

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 200**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2014** E 14152494 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** EP 2899266

54 Título: **Diferenciación mejorada de células madre mesenquimales a osteoblastos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.06.2018**

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND  
GMBH (100.0%)  
Else-Kröner-Strasse 1  
61352 Bad Homburg , DE**

72 Inventor/es:

**MUNOZ CASTANEDA, JUAN RAFAEL;  
DIAZ TOCADOS, JUAN MIGUEL;  
HERENCIA BELLIDO, CARMEN;  
RODRIGUEZ ORTIZ, MARIA ENCARNACION;  
MONTES DE OCA GONZALEZ, ADDY ROSA;  
MARTINEZ-MORENO, JULIO MANUEL;  
ALMADEN PENA, YOLANDA;  
RODRIGUEZ PORTILLO, MARIANO;  
ALJAMA GARCIA, PEDRO;  
GUNDLACH, KRISTINA;  
MIRJAM, PETER;  
BÜCHEL, JANINE;  
STEPPAN, SONJA y  
PASSLICK-DEETJEN, JUTTA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 672 200 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 mejorada de células madre mesenquimales a osteoblastos

5 La presente invención se refiere a un método para la generación de osteoblastos y la formación de hueso. En particular la invención se refiere a la capacidad de los iones magnesio de mejorar la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos y su crecimiento adicional. La invención se basa en el descubrimiento de que concentraciones extracelulares no fisiológicamente altas de magnesio tienen un fuerte efecto sobre la diferenciación y el crecimiento en comparación con las concentraciones fisiológicas de magnesio.

10 El magnesio es el cuarto catión más abundante en el cuerpo humano, y el primero entre los cationes divalentes. El magnesio es un electrolito imprescindible que está implicado en varias reacciones enzimáticas, como catalizador o cofactor enzimático, proceso celular básico, tal como obtención de energía y síntesis de ADN y proteína, y equilibrio mineral junto con otros iones tales como calcio, sodio y potasio. El magnesio principalmente se almacena en el tejido óseo (aproximadamente el 55 % del magnesio total en el cuerpo) y es responsable del mantenimiento de la homeostasis y la funcionalidad del hueso.

15 Las deficiencias en magnesio se habían asociado a proceso patológico como osteoporosis, hipertensión, arritmia, apoplejía cardíaca, diabetes mellitus o (pre-)eclampsia.

20 Respecto al hueso, varios estudios han informado que los bajos niveles de magnesio (hipomagnesemia) están relacionados con la disfunción ósea. Por tanto, se había informado mucho que los pacientes osteoporóticos muestran bajos niveles de magnesio en suero. Además, la deficiencia en magnesio y las alteraciones en el metabolismo mineral conducen a osteodistrofia, la cual frecuentemente conlleva a densidad mineral ósea u osteopenia.

El suplemento de magnesio se había relacionado con el descenso de la calificación vascular y el riesgo cardiovascular. Sin embargo, el papel del magnesio en el hueso continúa siendo controvertido. Se había observado que el suplemento de magnesio en la dieta disminuye los niveles de la hormona paratiroidea (HPT) conduciendo a un descenso en la resorción ósea.

25 Las células madre mesenquimales (CMM) son células progenitoras de osteoblasto, con alto potencial para ser diferenciadas a osteoblasto bajo estímulo osteogénico, conteniendo dexametasona, ácido ascórbico y glicerol fosfato.

El documento EP1684815 describe que las concentraciones no fisiológicamente altas de magnesio extracelular estimulan el crecimiento y la regeneración de condrocitos.

30 El documento EP1259196 describe un sustituto de injerto de hueso. Se menciona la incorporación de un material que comprende sal de magnesio.

35 Es un objetivo de la invención proporcionar un método eficaz de diferenciación de osteoblastos a partir de CMM. Esta CMM podría estar derivada de la médula ósea, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, o músculo adulto. Preferiblemente la CMM son células madre adultas. En el contexto de esta invención "células madre adultas" significa que la célula madre está derivada de sangre o tejido postnatal completamente desarrollado, a diferencia de estar derivada de células embrionarias o fetales.

Los objetivos de la invención se encuentran en las reivindicaciones 1 a 5.

