplo incluye, sin limitación, TGFB-1 que tiene una secuencia de aminoácidos primaria tal como se indica en el número de registro de Uniprot/Swissprot P01137. Un experto puede apreciar que dicha secuencia es de un TGFB-1 precursor y puede incluir partes que se eliminan por procesamiento de TGFB-1 maduro. TGFB-1 humano a modo de ejemplo también se ha descrito entre otros por Derynck *et al.* 1985 (Nature 316: 701-5).

El factor de crecimiento transformante beta-2 también se conoce como TGFB-2, factor supresor de células T derivado de glioblastoma, GTSF, inhibidor del crecimiento de células BSC-1, poliérgina o cetermina. TGFB-2 humano a modo de ejemplo incluye, sin limitación, TGFB-2 que tiene una secuencia de aminoácidos primaria tal como se indica en el número de registro de Uniprot/Swissprot P61812. Un experto puede apreciar que dicha secuencia es de un TGFB-2 precursor y puede incluir partes que se eliminan por procesamiento de TGFB-2 maduro.



TGFB-2 humano a modo de ejemplo también se ha descrito entre otros por Webb *et al.* 1988 (DNA 7: 493-497).

5 El factor de crecimiento transformante beta-3 también se conoce como TGFB-3. TGFB-3 humano a modo de ejemplo incluye, sin limitación, TGFB-3 que tiene una secuencia de aminoácidos primaria tal como se indica en el número de registro de Uniprot/Swissprot P10600. Un experto puede apreciar que dicha secuencia es de un precursor TGFB-3 y puede incluir partes que se eliminan por procesamiento de TGFB-3 maduro. TGFB-3 humano a modo de ejemplo también se ha descrito entre otros por ten Dijke *et al.* 1988 (PNAS 85: 4715-4719) y Derynck *et al.* 1988 (EMBO J. 7: 3737-3743).

10 El presente método puede emplear variantes o derivados biológicamente activos de uno cualquiera o más o todos de los respectivos factores de crecimiento. En los métodos descritos en el presente documento, variantes o derivados "biólogicamente activos" del factor de crecimiento logran al menos aproximadamente el mismo grado de obtención de osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos a partir de BMSC que el respectivo factor de crecimiento, cuando otras condiciones son sustancialmente las mismas.

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

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

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

30 La identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse alineando de manera óptica (la alineación óptima de dos secuencias de proteína es la alineación que maximiza la suma de puntuaciones de parejas menos cualquier penalización por huecos introducidos; y puede realizarse preferiblemente mediante implementaciones informatizadas de algoritmos, tales como "Gap", usando el algoritmo de Needleman y Wunsch 1970 (J Mol Biol 48: 443-453), o "Bestfit", usando el algoritmo de Smith y Waterman 1981 (J Mol Biol 147: 195-197), disponibles en, por ejemplo, el paquete GCG™ v. 11.1.2 de Accelrys) las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y la puntuación, por un lado, el número de posiciones en la alineación en las que los polipéptidos contienen el mismo residuo de aminoácido y, por otro lado, el número de posiciones en la alineación en las que los dos polipéptidos difieren en su secuencia. Los dos polipéptidos difieren en su secuencia en una posición dada en la alineación cuando los polipéptidos contienen diferentes residuos de aminoácido en esa posición (sustitución de aminoácido), o cuando uno de los polipéptidos contiene un residuo de aminoácido en esa posición mientras que el otro no o viceversa (inserción o delección de aminoácido). La identidad de secuencia se calcula como la proporción (porcentaje) de posiciones en la alineación en las que los polipéptidos contienen el mismo residuo de aminoácido frente al número total de posiciones en la alineación. Los algoritmos adecuados adicionales para realizar alineaciones de secuencias y la determinación de la identidad de secuencia incluyen los basados en la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) descrita originalmente por Altschul *et al.* 1990 (J Mol Biol 215: 403-10), tal como el algoritmo "Blast 2 sequences" descrito por Tatusova y Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250).

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

La “variante” de polipéptido, tal como se usa en el presente documento, también incluye específicamente polipéptidos que tienen un determinado grado de similitud con dicho polipéptido. Preferiblemente, tales variantes pueden ser al menos el 90% similares, por ejemplo, preferiblemente al menos el 91% similares, por ejemplo, al menos el 92% similares, el 93% similares, más preferiblemente al menos el 94% similares, por ejemplo, el 95% similares, incluso más preferiblemente al menos el 96% similares, por ejemplo, al menos el 97% similares, aún más preferiblemente al menos el 98% similares, por ejemplo, al menos el 99% similares.

La similitud de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse alienando de manera óptima (véase anteriormente) las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y puntuando, por un lado, el número de posiciones en la alineación en las que los polipéptidos contienen un residuo de aminoácido igual o similar (es decir, sustituido de manera conservativa) y, por otro lado, el número de posiciones en la alineación en las que los dos polipéptidos difieren por lo demás en su secuencia.

Los dos polipéptidos difieren por lo demás en su secuencia en una posición dada en la alineación cuando los polipéptidos contienen residuos de aminoácido no conservativos en esa posición, o cuando uno de los polipéptidos contiene un residuo de aminoácido en esa posición mientras que el otro no o viceversa (inserción o deleción de aminoácido). La similitud de secuencia se calcula como la proporción (porcentaje) de posiciones en la alineación en las que los polipéptidos contienen un residuo de aminoácido igual o similar frente al número total de posiciones en la alineación.

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

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

En una realización preferida, el factor de crecimiento o una variante o derivado biológicamente activo del mismo puede ser recombinante, es decir, producido por un organismo huésped a través de la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante, que se ha introducido en el organismo huésped (por ejemplo, bacterias tales como sin limitación *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*; levaduras tales como por ejemplo *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris*; células vegetales cultivadas tales como entre otras células de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tobaccum*; células animales tales como células de insecto o de mamífero; u organismos multicelulares tales como plantas o animales) o un ancestro del mismo, y que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido. El uso de factores de crecimiento expresados de manera recombinante o variantes o derivados biológicamente activos de los mismos reduce el riesgo de transmisión de agentes patógenos. La producción recombinante de TGFB-1 se ha descrito entre otros por Bourdrel *et al.* 1993 (Protein Expr Purif 4: 130-40). Comúnmente, también están disponibles comercialmente factores de crecimiento recombinantes (por ejemplo, de Sigma, Biological Industries, R&D Systems, Peprotech, etc.).

El término “plasma” es tal como se define convencionalmente. El plasma se obtiene habitualmente de una muestra de sangre completa, proporcionada o en contacto con un anticoagulante (por ejemplo, heparina, citrato, oxalato o EDTA). Posteriormente, se separan los componentes celulares de la muestra de sangre del componente líquido (plasma) mediante una técnica apropiada, normalmente mediante centrifugación. El término “plasma” se refiere por tanto a una composición que no forma parte de un cuerpo humano o animal.

El término “suero” es tal como se define convencionalmente. El suero puede obtenerse habitualmente de una muestra de sangre completa permitiendo en primer lugar que tenga lugar coagulación en la muestra y posteriormente separando el coágulo así formado y componentes celulares de la muestra de sangre del componente líquido (suero) mediante una técnica apropiada, normalmente mediante centrifugación. La coagulación puede facilitarse mediante un catalizador inerte, por ejemplo, polvo o perlas de vidrio. Alternativamente, el suero puede obtenerse a partir del plasma eliminando el anticoagulante y la fibrina. El término “suero” se refiere por tanto a una composición que no forma parte de un cuerpo humano o animal.

