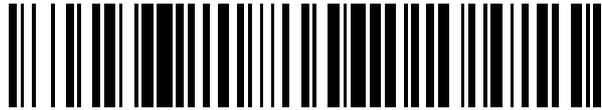


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 499**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/35 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/US2012/044651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13003595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12743811 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2726603**

54 Título: **Composiciones y métodos de células grasas marrones**

30 Prioridad:

29.06.2011 US 201161502508 P

18.01.2012 US 201261632122 P

25.01.2012 US 201261632516 P

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

27.01.2021

73 Titular/es:

BIORESTORATIVE THERAPIES, INC. (100.0%)

40 Marcus Drive Suite One

Melville, NY 11747, US

72 Inventor/es:

SILVA, FRANCISCO, JAVIER;

WEINREB, MARK;

PATEL, AMIT, N. y

BULL, DAVID, A.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 803 499 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

Composiciones y métodos de células grasas marrones

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de cultivo de células y más específicamente al cultivo y uso de células madre.

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos 61/502,508 presentada el 29 de junio de 2011, solicitud provisional de Estados Unidos 61/632,122 presentada el 18 de enero de 2012, y la solicitud provisional de Estados Unidos 61/632,516 presentada el 25 de enero de 2012, la totalidad de cada una de estas solicitudes se incorpora aquí como referencia.

10 Antecedentes

La grasa marrón es uno de los dos tipos de tejido adiposo que se encuentran en el cuerpo humano. Durante la embriogénesis, la grasa marrón se deriva de la diferenciación del mesodermo. La grasa marrón participa en el desarrollo y la homeostasis al proporcionar tejido metabólico capaz de proporcionar calor. La grasa marrón ayuda a regular el metabolismo y la termogénesis no tiritante. Además, la grasa marrón juega un papel más importante que el tejido adiposo blanco en la regulación del metabolismo. La grasa marrón constituye el 5 por ciento de la masa corporal de un recién nacido humano, y menos del 1 por ciento de la masa corporal de un adulto.

15

La actividad metabólica de la grasa marrón disminuye con el aumento de índice de masa corporal. Del mismo modo, la actividad metabólica de la grasa marrón disminuye con el aumento del porcentaje de grasa corporal.

20 Se han aislado e identificado células madre en diversos tejidos, y se han aislado las células madre de tejido adiposo blanco, expandido y se ha demostrado que tienen características terapéuticas funcionales. Hasta la fecha, no se ha identificado población de células madre en el tejido adiposo marrón.

25 Cannon B. et al., "Cultures of adipose precursor cells from brown adipose tissue and of clonal brown-adipocyte cell lines", *Methods in Molecular Biology*, vol. 155, 2001, páginas 213-224, divulga un método de aislamiento de células madre del tejido adiposo marrón que comprende aislar células de la fracción vascular del estroma y colocar las células en un medio que contiene suero o, alternativamente, un medio definido que todavía comprende componentes animales.

30 Casteilla L. et al., "Differentiation of ovine brown adipocyte precursor cells in a chemically defined serumfree medium. Importance of glucocorticoids and age of animals", *European Journal of Biochemistry*, vol. 198, no. 1, 23 de mayo de 1991, páginas 195-199, divulga el aislamiento de células madre del tejido adiposo marrón (es decir, la fracción vascular del estroma) y su cultivo en un medio sin suero. Sin embargo, el medio sin suero comprende insulina de origen bovino.

El documento WO 2009/137613 A2 divulga la diferenciación de células progenitoras derivadas de músculo en células de tejido adiposo marrón maduro (BAT) con BMP7. Las células diferenciadas se trasplantan para el tratamiento de la diabetes. Se contemplan diferentes rutas de administración, siendo la ruta preferida la subcutánea. El medio utilizado para obtener las células BAT comprende suero bovino.