40 Se ha encontrado que la diferenciación de CMM a osteoblastos se aumenta cuando el medio de diferenciación comprende concentraciones extracelulares no fisiológicamente altas de magnesio. Este efecto se puede utilizar mediante el suplemento de un medio de diferenciación para CMM por concentraciones extracelulares no fisiológicamente altas de magnesio y un método de diferenciación de CMM en tal medio *in vitro*. Los osteoblastos diferenciados resultantes se pueden usar para el trasplante en la medicina regenerativa. El efecto se puede utilizar además mediante la administración de una composición que comprende CMM suspendida en un medio de diferenciación con una concentración no fisiológicamente alta de magnesio. Según la invención el magnesio también se puede utilizar en una composición farmacéutica o en un andamio óseo para aumentar la diferenciación y el crecimiento de osteoblastos mediante la administración de tales composiciones medicinales o trasplante de tales dispositivos médicos. En tal caso la composición del material de andamio que comprende el magnesio da como resultado un microambiente con concentraciones no fisiológicamente altas de magnesio y estimulando de ese modo la CMM residente a una diferenciación y formación de hueso aumentadas. Dichos andamios y composiciones farmacéuticas, por lo tanto, se pueden usar ventajosamente para el tratamiento de la enfermedad ósea tal como lesión de hueso, trauma de hueso, osteoporosis, osteonecrosis y pérdida de hueso dental.

La Figura 1 muestra un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina que indica la proliferación de osteoblastos *in vitro* en diferentes concentraciones de magnesio.

La Figura 2 muestra la mineralización de la matriz ósea indicada por tinción con Rojo de Alizarina a diferentes concentraciones de magnesio.

5 La Figura 3 muestra la expresión de los genes osteogénicos durante la osteogénesis a diferentes concentraciones de magnesio indicando el nivel de osteogénesis.

La Figura 4 muestra el nivel de secreción de FGF23 a diferentes concentraciones de magnesio indicando la maduración de los osteoblastos.

10 La Figura 5 muestra el incremento de la proliferación celular de la CMM durante la osteogénesis indicada por los niveles de Ciclina D1 y PCNA.

El término magnesio como relevante para esta solicitud se define por el magnesio sin carga que puede estar unido a proteína, el magnesio en complejo, así como predominantemente en forma iónica. Generalmente el magnesio extracelular se encuentra en el cuerpo humano en su forma iónica. Con el propósito de esta invención el magnesio se puede proporcionar en forma de una de sus sales, óxidos o hidróxidos. Preferiblemente el magnesio se  
15 proporciona en forma de cloruro de magnesio solubilizado o sulfato de magnesio.

El término "concentración extracelular no fisiológicamente alta de magnesio" como relevante para esta invención significa que la concentración de magnesio en cultivo está por encima del nivel normalmente presente en el cuerpo humano. En el cuerpo humano se puede encontrar de manera fisiológica una concentración entre 0,6 mmol/l y 1 mmol/l de magnesio en suero. Una concentración no fisiológicamente alta significa que la concentración de  
20 magnesio en el compartimento extracelular está por encima de dicha concentración fisiológica.

Las células madre mesenquimales son células progenitoras pluripotentes con un alto potencial para proliferar y diferenciarse a diferentes tipos celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Para proliferar *in vitro* necesitan estar suspendidas en un medio de cultivo que proporciona suficientes nutrientes. Varios medios de cultivo adecuados son conocidos por el experto. Un medio de cultivo preferido es  $\alpha$ -MEM. El medio de cultivo puede estar  
25 opcionalmente complementado con suero fetal bovino.

Para fomentar la diferenciación de CMM a células diferenciadas se puede añadir un estímulo al medio de cultivo que de ese modo llega a ser un medio de diferenciación. Para estimular la diferenciación a osteoblasto se puede proporcionar la adición de una o más sustancias seleccionadas del grupo de ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerol fosfato y dexametasona en el medio de cultivo.

30 Se ha encontrado que añadir concentraciones extracelulares no fisiológicamente altas de magnesio incrementa tanto la velocidad de diferenciación como el número de CMM que se someten a diferenciación. Esto da como resultado un número mayor de osteoblastos *in vitro*. Lo mismo se prevé que es el caso *in vivo* que da como resultado una formación de hueso y mineralización aumentadas.