El plasma o suero aislado puede usarse directamente en el método de la presente invención. Pueden almacenarse también apropiadamente para su uso posterior (por ejemplo, durante periodos de tiempo más cortos, por ejemplo, hasta aproximadamente 1-2 semanas, a una temperatura por encima de los puntos de congelación respectivos del plasma o suero, pero por debajo de la temperatura ambiental, esta temperatura será habitualmente de aproximadamente 4°C a 5°C; o durante tiempos más prolongados mediante almacenamiento en congelación, habitualmente a entre aproximadamente -70°C y aproximadamente -80°C).

- 5 El plasma o suero aislado puede inactivarse por calor tal como se conoce en la técnica, particularmente para eliminar el complemento. Cuando el presente método emplea plasma o suero autólogo con respecto a las células cultivadas en presencia de las mismas, puede no ser necesario inactivar por calor el plasma o suero. Cuando el plasma o suero es al menos parcialmente alogénico con respecto a las células cultivadas, puede ser ventajoso inactivar por calor el plasma o suero.
- Opcionalmente, el plasma o suero también puede esterilizarse antes de su almacenamiento o uso, usando filtros microbiológicos convencionales, preferiblemente con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  o menor.
- 10 En una realización, el presente método puede emplear suero o plasma humano que es autólogo con respecto a BMSC o MSC humanas en contacto con el mismo. El término "autólogo" con referencia a plasma o suero indica que el plasma o suero se obtiene del mismo sujeto que las BMSC o MSC que van a ponerse en contacto con dicho plasma o suero.
- En otra realización, el método puede emplear suero o plasma humano que es "homólogo" o "alogénico" con respecto a BMSC o MSC humanas en contacto con el mismo, es decir, obtenido de uno o más sujetos humanos (agrupados) distintos del sujeto del que se obtienen las BMSC o MSC.
- 15 En una realización adicional, el método puede emplear una mezcla de plasma o sueros autólogos y homólogos (alogénicos) tal como se definió anteriormente.
- Tal como se indica, los presentes métodos pueden comprender comúnmente las etapas de:
- (a) recuperar células de una muestra biológica de un sujeto humano que comprenden BMSC o MSC;
- (b) opcionalmente, aislar células mononucleadas de las células recuperadas en (a);
- 20 (c) añadir células de (a) o (b) a un medio que comprende suero o plasma humano, FGF y TGF $\beta$ , y cultivar la mezcla de células-medio, tal como para permitir la adherencia de las células a una superficie de sustrato;
- (d) retirar la materia no adherente y cultivar adicionalmente las células adherentes en el medio tal como se define en (c), tal como para permitir la obtención de osteoprogenitores, osteoblastos o células de tipo osteoblasto, o una población de células que comprende los mismos.
- 25 La etapa (b) puede realizarse usando métodos convencionales tales como, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad.
- La suspensión de células de las etapas (a) o (b) se cultiva en presencia de un medio, comúnmente medio de cultivo celular líquido. Normalmente, el medio comprenderá una formulación de medio basal tal como se conoce en la técnica. Muchas formulaciones de medios basales (disponibles, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC; o de Invitrogen, Carlsbad, California) pueden usarse para cultivar las células en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo modificado alfa (alfa-MEM), medio basal esencial (BME), BGJb, mezcla de nutrientes F-12 (Ham), medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) o medio libre de suero X-Vivo-10 (calidad clínica), disponibles de Invitrogen o Cambrex (Nueva Jersey), y modificaciones y/o combinaciones de los mismos.
- 30 Se conocen generalmente en la técnica composiciones de los medios basales anteriores y está dentro de la experiencia del experto en la técnica modificar o modular concentraciones de medios y/o complementos de medios según sea necesario para las células cultivadas.
- Tales formulaciones de medios basales contienen componentes necesarios para el desarrollo de células de mamífero, que se conocen *per se*. A modo de ilustración y no de limitación, estos componentes pueden incluir sales inorgánicas (en particular sales que contienen Na, K, Mg, Ca, Cl, P y posiblemente Cu, Fe, Se y Zn), tampones fisiológicos (por ejemplo, HEPES, bicarbonato), nucleótidos, nucleósidos y/o bases de ácido nucleico, ribosa, desoxirribosa, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes (por ejemplo, glutatión) y fuentes de carbono (por ejemplo glucosa, piruvato de sodio, acetato de sodio), etc.
- 40 Para su uso en cultivo, pueden suministrarse medios basales con uno o más componentes adicionales. Por ejemplo, pueden usarse complementos adicionales para suministrar a las células las sustancias y los oligoelementos necesarios para una expansión y crecimiento óptimos. Tales complementos incluyen insulina, transferrina, sales de selenio, y combinaciones de los mismos. Estos componentes pueden incluirse en una disolución salina tal como, pero sin limitarse a, disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS), disolución salina de Earle. Pueden añadirse complementos antioxidantes adicionales, por ejemplo,  $\beta$ -mercaptoetanol. Mientras que muchos medios basales ya
- 45 contienen aminoácidos, algunos aminoácidos pueden complementarse posteriormente, por ejemplo, L-glutamina, que se sabe que es menos estable cuando está en disolución. Puede suministrarse adicionalmente a un medio compuestos antibióticos y/o antimicóticos, tales como, normalmente, mezclas de penicilina y estreptomina, y/u otros compuestos, ejemplificados pero sin limitarse a, anfotericina, ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, ácido micofenólico, ácido nalidíxico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina,
- 50 puromicina, rifampicina, espectinomicina, tetraciclina, tilosina y zeocina.