35 El documento JP 2010 130968 A divulga la diferenciación de diferentes células madre en adipocitos marrones. Los adipocitos marrones diferenciados se trasplantan intraperitonealmente en ratones receptores para tratar la obesidad. Cada medio utilizado comprende suero bovino.

40 Tran Thien T. et al., "Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease", *Nature Reviews, Endocrinology*, vol. 6, no. 4, April 2010, pages 195-213, divulga el trasplante de tejido adiposo marrón para "disminuir la masa de tejido adiposo blanco y mejorar el metabolismo general".

Resumen de la invención

45 Se describen métodos para desarrollar estirpes celulares, tales como líneas de células madre, para uso terapéutico o cosmético. Por ejemplo, las estirpes celulares se pueden usar para tratar una amplia gama de trastornos degenerativos y metabólicos que incluyen, entre otros, obesidad, diabetes, hipertensión y deficiencia cardíaca. También se describen métodos para usar tales estirpes celulares para detectar compuestos que cumplen una función en la regulación de una variedad de procesos, tales como, entre otros, la metilación, la homeostasis y los genes involucrados en la regulación del metabolismo, la termogénesis, la activación y/o mantenimiento de los niveles de grasa marrón y blanca en el cuerpo.

50 En un aspecto, la invención presenta un método de generación de una célula madre. En una realización, las etapas incluyen obtener tejido graso marrón; aislar una célula madre del tejido graso marrón; y cultivar la célula madre en un medio que no comprende un producto animal, generando así una célula madre. En otra realización, el tejido graso marrón es de una muestra obtenida de un sujeto. En otra realización, la célula madre es positiva para uno o más de

los siguientes marcadores de superficie celular: CD63, CD90, HLA ABC, CD105, CD73, CD166, CD 9, CD44. En otra realización, la célula madre es negativa para uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD34, CD19, CD86, HLA DR, Lin, CD106, CD80, CD 117. En otra realización más, la célula madre es autogénica. En otra realización, la célula madre es alogénica. En otra realización, el medio incluye DMEM baja en glucosa sin rojo de fenol, 0.5-20 % de lisado de plaquetas humanas, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Gentamicina y 1000 unidades de heparina.

En otro aspecto, la invención presenta un método para generar un extracto celular de células madre, células progenitoras o células diferenciadas tales como adipocitos de grasa marrón activado (por ejemplo, los adipocitos de grasa marrón que expresan UCP-1 y/o PRDM16) y administrar este extracto en depósitos de grasa dentro del sujeto, tratando así la obesidad.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de la obesidad en un sujeto. En una realización, el método incluye las etapas de eliminar la grasa marrón de un sujeto; y administrar la grasa marrón a un depósito de grasa dentro del sujeto, tratando así la obesidad en el sujeto. En una realización, el depósito de grasa es un depósito de grasa blanca. En otra realización, el depósito de grasa es un depósito de grasa marrón.

En otro aspecto, la invención presenta un método de identificación de un compuesto implicado en la regulación del metabolismo, la activación de la grasa marrón y/o mantenimiento, comprende poner en contacto una célula madre autóloga, células progenitoras o de células diferenciadas producido por un método descrito en el presente documento con un compuesto de prueba; Determinar el nivel de actividad metabólica, termogénesis y/o activación de ciertos genes como PRDM-16 myf-5 UCP-1, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, CIDEA, Cox8b, Glut4, de la célula madre, la célula progenitora o la célula diferenciada en presencia del compuesto de prueba; y comparar el nivel de actividad metabólica, termogénesis y/o actividad génica de la célula madre, célula progenitora o célula diferenciada en presencia del compuesto de prueba con un nivel de actividad metabólica, termogénesis y/o actividad génica de la célula madre, progenitora célula o célula diferenciada en ausencia del compuesto de prueba, en el que un nivel de actividad metabólica, termogénesis y/o actividad génica en presencia del compuesto de prueba que es diferente de un nivel de actividad metabólica, termogénesis y/o actividad génica en ausencia del compuesto de prueba identifica el compuesto de prueba como un compuesto involucrado en la regulación del metabolismo o la activación de la grasa marrón, la termogénesis y/o el mantenimiento.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto. En una realización, el método incluye las etapas de eliminar una célula madre de un donante; diferenciar la célula madre en un adipocito marrón en un medio que no comprende un producto animal; y administrar el adipocito marrón a un depósito de grasa dentro del sujeto, tratando así el trastorno metabólico en el sujeto. En otra realización, el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en obesidad, obesidad central, diabetes, hipertensión, deficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica, presión arterial alta, dislipidemia de triglicéridos, dislipidemia de HDL, dislipidemia de colesterol, glucosa plasmática en ayunas elevada, desregulación de leptina, y desregulación adipónica. En otra realización más, el adipocito marrón se administra mediante inyección subcutánea. En otra realización más, el adipocito marrón se administra mediante inyección sistémica. En otra realización, el medio contiene un agente de diferenciación seleccionado del grupo que consiste en insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina e indometacina.