Debido a los experimentos *in vitro* se ha encontrado que las concentraciones de magnesio de más de 1 mmol/l pueden aumentar la diferenciación de CMM a osteoblastos. Una concentración de magnesio preferida está en el intervalo de 1,2 a 100 mmol/l, un intervalo especialmente preferido es de 1,5 a 50 mmol/l y el intervalo más preferido es de 1,8 a 4,5 mmol/l.  
35

Los osteoblastos resultantes de un método de diferenciación como se describió anteriormente se pueden usar en la medicina regenerativa o donde sea que se aconseje una formación incrementada de hueso. Esto puede ser el caso en diversos tipos de enfermedades de hueso incluyendo la lesión de hueso, trauma de hueso, osteoporosis, osteonecrosis y pérdida de hueso dental. Para tratar tales enfermedades de hueso se pueden trasplantar osteoblastos diferenciados. Se pueden administrar al paciente alternativamente células madre mesenquimales en un medio de diferenciación como se describió anteriormente.  
40

También es un aspecto ventajoso de la invención establecer un microambiente apropiado en el cuerpo del paciente que permita el crecimiento y la diferenciación aumentada de células madre mesenquimales y/o osteoblastos. Esto se puede conseguir o bien complementado al paciente con una composición farmacéutica que tiene una alta concentración de magnesio, preferiblemente por encima de 1 mmol/l. Tal composición farmacéutica preferiblemente se administra localmente para establecer el microambiente. También se puede administrar sistémicamente, por ejemplo, oralmente. En ese caso hay que tener cuidado de que el suplemento de magnesio no de como resultado  
45  
50 hipermagnesemia grave.

En la lesión de hueso o trauma los andamios se usan con frecuencia para reconstruir o regenerar hueso. Tales andamios generalmente están hechos de un material cerámico o polimérico. Los materiales preferidos para los andamios se basan en hidroxapatita. El crecimiento de osteoblastos y la diferenciación de CMM a osteoblastos fomentan la formación de nuevo material de hueso. Ambos se pueden promover proporcionando un microambiente que comprenda magnesio a una concentración no fisiológicamente alta. Tales concentraciones se pueden establecer proporcionando materiales de andamio que tienen magnesio incorporado en los mismos en una forma en la que el magnesio se hace biodisponible y se libera en el microambiente con el paso del tiempo. El magnesio puede estar proporcionado en el material del andamio tal cual o preferiblemente se proporciona como un revestimiento del andamio. Diversas formas de provisión de materiales o revestimientos en los que se proporciona un mineral con aumentada biodisponibilidad son conocidos por el experto.

### Ejemplos

Aislamiento de CMM de médula ósea de rata.

Se anestesiaron animales con pentobarbital sodio (50 mg/kg). Las tibias y los fémures de diez ratas Wistar cortados en la epífisis se perfundieron con medio esencial mínimo alfa ( $\alpha$ MEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 15 % (Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.), ultraglutamina al 1 % (Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina. La suspensión celular sencilla se generó por filtración a través de un colador celular de 70  $\mu$ m (BD Falcon, San José, California, EE.UU.). Después de centrifugación y lavado con medio  $\alpha$ MEM, se recogieron células madre de la médula ósea en matraces de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC, A/S, Roskilde, De) con  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 15 %, ultraglutamina al 1 %, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF) (PeproTech EC Ltd, London, GB) y, a continuación, se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. El medio  $\alpha$ -MEM fresco que contenía FBS al 10 %, ultraglutamina al 1 % (Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.), 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina y 1 ng/ml de bFGF se añadió después de 24 h y se cambió cada 3 días. Una vez que era confluyente al 85 a 90 %, se recogieron células usando Tripsina-EDTA (Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.) y se sembraron en placas de 6 pocillos a 13.000 células/cm<sup>2</sup> en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 %, ultraglutamina al 1 % (Lonza Walkersville, Inc., EE.UU.), 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina y 1 ng/ml de bFGF. Los tratamientos se comenzaron como se describe más adelante cuando las células alcanzan confluencia.

### Diferenciación de CMM a osteoblastos

Se cultivaron CMM durante 21 días en  $\alpha$ MEM que contenía dexametasona 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),  $\beta$ -glicerol fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y ácido ascórbico 0,2 mM (Química Farmacéutica BAYER, Barcelona, España) y  $\alpha$ -MEM con FBS al 10 %. Además, se añadieron diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (Carlo Erba Reagenti SpA, Milano, IT) (1,2 y 1,8 mM) dentro del estímulo osteogénico.