- 5 También pueden usarse lípidos y portadores lipídicos para complementar medios de cultivo celular. Tales lípidos y portadores pueden incluir, pero no se limitan a ciclodextrina, colesterol, ácido linoleico conjugado con albúmina, ácido linoleico y ácido oleico conjugados con albúmina, ácido linoleico no conjugado, ácido linoleico-oleico-araquidónico conjugado con albúmina, ácido oleico no conjugado y conjugado con albúmina, entre otros. Puede usarse de manera similar albúmina en formulaciones libres de ácidos grasos.
- 10 En realizaciones, pueden estar comprendidos suero o plasma humano en dichos medios en una proporción (volumen de plasma o suero / volumen de medio) de entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 30%, preferiblemente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 15%. Los presentes métodos pueden realizarse satisfactoriamente con cantidades relativamente bajas de plasma o suero, por ejemplo, aproximadamente el 5 o el 10% en volumen o menos, por ejemplo aproximadamente el 1, el aproximadamente 2, aproximadamente el 3 o aproximadamente el 4% en volumen, lo que permite que se disminuya el volumen de plasma o suero que es necesario obtener con el fin de cultivar las BMSC.
- 15 FGF y TGFB están comprendidos en dichos medios a concentraciones suficientes para inducir diferenciación de BMSC en osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos. Normalmente, FGF o una variante o derivado biológicamente activo del mismo puede incluirse en los medios a una concentración de entre 0,1 y 100 ng/ml, preferiblemente entre 0,5 y 20 ng/ml, por ejemplo, a aproximadamente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 ó 6 ng/ml, o a aproximadamente 5 ng/ml o menos, por ejemplo, a aproximadamente 4, 3, 2, 1 ó 0,5 ng/ml. Normalmente, TGFB o una variante o derivado biológicamente activo del mismo puede incluirse en los medios a una concentración de entre 0,1 y 100 ng/ml, preferiblemente entre 0,25 y 20 ng/ml, por ejemplo, a aproximadamente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 ó 6 ng/ml, o a aproximadamente 5 ng/ml o menos, por ejemplo, a aproximadamente 4, 3, 2, 1 ó 0,5 ng/ml. Se pretende que dichos valores se refieran a concentraciones de los factores de crecimiento respectivos o variantes o derivados biológicamente activos de los mismos, como complementados de manera exógena a los medios.
- 20 En una realización, las BMSC o MSC pueden ponerse en contacto de manera continua con suero o plasma humano, FGF y TGFB, es decir, dichos componentes se incluirían en todos los medios en los que las BMSC o MSC, la progenie de las mismas y/o células derivadas de las mismas, se cultivan en el presente método. Normalmente, dicho plasma o suero y factores de crecimiento pueden suministrarse a concentraciones respectivas sustancialmente idénticas en todos los medios (nuevos) usados para cultivar las BMSC o MSC durante el método.
- 25 En una realización, las células de (a) o (b) pueden sembrarse en placa para su cultivo en la etapa (c) a entre  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, preferiblemente entre  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, más normalmente a aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.
- 30 En una realización preferida, el recipiente de cultivo puede estar dotado de una superficie de plástico para permitir la adherencia celular. En otra realización, la superficie puede ser una superficie de vidrio. En aún otra realización, la superficie puede estar recubierta por un material apropiado propicio para la adherencia y el crecimiento de células, por ejemplo, Matrigel(R), laminina o colágeno.
- 35 En realizaciones, puede permitirse que las células se unan durante aproximadamente 1 y 8 días, más normalmente entre aproximadamente 2 y 6 días, más normalmente 4 días aproximadamente antes de eliminar la materia no adherente en la etapa (d).
- 40 Normalmente, las células pueden cultivarse en las etapas (c) y (d) tomadas conjuntamente durante un periodo de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 18 días, habitualmente entre aproximadamente 11 y aproximadamente 15 días, y más preferiblemente durante aproximadamente 12-14 días. Por lo demás, las células pueden cultivarse en las etapas (c) y (d) tomadas conjuntamente hasta que su confluencia alcanza aproximadamente el 60% o más, o aproximadamente el 80% o más, o aproximadamente el 90% o más, o incluso hasta el 100%.
- 45 En una realización, tras la etapa (d) el método puede comprender recoger las células o población de células así obtenidas.
- 50 En otra realización, tras la etapa (d) las células adquiridas pueden someterse a pases una o más veces, normalmente una o dos veces, más preferiblemente una vez. El número de pases se refiere a número de veces que una población de células se ha retirado de un recipiente de cultivo y se ha sometido a subcultivo, es decir, un pase. Por ejemplo, la realización de pases puede incluir habitualmente el desprendimiento de las células usando un quelante de iones bivalentes (por ejemplo, EDTA o EGTA) y/o tripsina o una proteasa adecuada; resuspendiendo las células desprendidas; y volviendo a sembrar en placa las células en el mismo recipiente de cultivo o uno nuevo a una densidad de células deseada.
- 55 En una realización preferida, posteriormente a la etapa (d) como anteriormente el método incluye además la etapa (e) de realizar pases, en particular una vez, y cultivar adicionalmente las células o población de células de la etapa (d) en el medio tal como se define en (c). Tras tal etapa (e) las células o población de células pueden recogerse.
- En la etapa de realizar pases (e), las células se siembran en placa preferiblemente para su cultivo adicional a entre

$5 \times 10^1$  y  $5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, preferiblemente entre  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, más normalmente a aproximadamente  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.

5 Normalmente, tras realizar pases las células se cultivan en la etapa (e) durante un periodo de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 12 días, habitualmente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 días, y más normalmente durante aproximadamente una semana. Este periodo proporciona una expansión satisfactoria de las células.

10 Los métodos de la invención detallados anteriormente produjeron osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, o poblaciones que comprenden los mismos, con características superiores, tales como en particular alta velocidad de expansión y baja expresión de HLADR, células y poblaciones de células que son adecuadas para implantación profiláctica o terapéutica en tejido óseo de pacientes.

15 Por consiguiente, la memoria descriptiva se refiere a osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos, o poblaciones de células que comprenden los mismos, que pueden obtenerse u obtenerse directamente usando los métodos de la invención tal como se describió anteriormente, así como a tales células o poblaciones de células para su uso en terapia y/o para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, tal como se enumeran en otra parte en esta memoria descriptiva), así como al uso de tales células o poblaciones de células para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos.

20 Además, la memoria descriptiva se refiere a una composición farmacéutica que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos, o poblaciones de células que comprenden los mismos, que pueden obtenerse u obtenerse directamente mediante los métodos de la presente invención, y adecuados para su administración en un sitio de lesión ósea.

25 La memoria descriptiva también se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad ósea en sujetos que necesitan tal tratamiento, que comprende: (i) realizar un método de la presente invención para obtener osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos, o poblaciones de células que comprenden los mismos, tal como se describió anteriormente, y (ii) administrar las células así obtenidas o poblaciones de células a dicho sujeto, por ejemplo, en un sitio de lesión ósea, tal como por ejemplo cirugía o fractura.

## 2. Células y poblaciones de células de la invención

30 El estudio adicional de las células osteoblásticas que resultan de los métodos permitió definir un nuevo tipo de célula osteoprogenitora, de osteoblasto o con fenotipo de osteoblasto, que puede subyacer a las propiedades ventajosas observadas tras su uso en terapia ósea.

35 En particular, la memoria descriptiva proporciona osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos, así como poblaciones de células que comprenden los mismos, caracterizados porque dichas células (1) comprenden la expresión de CD90, CD105, CD73, CD63, CD166 y fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, (2) no expresan CD45, CD14, CD19, y (3) menos del 25% de las células, preferiblemente menos del 20% de las células e incluso más preferiblemente menos del 15% de las células expresan HLA-DR.

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

50 La expresión de los marcadores específicos de células anteriores puede detectarse usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica, tal como inmunocitoquímica o adsorción por afinidad, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, FACS, ELISA, etc., o mediante cualquier ensayo bioquímico adecuado de la actividad enzimática (por ejemplo, para ALP), o mediante cualquier técnica adecuada de medición de la cantidad del ARNm de marcador, por ejemplo, transferencia de tipo Northern, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, etc. Se conocen datos de secuencia para marcadores enumerados en esta divulgación y pueden obtenerse de bases de datos públicas tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

55 En una realización adicional, dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos muestran evidencias de capacidad de mineralizar los entornos externos, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio, cuando se exponen a medio osteogénico (Jaiswal *et al.* 1997. *J Cell Biochem* 64: 295-312). La acumulación de calcio dentro de las células y la deposición en proteínas de la matriz puede medirse convencionalmente por ejemplo cultivando en <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, lavando y volviendo a cultivar, y luego determinando cualquier radioactividad presente

dentro de la célula o depositada en la matriz extracelular (patente estadounidense n.º 5.972.703), o sometiendo a ensayo el sustrato de cultivo para determinar la mineralización usando un kit de ensayo de  $\text{Ca}^{2+}$  (kit de Sigma n.º 587), o tal como se describe en los ejemplos.