Todavía otro aspecto más de la invención es un método de identificación de un compuesto implicado en la regulación del metabolismo. En una realización, el método incluye las etapas de aislar una célula madre del tejido graso marrón; cultivar la célula madre en un medio que no comprende un producto animal; poner en contacto la célula madre con un compuesto de prueba; determinar el nivel de actividad metabólica de la célula madre en presencia del compuesto de prueba; y comparar el nivel de actividad metabólica de la célula madre en presencia del compuesto de prueba con un nivel de actividad metabólica de la célula madre en ausencia del compuesto de prueba, en el que un nivel de actividad metabólica en presencia del compuesto de prueba que es diferente de un nivel de actividad metabólica en ausencia del compuesto de prueba identifica el compuesto de prueba como un compuesto involucrado en la regulación del metabolismo. En una realización, la etapa de determinación incluye medir la adipogénesis. En otra realización, el método comprende además detectar los niveles de uno o más de PRDM16, BMP7, UCP1, UCP2 o MYF5. En otra realización más, el compuesto de prueba se selecciona del grupo que consiste en proteína, anticuerpo, péptido, muteína, polinucleótido, aptámero de ácido nucleico y molécula pequeña.

Un aspecto de la invención se refiere a la diferenciación de una célula madre en una célula grasa marrón. En una realización, el método incluye poner en contacto una célula madre con un medio que no comprende un producto animal, generando así una célula madre grasa marrón. En otra realización, el medio incluye un agente seleccionado del grupo que consiste en: insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina, indometacina, T3, rosiglitazona, FNDC5 y combinaciones de los mismos. En otra realización más, el medio incluye insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina e indometacina. En otra realización más, la célula madre de grasa marrón expresa PRDM-16, PGC-1, o una combinación de los mismos. En otra realización más, el tejido graso marrón es de una muestra obtenida de un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

Las presentes enseñanzas descritas en este documento se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de diversas realizaciones ilustrativas, cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Debe entenderse que

los dibujos descritos a continuación son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

La figura 1 es un diagrama esquemático que representa métodos ejemplares de inyectar células de grasa marrón o células precursoras de grasa marrón en un sujeto.

5 La figura 2 es una micrografía de un cultivo celular listo para pasar.

La figura 3 son imágenes que muestran la expresión génica por RTPCR en depósitos adiposos blancos y depósitos adiposos marrones.

Las figuras 4A y B son micrografías fluorescentes de células teñidas con marcadores de células madre.

10 Las figuras 5A-F es una serie de gráficos que muestran la detección por citometría de flujo de varios marcadores de tipo celular.

La figura 6 es una micrografía que muestra la presencia de gotitas de grasa en cultivo celular.

Las figuras 7A y B son micrografías de células teñidas con aceite rojo O.

La figura 7A muestra grandes gotas de grasa (200 μm) y la figura 7B muestra pequeñas gotas de grasa (50 μm).

Las figuras 8A y B son micrografías de células teñidas con marcadores de diferenciación.