### Medición por RT-PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión génica

Se extrajo el ARN total con reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich, Co, St Louis, Mo) y se cuantificó por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Se sintetizó ADNc a partir de 1  $\mu$ g del ARN total con un kit de síntesis de ADNc de primera hebra (Qiagen; Hilden, Alemania) en presencia de hexámeros aleatorios en un volumen final de 20  $\mu$ l a 25 °C durante 10 min, seguido por 42 °C durante 15 min y 95 °C durante 3 min. Se usó el kit RT-PCR SYBR Green (Qiagen; Hilden, Alemania) para cuantificar los niveles de expresión de ARNm. Se sintetizaron Runx2, Osterix y Osteocalcina con el programa Oligo y PPAR $\gamma$  se compró de Qiagen (Qiagen; Hilden, Alemania). Las expresiones de estos genes se evaluaron por RT-PCR en tiempo real cuantitativa (Light cycler, Roche Diagnostics, Basel, Suiza) usando ARN 18 S ribosómico como gen constitutivo. Los resultados de los experimentos de expresión génica se muestran en la Figura 3. La cantidad de genes osteogénicos expresados incrementa con la concentración de magnesio en el medio de diferenciación. Esto indica que mayores concentraciones de magnesio aumentan la diferenciación de CMM a osteoblastos.

### Extracción de proteína y análisis de transferencia Western

Se aisló proteína citosólica a partir de CMM en un tampón de lisis que contenía Hepes 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, 70  $\mu$ g/ml de Coctel Inhibidor de Proteasa (Sigma-Aldrich, Co, St Louis, Mo), Igepal CA-630 al 0,5 % (Sigma-Aldrich, Co, St Louis, Mo), pH 7,9. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante (extracto citosólico) se almacenó. Los extractos nucleares se obtuvieron incubando el sedimento obtenido a partir del extracto citosólico en un tampón de lisis que contenía Hepes 20 mM, NaCl 0,4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 46  $\mu$ g/ml de Coctel Inhibidor de Proteasa, pH 7,9. La concentración de proteína se determinó por ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). Para determinar el contenido de proteínas específico se analizaron 20  $\mu$ g de lisados celulares nucleares mediante inmunotransferencia usando anticuerpos para PCNA (Santa Cruz Biotechnology INC, Dallas, TX) a 1:100 y Ciclina D1 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA) a 1:500 como anticuerpos primarios, y anti ratón de cabra conjugado con peroxidasa

de rábano picante (Santa Cruz Biotchnology Inc., Dallas, TX) a 1:10.000 y anti conejo de cabra (Santa Cruz Biotchnology Inc., Dallas, TX) a 1:10.000 como anticuerpos secundarios. El factor de transcripción II B (Cell Signaling Technology Inc., Dallas, TX) se usó como control de carga. Los resultados se muestran en la Figura 5 e indican que la adición de magnesio incrementa la proliferación celular durante la osteogénesis de CMM de rata.

#### 5 **Actividad de la fosfatasa alcalina (FA)**

Se usaron 2 µg de proteína para medir la actividad específica de la fosfatasa alcalina. Se usó p-nitrofenol fosfato (Sigma-Aldrich) 5 mM como sustrato. Los lisados celulares se incubaron en p-nitrofenol fosfato 2 mM durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se paró añadiendo NaOH 3 M, y el producto se cuantificó a 405 nm. La actividad de FA se expresó como mmoles hidrolizados de p-nitrofenol fosfato por minuto y por microgramo de proteína. Los resultados se expresaron como comparación con células de osteoblastos en la Figura 1. La cantidad de actividad de fosfatasa alcalina incrementa con la concentración de magnesio en el medio de diferenciación. Esto indica una actividad mayor de osteoblasto.

#### **Tinción con rojo de alzarina S**

Se detectó la mineralización de la matriz mediante tinción con rojo de alzarina S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 40 mM. Las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 2 %, sacarosa al 1 % durante 15 minutos y se lavaron con PBS tres veces. Después las células se tiñeron con rojo de alzarina S 40 mM pH 4,1 durante 20 minutos, y se lavaron 4 veces durante 5 minutos con agua pH 7 con agitación. Después, el agua se retiró y las muestras se secaron a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Figura 2. Las concentraciones incrementadas de magnesio dan como resultado una mineralización mejorada de osteoblastos durante la osteogénesis.