5 En otra realización, dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos no se diferencian sustancialmente a una cualquiera de, y preferiblemente a ninguna de las células del linaje adipocítico (por ejemplo, adipocitos) o linaje condrocítico (por ejemplo, condrocitos). La ausencia de diferenciación a estos linajes celulares puede someterse a prueba usando condiciones que inducen diferenciación convencional establecidas en la técnica (por ejemplo, véase Pittenger *et al.* 1999. Science 284: 143-7), y métodos de ensayo (por ejemplo, cuando se inducen, los adipocitos se tiñen normalmente con rojo aceite O que muestra la acumulación de lípidos; los condrocitos se tiñen normalmente con azul alcian o safranina O). La falta sustancial de propensión a la diferenciación adipogénica o condrogénica puede significar normalmente que menos del 65%, o menos del 50%, o menos del 35%, o menos del 20% o menos del 10% de las células sometidas a prueba muestran signos de diferenciación adipogénica o condrogénica cuando se aplican a la prueba respectiva.

15 En una realización adicional, dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos pueden expresar también osteocalcina (OCN) (en experimentos particulares un intervalo de desde el 8 hasta el 85% de las células expresaban OCN tal como se detecta mediante FACS).

En una realización adicional, dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos pueden expresar también sialoproteína (BSP) (en un experimento de RT-PCR semicuantitativa particular las células expresaban niveles de débiles a moderados de de BSP).

20 Los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos tal como se caracterizaron en el presente documento anteriormente, o poblaciones que comprenden los mismos, presentan características superiores, tales como en particular alta velocidad de expansión y baja expresión de HLA-DR, células y poblaciones de células que son adecuadas para implantación profiláctica o terapéutica en tejido óseo de pacientes.

25 Por consiguiente, la memoria descriptiva se refiere a osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos tal como se caracterizaron en el presente documento anteriormente, o poblaciones de células que comprenden los mismos, para su uso en terapia y/o para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, tal como se enumeran en otra parte en esta memoria descriptiva), así como al uso de tales células o poblaciones de células para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos.

30 Además, la memoria descriptiva se refiere a una composición farmacéutica que comprende osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos tal como se caracterizaron en el presente documento anteriormente, o poblaciones de células que comprenden los mismos, y adecuados para su administración en un sitio de lesión ósea.

35 La memoria descriptiva también se refiere a un método para prevenir y/o tratar una enfermedad ósea en sujetos que necesitan tal tratamiento, que comprende administrar dichos osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos humanos tal como se caracterizaron en el presente documento anteriormente, o poblaciones de células que comprenden los mismos, a dicho sujeto, por ejemplo, en un sitio de lesión ósea, tal como por ejemplo cirugía o fractura.

### 3. Aspectos que se refieren a células y poblaciones de la invención

40 La siguiente descripción se refiere a los aspectos establecidos anteriormente y adicionales que implican osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos y poblaciones que comprenden los mismos, tal como se obtienen o pueden obtenerse mediante los métodos descritos en la sección 1 anterior; u osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos, y poblaciones de células que comprenden los mismos, tal como se caracterizaron en la sección 2 anterior.

45 Tal como se explicó, las células o poblaciones de células de la invención pueden introducirse en el hueso de un sujeto humano en el sitio de cirugía o fractura. La introducción de los presentes osteoblastos en el hueso es útil en los tratamientos de fracturas óseas y trastornos relacionados con los huesos, tales como por ejemplo los enumerados en otra parte en esta memoria descriptiva.

50 En una realización, las células osteoblásticas pueden obtenerse de BMSC o MSC de un sujeto en el que van a introducirse los osteoblastos diferenciados (es decir, células autólogas). En otra opción, que puede estar disponible en el presente documento entre otros debido a la baja expresión de HLA-DR por las presentes células, las células osteoblásticas pueden obtenerse de BMSC o MSC de uno o más sujetos humanos distintos del sujeto humano en el que van a introducirse los osteoblastos diferenciados (es decir, células alogénicas). En aún otra realización, las células osteoblásticas pueden obtenerse de BMSC o MSC de un animal no humano, preferiblemente mamífero no humano e introducirse en un sujeto humano (es decir, células xenogénicas).

Tal como se indica, las células osteoblásticas tal como se describen en el presente documento pueden formularse

para dar y administrarse como composiciones farmacéuticas.

Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender, además de las células osteoblásticas descritas en el presente documento, un excipiente, portador, tampón, conservante, estabilizador, antioxidante u otro material farmacéuticamente aceptable bien conocido por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la actividad de las células. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral, que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Para principios generales en formulación medicinal, se remite al lector a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, de G. Morstyn & W. Sheridan eds., Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000.

Tales composiciones farmacéuticas pueden contener componentes adicionales que garantizan la viabilidad de las células en las mismas. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un sistema de tampón adecuado (por ejemplo, sistema de tampón fosfato o carbonato) para lograr el pH deseable, más habitualmente cerca de pH neutro, y pueden comprender sal suficiente para garantizar condiciones isosmóticas para las células para evitar el estrés osmótico. Por ejemplo, una disolución adecuada para estos fines puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato, tal como se conoce en la técnica. Además, la composición puede comprender una proteína portadora, por ejemplo, albúmina, que puede aumentar la viabilidad de las células.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender componentes adicionales en la reparación de heridas y defectos de los huesos. Por ejemplo, tales componentes pueden incluir sin limitación proteínas morfogenéticas óseas, partículas de hidroxiapatita/fosfato de tricalcio (HA/TCP), gelatina, poliácido láctico, poliácido láctico-glicólico, ácido hialurónico, quitosano, poli-L-lisina y colágeno. Por ejemplo, las células osteoblásticas pueden combinarse con matriz ósea desmineralizada (DBM) u otras matrices para hacer que el material compuesto sea osteogénico (formación de hueso por sí mismo) así como osteoinductor. Métodos similares usando células de médula ósea autólogas con DBM alogénica han proporcionado buenos resultados (Connolly *et al.* 1995. *Clin Orthop* 313:8-18).

La composición farmacéutica puede incluir además o coadministrarse con un factor bioactivo complementario tal como una proteína morfogenética ósea, tal como BMP-2, BMP-7 o BMP-4, o cualquier otro factor de crecimiento. Otros posibles componentes adjuntos incluyen fuentes inorgánicas de calcio o fosfato adecuadas para ayudar a la regeneración ósea (documento WO 00/07639). Si se desea, la preparación de células puede administrarse en una matriz o material portador para proporcionar una regeneración tisular mejorada. Por ejemplo, el material puede ser una cerámica granular, o un biopolímero tal como gelatina, colágeno, osteonectina, fibrinógeno u osteocalcina. Pueden sintetizarse matrices porosas según técnicas convencionales (por ejemplo, Mikos *et al.*, *Biomaterials* 14:323, 1993; Mikos *et al.*, *Polymer* 35:1068, 1994; Cook *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 35:513, 1997).

Alternativamente o además, las células BMSC o MSC o las células osteoblásticas resultantes o poblaciones de células de la invención pueden transformarse de manera estable o transitoria con un ácido nucleico de interés antes de su introducción en la lesión ósea, por ejemplo, un sitio de cirugía o fractura, del sujeto. Las secuencias de ácido nucleico de interés incluyen, pero no se limitan a las que codifican para productos génicos que potencian el crecimiento, la diferenciación y/o mineralización de osteoblastos. Por ejemplo, puede introducirse un sistema de expresión para BMP-2 en las BMSC o MSC de un modo estable o transitorio para el fin de tratar fracturas no cicatrizantes u osteoporosis. Los expertos en la técnica conocen métodos de transformación de BMSC o MSC y de osteoblastos.