15 La figura 8A muestra tinción con rojo de alizarina, un marcador de osteogénesis.

La figura 8B muestra tinción con anticuerpo de osteocalcina y azul alciano, para mostrar condrogénesis.

La figura 9 es una micrografía electrónica de barrido de exosomas aislados de células de grasa marrón.

La figura 10 muestra un curso de tiempo de niveles de glucosa y peso corporal en ratones tratados con células progenitoras de grasa marrón.

20 La figura 11 muestra un curso temporal de niveles de triglicéridos y niveles de colesterol en ratones tratados con células progenitoras de grasa marrón.

La figura 12 muestra un curso de tiempo de niveles de leptina y niveles de adipón en ratones tratados con células progenitoras de grasa marrón.

Descripción detallada

25 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las células, tales como células de grasa marrón autólogas o no autólogas o células madre, se pueden aislar y utilizar para modificar el metabolismo y/o la termogénesis en un sujeto, y/o para tratar una amplia gama de trastornos en un sujeto, como los trastornos metabólicos. (Figura 1)

30 Como se describe en el presente documento, las células de grasa marrón y células madre de grasa marrón se pueden utilizar terapéuticamente para tratar una serie de trastornos metabólicos. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico se selecciona de obesidad central (circunferencia de cintura de 40 pulgadas o más en hombres o 36 pulgadas o más en mujeres); dislipidemia de triglicéridos (1.7 mmol/L (150 mg/dl) o más); dislipidemia HDL (menos de 40 mg/dl en hombres, menos de 50 mg/dl en mujeres); presión arterial (130/85 mmHg o mayor); y glucosa plasmática en ayunas elevada (6.1 mmol/L (110 mg/dl) o más).

35 Las células aisladas pueden ser de, por ejemplo, una fuente autóloga o una fuente alogénica. Sin embargo, también se pueden usar otras fuentes.

Los productos celulares se pueden hacer de estas células madre cultivadas derivadas de los depósitos de grasa mediastínicos, tales como extractos celulares. Estos extractos celulares pueden ser utilizados terapéuticamente.

40 Las células o células madre descritas en esta solicitud aisladas de depósitos de grasa marrón también se pueden usar para seleccionar compuestos (incluidos los compuestos naturales) que aumentan los niveles de grasa marrón, metabolismo y/o perfiles de expresión génica que favorecen una mayor actividad metabólica. De manera similar, las células o células madre descritas en el presente documento pueden usarse para identificar compuestos (incluidos los compuestos naturales) que disminuyen los niveles de grasa marrón, metabolismo y/o perfiles de expresión génica que no favorecen una mayor actividad metabólica. En algunas realizaciones, el cribado es el cribado de moléculas pequeñas.

45 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" significa cualquier manera en la que uno o más de los síntomas de una enfermedad o trastorno se mejoran o de otra manera alteran beneficiosamente. Como se usa en el presente documento, la mejora de los síntomas de un trastorno particular se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente

o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas, que puede atribuirse o asociarse con el tratamiento mediante las composiciones y métodos de la presente invención.

Las expresiones “cantidad eficaz” y “eficaz para tratar”, como se usa en el presente documento, se refieren a una cantidad o una concentración de una o más de las composiciones descritas en el presente documento utilizado por un período de tiempo (incluyendo la administración crónica y aguda periódica o administración continua) que es eficaz en el contexto de su administración para causar un efecto deseado o un resultado fisiológico.

Tal como se utiliza aquí, el término “sujeto” significa un animal, humano o no humano, a quien se proporciona el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. Se contemplan aplicaciones veterinarias y no veterinarias. El término incluye, pero no se limita a, mamíferos. Los sujetos típicos incluyen humanos, animales de granja y mascotas domésticas como gatos y perros. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano, por ejemplo, un sujeto humano obeso. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, por ejemplo, un animal experimental, un animal de compañía o un animal criado para la alimentación.