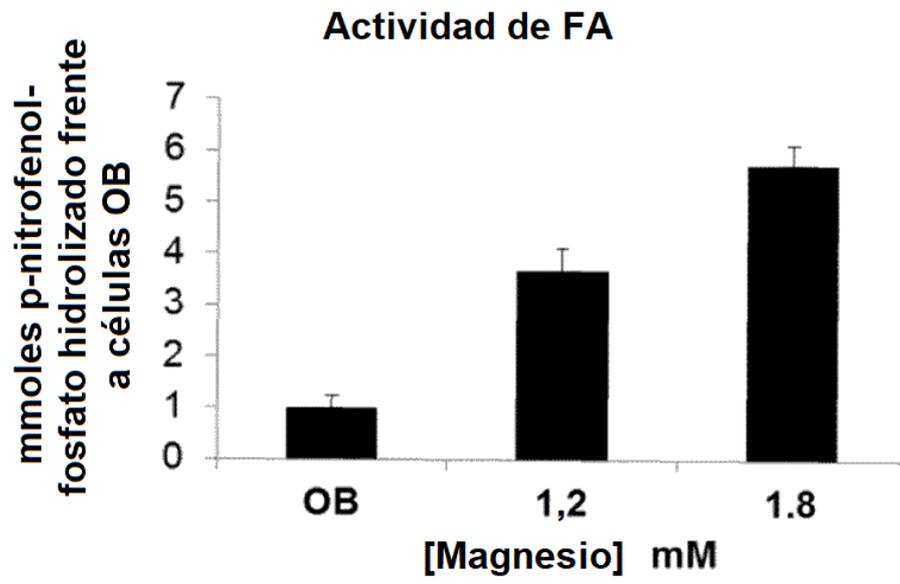
#### **Cuantificación de la liberación de FGF23**

Se recogió el sobrenadante del cultivo y se determinó el contenido de FGF23 completo mediante el kit de ELISA específica (Kainos Laboratories, Tokyo, Japón). El resultado se muestra en la Figura 4. La cantidad de secreción de FGF23 indica la maduración de los osteoblastos. Las concentraciones no fisiológicamente altas de magnesio dan como resultado un número incrementado de osteoblastos maduros en comparación con una concentración fisiológica de magnesio.

**REIVINDICACIONES**

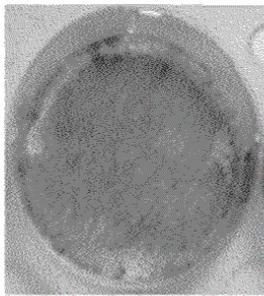
1. Método para la generación de osteoblastos que comprende la etapa de cultivo de células madre mesenquimales en un medio de diferenciación que comprende una concentración extracelular no fisiológicamente alta de magnesio en el que la concentración de magnesio es de 1,2 mmol/l a 100 mmol/l.
- 5 2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado por que** dicho magnesio se proporciona en forma de una solución de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio o sulfato de magnesio.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** la concentración de magnesio es de 1,5 mmol/l a 50 mmol/l, lo más preferiblemente 1,8 a 4,5 mmol.
- 10 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** dicho medio de diferenciación comprende uno o más factores de diferenciación seleccionados del grupo de dexametasona,  $\beta$ -glicerol fosfato y ácido ascórbico.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** dicho medio de diferenciación comprende  $\alpha$ -MEM