Por tanto, la memoria descriptiva también abarca métodos de producción de dichas composiciones farmacéuticas mezclando las células de la invención con uno o más componentes adicionales como anteriormente.

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

Los osteoprogenitores, osteoblastos o células con fenotipo de osteoblastos o poblaciones de células pueden administrarse de una manera que les permita injertarse o migrar al sitio tisular previsto y reconstituir o regenerar el área funcionalmente deficiente. La administración de la composición dependerá del sitio musculoesquelético que está reparándose. Por ejemplo, puede facilitarse la osteogénesis según un procedimiento quirúrgico para remodelar el tejido o insertar una división, o un dispositivo protésico tal como una artroplastia de cadera. En otras circunstancias, no se requerirá una cirugía invasiva, y la composición puede administrarse mediante inyección o (por ejemplo, para la reparación de la columna vertebral) usando un endoscopio guiado.

En una realización la preparación de células farmacéuticas tal como se definió anteriormente puede administrarse en

una forma de composición líquida. En realizaciones, las células o la composición farmacéutica que comprende las mismas pueden administrarse de manera sistémica, por vía tópica o en un sitio de lesión.

5 En otra realización, las células osteoblásticas o poblaciones de células pueden transferirse a y/o cultivarse sobre un sustrato adecuado para proporcionar implantes. El sustrato sobre el que las células pueden aplicarse y cultivarse puede ser un metal, tal como titanio, aleación de cobalto/cromo o acero inoxidable, una superficie bioactiva tal como un fosfato de calcio, superficies de polímero tales como polietileno, y similares. Aunque menos preferido, también puede usarse como sustrato material silíceo tal como cerámica de vidrio. Los más preferidos son metales, tales como titanio, y fosfatos de calcio, aunque el fosfato de calcio no es un componente indispensable del sustrato. El sustrato puede ser poroso o no poroso.

10 Por ejemplo, las células que han proliferado, o que están diferenciándose en las placas de cultivo, pueden transferirse sobre soportes sólidos tridimensionales con el fin de hacer que se multipliquen y/o que continúe el proceso de diferenciación incubando el soporte sólido en un medio de nutrientes líquido tal como se describe en el presente documento, si es necesario. Las células pueden transferirse sobre un soporte sólido tridimensional, por ejemplo impregnando dicho soporte con una suspensión líquida que contiene dichas células. Los soportes  
15 impregnados obtenidos de este modo pueden implantarse en un sujeto humano. Tales soportes impregnados también pueden volverse a cultivar sumergiéndolos en un medio de cultivo líquido, antes de implantarse finalmente.

Es necesario que el soporte sólido tridimensional sea biocompatible para permitir que se implante en un ser humano. Puede ser de cualquier forma adecuada tal como un cilindro, una esfera, una placa, o una parte de forma arbitraria. De los materiales adecuados para el soporte sólido tridimensional biocompatible, puede hacerse mención particular  
20 a carbonato de calcio, y en particular aragonita, específicamente en forma de esqueleto de coral, cerámica porosa basada en alúmina, en zirconia, en fosfato de tricalcio y/o hidroxiapatita, esqueleto de coral de imitación obtenido mediante intercambio hidrotérmico que permite que el carbonato de calcio se transforme en hidroxiapatita, o si no cerámica de vidrio de apatita-wollastonita, cerámica de vidrio bioactivo tal como vidrios Bioglass(TM).

Los aspectos y realizaciones anteriores se apoyan adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## 25 **Ejemplos**

### Procedimientos experimentales

#### Cultivo celular y preparación de plasma

Se obtuvieron de 20 a 60 ml de médula ósea (BM) heparinizada de la cresta iliaca de pacientes que padecían enfermedades óseas o de voluntarios sanos. Se mezcló la BM con solución salina tamponada con fosfato (PBS, 2  
30 v:v) y se estratificó sobre disolución de Ficoll de gradiente de densidad. Tras la centrifugación, se recogieron células mononucleares de la superficie de contacto y se lavaron dos veces en PBS. En paralelo, se obtuvo suero de pacientes o donantes sanos tras la centrifugación de 160 ml de sangre drenada dentro de tubos secos. Se resuspendieron las células en medio DMEM complementado con plasma alogénico al 15% (puede usarse plasma autólogo con sustancialmente los mismos resultados), FGF2 a 10 ng/ml y TGFb-1 a 10 ng/ml. Se sembraron en placa las células a  $1 \times 10^8$  células/frascos de 175 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C que contenía el 5% de CO<sub>2</sub>. Se permitió que las células se unieran durante 1 día antes de un cambio de medio inicial. Se realizan otros dos cambios de medio parciales (la mitad del volumen cambiado) en los días 7 y 11. Se desprendieron las células en el día 14 usando disolución de tripsina/EDTA durante 1-5 min a 37°C. Se contaron las células y se sembraron en placa a  $1 \times 10^5$  células/175 cm<sup>2</sup> durante otra semana de cultivo.

#### 40 Análisis fenotípico

Se analizaron marcadores de superficie celular e intracelulares a diferentes puntos de tiempo (día 14 y 21) mediante citometría de flujo. Para marcadores de superficie celular: se incubaron las células con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados: anti-CD45, CD90, CD105, CD73, CD166, CD63, CD14, CD19, HLA-ABC, HLA-DR, CD28, CD80, CD86 y CTLA-4 durante 15 min y luego se lavaron con PBS antes de centrifugarse y resuspendirse  
45 en 0,3 ml de PBS. Para los marcadores intracelulares (OCN y ALP), se usó un kit de permeabilización y se usó el anticuerpo monoclonal conjugado específico anti-ALP según el protocolo del fabricante (Analis). Entonces se lavaron las células con PBS antes de resuspendirse en 0,3 ml de PBS.

#### Ensayo de ALP

Se midió la actividad enzimática de fosfatasa alcalina mediante un ensayo bioquímico basado en la hidrólisis de pNPP (fosfato de p-nitrofenilo). Cuando se desfosforila pNPP por ALP, se vuelve amarillo y puede detectarse mediante un espectrofotómetro a 410 nm. La actividad enzimática de ALP de las células se determina en el día 21 con respecto a una curva patrón basada en la actividad fosfatasa alcalina intestinal de ternero purificada. Se notifica la actividad de ALP en unidad de ALP/mg de proteína. Una unidad de ALP hidroliza 1 mmol de pNPP en 1 min a 37°C.

#### 55 Ensayo de mineralización



Se evaluó el potencial de inducción de mineralización celular añadiendo medio osteogénico en el cultivo. El día 14, se sembraron en placa 5.700 células formadoras de hueso/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos en presencia de plasma complementado con dexametasona 0,1 μM, ácido ascórbico 0,05 mM y glicerolfosfato 3 mM. Tras 2 semanas de cultivo, se fijaron las células en formaldehído al 3,7%/PBS y se tiñeron mediante rojo de alizarina. Se dio una puntuación de mineralización a cada cultivo tal como sigue: 0 = sin mineralización, 1 = mineralización en curso y 2 = mineralización completa.