Como se usa en este documento, una celda “purificada” o “aislada” es una célula sustancialmente libre de componentes contaminantes de un cultivo celular o fuente de tejido del que se deriva la célula. “Sustancialmente libre” significa que una preparación de una celda seleccionada tiene menos de aproximadamente 50 % (por ejemplo, menos de aproximadamente 40 %, 30 %, 20 % o 10 %) de componentes no seleccionados. Dicho componente no seleccionado también se denomina en el presente documento “componente contaminante”. Cuando las células aisladas se producen de forma recombinante, pueden estar sustancialmente libres de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos del 20 % (por ejemplo, menos del 10 % o 5 %) del volumen de la preparación celular.

Como se usa en el presente documento, “células madre” son células capaces de tanto autorrenovación y diferenciación en muchos diferentes linajes celulares (es pluripotente). “Células progenitoras” se refiere a un subconjunto de células madre con fenotipos similares a los de una célula madre. Una célula progenitora es capaz de autorrenovarse y generalmente es multipotente. Como se usa en el presente documento, “células diferenciadas” se refiere a un subconjunto de células con fenotipos de un tipo de célula maduro específico para un sistema de tejido u órgano particular.

Métodos de obtención de células

En general, las células útiles en los métodos descritos en este documento se pueden obtener de un sujeto, tal como mediante el aislamiento de las células de un sujeto, o las células madre embrionarias de grado clínico se puede obtener de una fuente comercial. En ciertas realizaciones, las células son parte de una muestra de tejido, tal como una muestra de grasa marrón, de un sujeto. La muestra de tejido puede administrarse directamente a un sujeto o las células pueden aislarse del tejido y procesarse como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, las células son células madre, como las de una biopsia de médula ósea, y pueden procesarse como se describe en el presente documento.

Ciertas células que se pueden utilizar en los métodos descritos en este documento son unipotentes, multipotentes, o células pluripotentes y pueden ser de origen mesodérmico. En algunas realizaciones, las células son células progenitoras adiposas marrones, células grasas marrones maduras o células madre. Las células progenitoras adiposas marrones, las células grasas marrones maduras o las células madre se pueden identificar determinando la presencia o ausencia de uno o más marcadores de expresión de la superficie celular. Los marcadores ejemplares de la superficie celular que se pueden usar para identificar una célula progenitora adiposa marrón, una célula adiposa marrón madura o una célula madre incluyen, entre otros, MYF5, UCP-1, PRDM-16, SSEA-4, Sca-1, CD45, Mac-1, CD29 (integrina β 1), CD105 (Endoglin), CD166 (ALCAM), desmina, vimentina y c-kit. En otros métodos, las células son células adiposas de color marrón.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las células pueden ser autólogas, singénicas, alogénicas, o xenogénicas.

Las células adecuadas para su uso en los métodos descritos aquí se pueden encontrar en una variedad de tejidos y órganos, incluidos, pero no limitados a, por ejemplo, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso, próstata, dermis, el sistema cardiovascular, glándula mamaria, hígado, piel neonatal, calvaria, médula ósea, intestino, tejido adiposo (por ejemplo, tejido adiposo blanco, tejido adiposo marrón), sangre periférica, sangre periférica movilizada y cordón umbilical. Las células pueden aislarse de dichos tejidos y órganos de varias maneras conocidas, que incluyen, por ejemplo, biopsia, aféresis o liposucción.

En algunas realizaciones, las células se obtienen a partir de tejido adiposo, por ejemplo, los depósitos de tejido adiposo blanco o marrón. Por ejemplo, el tejido adiposo marrón se puede cosechar utilizando medios conocidos (por ejemplo, mediante biopsia) de regiones anatómicas específicas de un sujeto, como regiones cervicales-supraclaviculares, regiones mediastínicas superiores y regiones superficiales o laterales a los músculos esternocleidomastoideos. El tejido adiposo marrón puede identificarse de varias maneras, como por ejemplo mediante imágenes (Mediante, por ejemplo, exploración PET). El tejido adiposo marrón puede someterse a un procesamiento mínimo (tal como mediante

lavado con tampón, por ejemplo, DPBS, y separarse mecánicamente en porciones) y administrarse a un sujeto como se describe en el presente documento.