Fig. 1

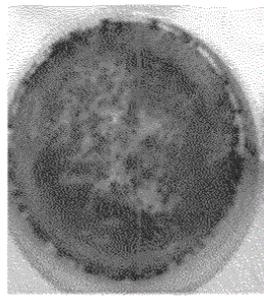


**Fig. 2**

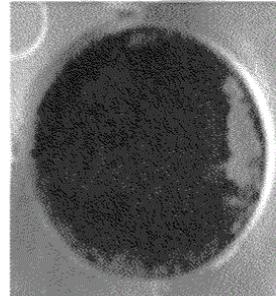
**Tinción Rojo Alizarina**



OB



1,2  
[magnesio] mM



1,8

Fig. 3

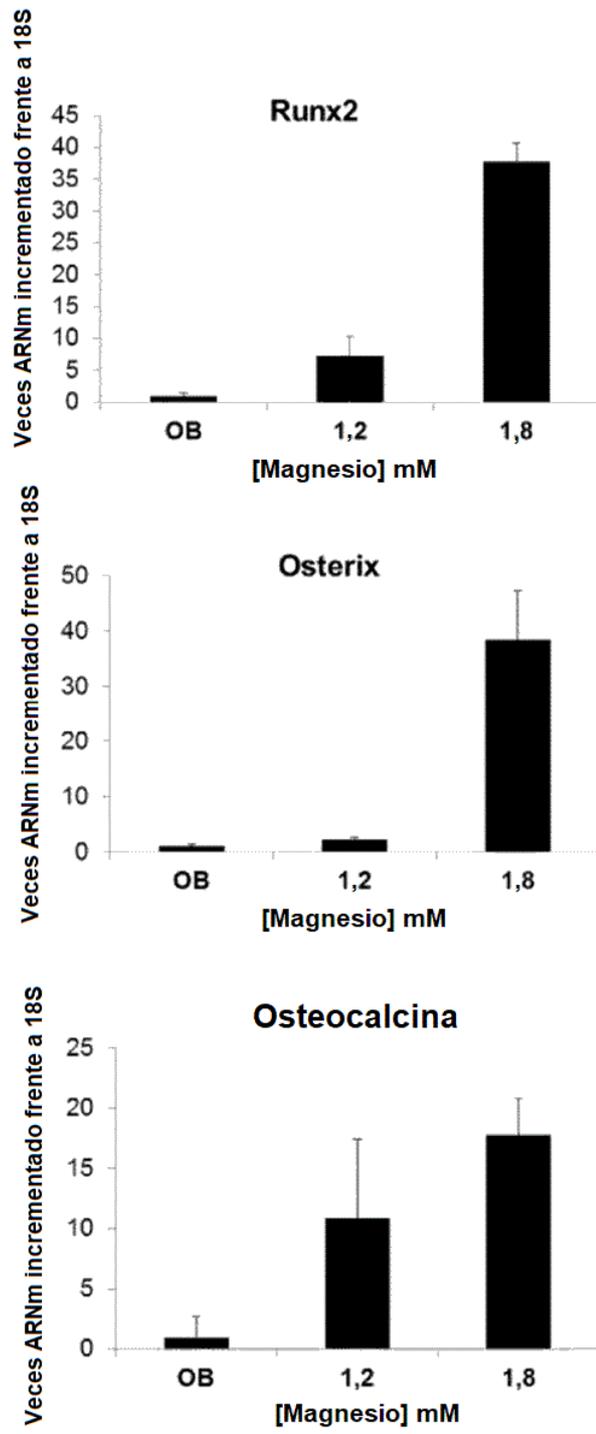


Fig. 4

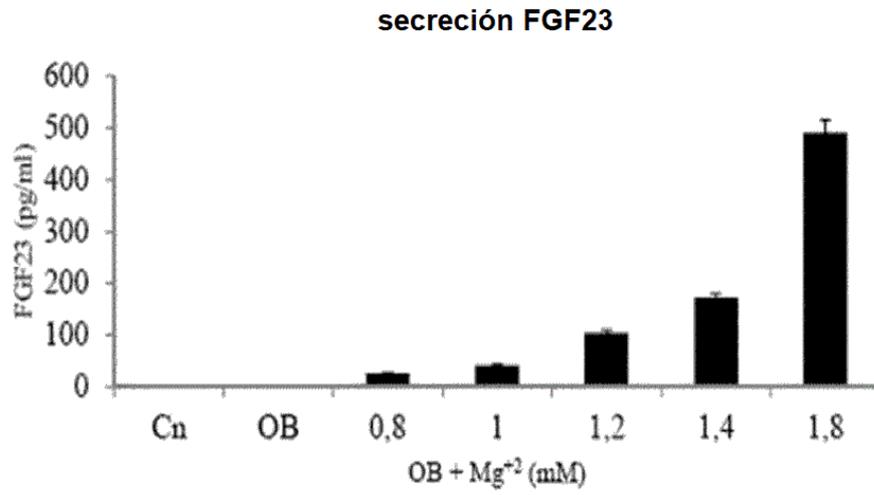


Fig. 5