Ensayo de proliferación de células T

Se cocultivaron de 2.000 a 20.000 células preosteoblásticas/ml del individuo A (PREOBa) complementadas o no con TGFb-1 10 ng/ml con 200.000 células T/ml del individuo B (PBMCb). Se usó fitohemaglutinina (PHA) a una concentración de 10 μg/ml como control positivo de la proliferación de células T. Se cultivaron las células en una placa de microtitulación de 24 pocillos durante 7 días y se pulsaron con 3H-timidina durante las últimas 18 h del periodo de cultivo para medir la proliferación de células T. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado con hielo y dos veces con ácido tricloroacético al 5% enfriado con hielo (TCA). Finalmente, se lisaron las células mediante una disolución que contenía NaOH 0,1 N y Triton-X100 al 0,1%. Se recoge el sobrenadante y se mezcla con líquido de centelleo que va a analizarse en un contador beta.

Resultados

Plasma y TGF frente a plasma y TGF/FGF2

Se sometió a prueba en primer lugar el efecto de TGFb-1 como único factor de crecimiento añadido a medio que contenía plasma alogénico al 15%. Tal como se muestra en la figura 1, el cultivo primario con sólo TGFb-1 no pudo proporcionar una cantidad apropiada de células que iban a expandirse: de hecho, hay casi 20 veces más células recogidas de frascos con medio que contenía tanto FGF2 como TGFb-1 que en frascos que contenían TGFb-1 solo (p = 0,0317, prueba de Mann Whitney bilateral).

Plasma y FGF frente a plasma y TGF/FGF2

Se evaluó la velocidad de proliferación de osteoblastos de 15 pacientes en medio que contenía plasma alogénico y FGF2 complementado o no con TGFb-1 10 ng/ml (figura 2). Los siguientes experimentos mostraron que el rendimiento medio de expansión de células cultivadas en plasma complementado con TGFb-1 es enormemente superior al rendimiento de células cultivadas sin TGFb-1 tanto en cultivos primarios (1,07x), secundarios (2,5x) como globales (3,08x) (tabla 1).

Tabla 1: Rendimientos de cultivo de células cultivadas con FGF2 y FGF2/TGFb-1

% frente a n.º de células sembradas en placa	Plasma al 15%-FGF2			Plasma al 15%-FGF2/TGFb-1		
	Rendimiento de cultivo primario (P1)	Rendimiento de cultivo secundario (P2)	Rendimiento global	Rendimiento de cultivo primario (P1)	Rendimiento de cultivo secundario (P2)	Rendimiento global
Media	51,3	625,3	297,4	54,4	1553,7	914,8
DE	44,5	322,7	283,1	71,3	798,1	1343,8

Además, se mantuvo la velocidad de expansión de las células cultivadas con TGFb-1 a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado con respecto a células cultivadas en ausencia de TGF tal como se muestra en la tabla 2. Las células cultivadas sólo con FGF dejaron de proliferar tras aproximadamente 4 pases mientras que las células cultivadas en presencia de tanto FGF2 como TGFb-1 continúan proliferando hasta 7 pases. Esto se traduce en un aumento en la proliferación de más de 800 veces (857,1).

Tabla 2: Rendimientos acumulados de células cultivadas con FGF2 y FGF2/TGFb-1 (%)

%	FGF	FGF/TGF
P1	51,3	54,5
P2	32.213,3	84.649,4
P3	103.144,8	1.144.807,1
P4	<b>177.156,9</b>	9.370.159,7
P5	131.512,9	31.860.445,3
P6	72.555,5	78.055.251,8
P7	28.637,9	<b>151.841.324,1</b>
P8	12.554,9	120.405.153,2
P9	6.364,8	71.159.511,4
P10	1.912,5	24.220.683,9
P11	2.616,0	9.910.647,4
P12	1.620,1	254.1373,2

P13	447,5	112.5860,9
P14	311,1	123.3310,1
P15	28,3	587.957,5

Fenotipo celular

La citometría de flujo reveló que el fenotipo de las células obtenidas en medio complementado con tanto FGF2 como TGFb-1 era similar al de las células cultivadas sin TGFb-1 para la mayoría de los marcadores. Ambos tipos de células expresaban CD90, CD105, CD73, CD63 CD166 y ALP pero no se observó expresión de CD45, CD14 o CD19 (tabla 3). La expresión ALP en condiciones de cultivo de FGF2/TGFb-1 se redujo en comparación con condiciones exclusivas de FGF2 (el 42,2% frente al 73,6% respectivamente).

Además, las células incubadas con TGFb-1 expresaban altos niveles de HLA-ABC (HLA-I) pero bajos niveles de HLA-DR en comparación con células cultivadas sin este factor. Además, todas las moléculas coestimuladoras sometidas a prueba (CD80, CD86, CD28, CD40L y CTLA-4) se expresaban a niveles insignificantes en células tratadas con TGFb-1 (tabla 3).

Tabla 3: Marcadores fenotípicos de osteoblastos cultivados en medio complementado o no complementado con TGFb-1 10 ng/ml (porcentaje de células consideradas positivas mediante FACS).

	Plasma al 15%/FGF2			Plasma al 15%/FGF2/TGFb-1		
	N	Media	DE	N	Media	DE
ALP	34	73,57	17,55	22	42,18	24,82
CD105	34	90,68	8,03	24	93,08	5,71
CD90	9	96,33	4,22	4	94,75	2,95
CD73	10	97,20	1,60	6	97,50	1,71
CD166	9	92,56	5,21	4	94,00	4,85
CD63	9	71,11	20,73	5	68,00	25,26
CD45	33	2,29	2,43	24	1,92	1,00
CD14	16	1,69	1,61	12	1,42	1,11
CD19	16	9,38	11,93	9	4,00	2,62
HLA-DR	10	62,90	19,26	22	6,14	5,80
HLA-I	9	94,78	5,22	22	95,18	3,71
B7-2	9	3,67	2,71	6	1,17	1,07
CD28	9	2,00	1,94	6	0,83	0,37
CD80	9	2,22	1,03	11	0,91	0,67
CD40L	9	1,89	1,66	4	1,00	0,71
CTLA4	9	6,11	3,66	4	5,00	4,74

Actividad enzimática de ALP:

Se evaluó la actividad enzimática de ALP mediante un ensayo colorimétrico y mostró que las células cultivadas con TGFb-1 tienen una actividad de ALP inferior con respecto a células cultivadas sin este factor de crecimiento (tabla 4). Estos resultados se correlacionan fuertemente con la expresión de ALP medida mediante FACS.

Tabla 4: Actividad de ALP, expresión de ALP e intensidad de fluorescencia media (MIF) para células cultivadas en FGF2 y FGF2/TGFb-1 en el pase 2

	Plasma al 15%-FGF			Plasma al 15%-FGF/TGF		
	Actividad de ALP (mU/mg)	Expresión celular (%)	MIF	Actividad de ALP (mU/mg)	Expresión celular (%)	MIF
Media	1129,02	71,78	85,85	281,00	55,63	19,94
DE	1196,69	18,68	47,59	320,08	22,43	9,50

Mineralización:

Incluso con una expresión de ALP relativamente inferior, se mostró que las células cultivadas con FGF2/TGFb-1 presentaban la misma actividad biológica (mineralización) que las células cultivadas con FGF2 sólo. Esto se determinó mediante mineralización.

La mineralización de células cultivadas en presencia de FGF2 (A) o FGF2/TGFb-1 (B) era idénticas (más del 65% de la superficie de los pocillos mineralizada, figura 3). De manera similar, la media de la puntuación de mineralización de células cultivadas en FGF2 (1,75) se solapaba con la puntuación de células cultivadas en FGF2/TGFb-1 (1,83), de un máximo de 2.

Proliferación de células T

5 Para determinar si las células formadoras de hueso cultivadas en presencia de TGFb-1 inducen una respuesta proliferativa mediante células T alogénicas, se cultivaron células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) con números crecientes de células formadoras de hueso (2.000-20.000/ml). Tal como se muestra en la tabla 5 y la figura 4, los osteoblastos producidos por FGF2/TGFb-1 no inducían una respuesta alogénica de PBMC (lado izquierdo) y también podían inducir hasta el 90% de inhibición de la proliferación de PBMC estimuladas con PHA.

Tabla 5. Efectos inhibidores de osteoblastos sobre la proliferación de células T (los valores se presentan como porcentajes de proliferación de PHA/PBMC).

	FGF + TGF				
	PBMCb	PBMCb + PHA	PBMCb + PHA + BMOBa (2000/ml)	PBMCb + PHA + BMOBa (10000/ml)	PBMCb + PHA + BMOBa (20000/ml)
1	0	100	61	41	18
2	0	100	48	29	8
3	0	100	56	29	8
4	0	100	62	56	17
5	0	100	61	41	18

Conclusiones

10 Con el fin de desarrollar un método para expandir rápida y significativamente BMSC o MSC inmunoprivilegiadas derivadas de células formadoras de hueso, se ha evaluado la potencia de TGFb sobre las características y el crecimiento de esas células.

15 De manera sorprendente, la condición de cultivo con TGFb y plasma solo no pudo expandir ni diferenciar MSC para dar células formadoras de hueso mientras que la combinación con FGF2 tiene un efecto de expansión y diferenciación muy significativo (expansión de hasta 12 veces de suero/FGF solo). Además, el estado fenotípico de las células cultivadas en presencia de TGFb permaneció sin cambios para marcadores estromales y hematopoyéticos, sólo la expresión de ALP disminuyó ligeramente aunque esto no tuvo efecto sobre las actividades biológicas de las células. De manera interesante, la expresión de HLA-DR en las condiciones de TGFb estaba presente a un nivel muy bajo/indetectable en las células óseas. Además, en la reacción de linfocitos mixtos las células cultivadas en presencia de TGFb en las condiciones de plasma/FGF están inmunoprivilegiadas ya que no inducen una reacción alogénica y, por tanto, no conducirían a un rechazo inmunitario en el caso de trasplante alogénico. Finalmente, se ha mostrado que las células que crecen en presencia de TGFb mantienen sus funciones biológicas.

20 Puede concluirse que el uso de medio complementado con TGFb es superior a condiciones de medio sin TGFb para expandir BMSC o MSC para dar células osteoblásticas sin alterar los fenotipos celulares.

25 En ejemplos adicionales, los procedimientos experimentales descritos anteriormente se realizan de una manera sustancialmente igual o similar usando un factor FGF distinto de FGF2 (por ejemplo, FGF-1 o FGF-3) y/o usando un factor TGF distinto de TGFb-1 (por ejemplo, TGFb-2 o TGFb-3), proporcionando resultados y/o efectos comparables.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para obtener osteoprogenitores u osteoblastos a partir de células madre de médula ósea (BMSC) humanas adultas o células madre mesenquimatosas (MSC) humanas adultas *in vitro* o *ex vivo*, que comprende cultivar dichas BMSC o MSC en un medio que incluye suero o plasma humano, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGFB).
2. Método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
  - (a) recuperar células de una muestra biológica de un sujeto humano que comprenden BMSC o MSC;
  - (b) opcionalmente, aislar células mononucleadas de las células recuperadas en (a);
  - (c) añadir células de (a) o (b) a un medio que comprende suero o plasma humano, FGF y TGFB y cultivar la mezcla de células-medio, tal como para permitir la adherencia de las células a una superficie de sustrato;
  - (d) eliminar la materia no adherente y cultivar adicionalmente células adherentes en el medio tal como se define en (c), tal como para permitir la obtención de osteoprogenitores u osteoblastos.
3. Método según la reivindicación 2, en el que las células se cultivan en las etapas (c) y (d) tomadas conjuntamente durante un periodo de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 18 días.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, que comprende además recoger las células obtenidas en la etapa (d).
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, que incluye además la etapa de (e) realizar pases y cultivar adicionalmente las células de la etapa (d) en el medio definido en (c).
6. Método según la reivindicación 5, en el que las células se cultivan en la etapa (e) durante un periodo de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 12 días.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el FGF es FGF-1, FGF-2 o FGF-3.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el TGFB es TGFB-1, TGFB-2 o TGFB-3.
9. Población de células que comprende osteoprogenitores u osteoblastos humanos, caracterizada porque dichos osteoprogenitores u osteoblastos (1) comprenden la expresión de CD90, CD105, CD73, CD63, CD166, fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón, (2) no expresan CD45, CD14, CD19, y (3) menos del 15% de las células expresan HLA-DR.
10. Población de células según la reivindicación 9, que puede obtenerse mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Población de células según las reivindicaciones 9 ó 10, en la que dichos osteoprogenitores u osteoblastos comprenden además la expresión de osteocalcina (OCN).
12. Población de células según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos.
13. Población de células para su uso según la reivindicación 12, en el que la población de células va a administrarse a un sujeto alogénico.
14. Composición farmacéutica que comprende la población de células según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en el que la composición farmacéutica es adecuada para la administración de dicha población de células en un sitio de lesión ósea.
16. Disposición que comprende un instrumento quirúrgico para la administración de una composición en un sitio de lesión ósea y que comprende además la composición farmacéutica según la reivindicación 14 ó 15, en la que la disposición está adaptada para la administración de la composición farmacéutica en el sitio de lesión ósea.

FIG 1

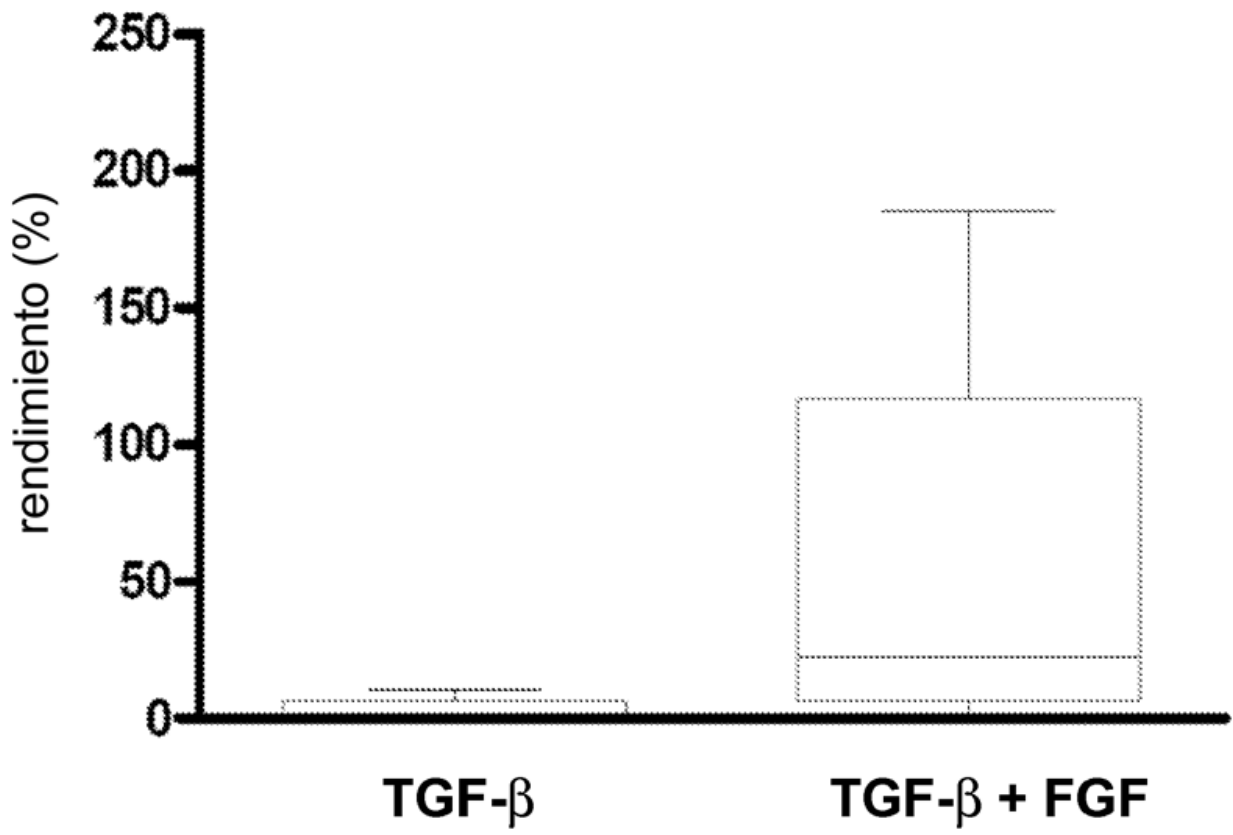
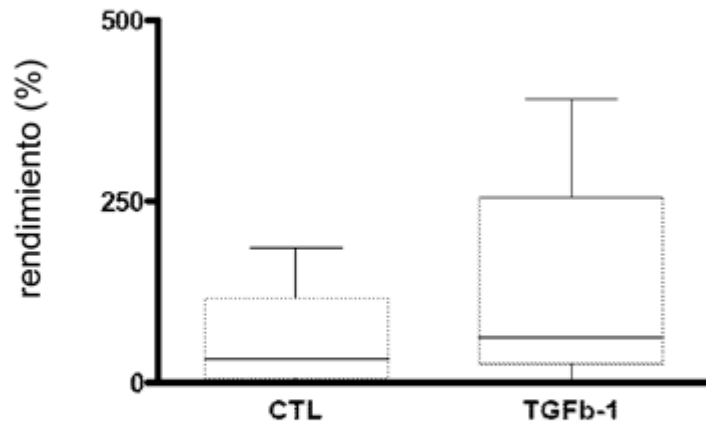
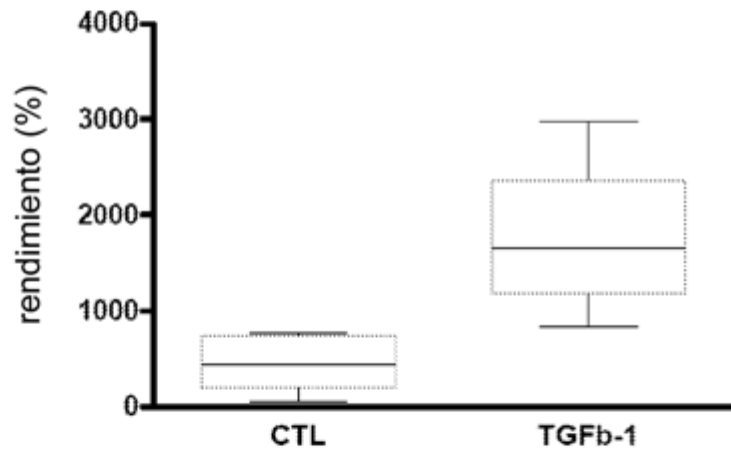


FIG 2

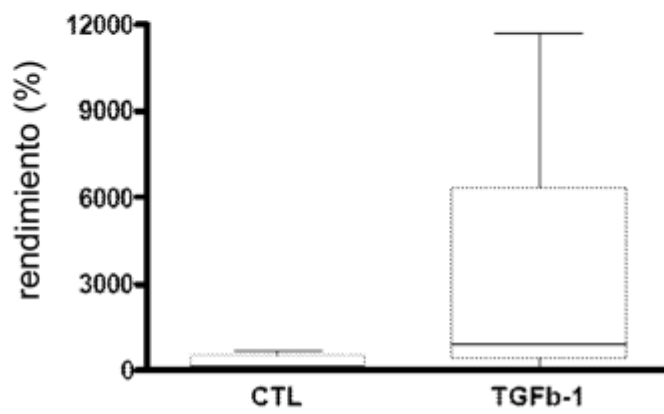
(A)



(B)

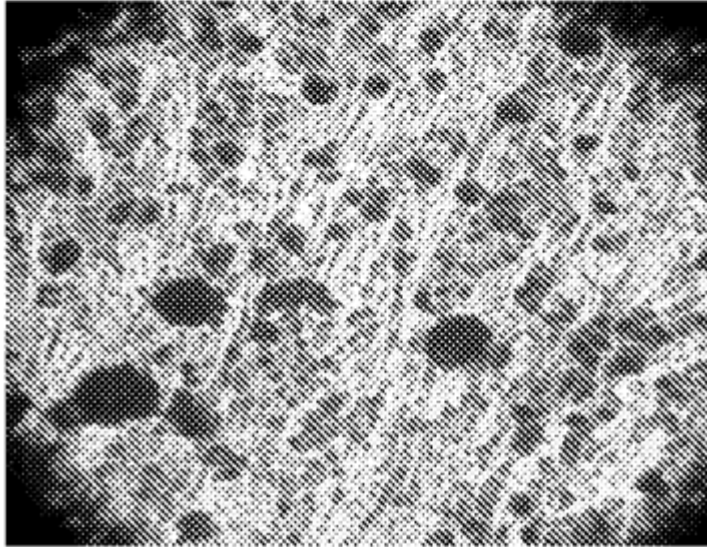


(C)



**FIG 3**

**(A)**



**(B)**

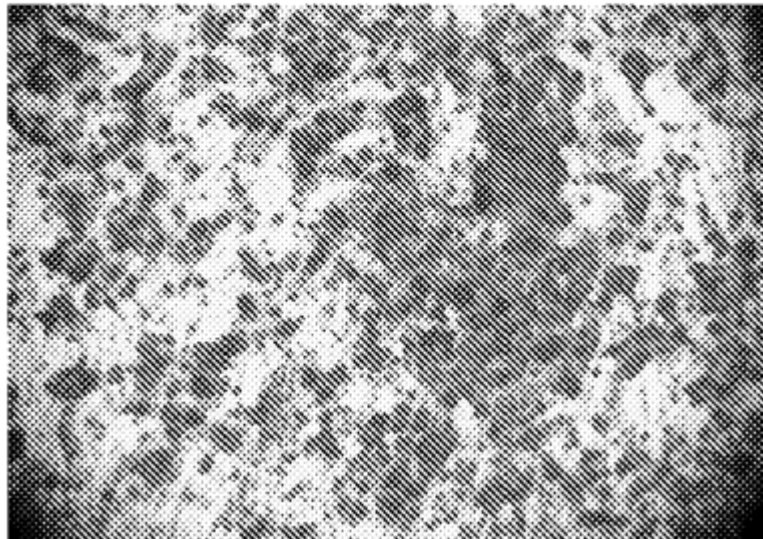


FIG 4