5 En otros métodos, células, como las células de grasa marrón, células mononucleares, células progenitoras, o células madre, se puede aislar de los componentes contaminantes de la muestra de tejido. Por ejemplo, la muestra de tejido se puede tratar con una enzima como la colagenasa (por ejemplo, Tipo I, II o III), dispasa, hialuronidasa o elastasa y las células se pueden aislar por filtración o centrifugación. Alternativamente, la muestra de tejido puede tratarse químicamente, tal como con EDTA, y las células pueden aislarse usando, por ejemplo, interrupción mecánica (por ejemplo, creando vórtices). Las células aisladas se pueden lavar con un tampón adecuado, como DPBS.

10 En algunos métodos, las células se aíslan a partir de una muestra de médula ósea de un sujeto. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de médula ósea mediante aspiración con aguja u otra técnica conocida. En ciertos casos, las células pueden aislarse de una muestra de médula ósea utilizando un gradiente de densidad Ficoll - Hypaq.

15 En todavía otros métodos, las células están aisladas de la piel de un sujeto. Por ejemplo, se puede usar una biopsia por punción para obtener una muestra de piel. En un método ejemplar, se usa una biopsia por punción para obtener un trozo de piel de 0.5 cm, que se lava tres veces con DPBS, y la dermis se retira de la biopsia. Luego se corta la piel en secciones pequeñas (aproximadamente 3 mm) y se coloca en placas sobre los pozos de una placa de cultivo de tejidos de 6 pozos con una cubierta estéril que se desliza sobre el tejido y las células cultivadas.

Métodos de cultivo de células

20 En ciertos métodos, células obtenidas como se describe en el presente documento se mantienen en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio de cultivo que no comprende un producto de origen animal (tal como suero bovino o suero de ternera) con el fin de obtener una población mayor de células. Los métodos de cultivo pueden incluir permitir que las células experimenten suficientes ciclos de duplicación, por ejemplo, para producir una cepa celular clonal o una cepa celular heterogénea del tamaño deseado, por ejemplo, un número suficiente para proporcionar un efecto terapéutico a un sujeto, o una cantidad suficiente número para establecer una estirpe celular estable. Por ejemplo, las células pueden cultivarse a 37 °C durante un período de 3-6 semanas después de una biopsia inicial.

25 Los medios de cultivo usados en los métodos descritos en el presente documento no incluyen productos de origen animal. Un medio de cultivo ejemplar adecuado para los métodos descritos en el presente documento puede incluir lisado de plaquetas humano y un anticoagulante, tal como heparina o ácido-citrato-dextrosa. Otro medio de cultivo ejemplar incluye suero de tipo AB agrupado humano y un anticoagulante. Otros ejemplos de medio de cultivo pueden incluir medio Eagle modificado (MEM) (como MEM de Dulbecco o alfa MEM) suplementado con glicina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-prolina, L-serina, L-glutamina y un antibiótico. Un medio de cultivo
30 ejemplar incluye: DMEM (bajo nivel de glucosa, sin rojo fenol); 0.5-20 % de lisado de plaquetas humanas; 1X aminoácidos no esenciales (NEAA); 1X Glutamax; 1X Gentamicina y 1000 unidades de heparina.

35 En algunas realizaciones, las células se pueden mantener en el medio de cultivo bajo condiciones estándar, tal como se describe en, por ejemplo, Freshney (1994) Culture of Animal Cells, un Manual de la Técnica de base, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York.

En ciertas realizaciones, las células se cultivan en el lisado de plaquetas humano o humano reunido AB Tipo de suero derivado de sujetos que han sido expuestos a temperaturas frías, por ejemplo, una temperatura adecuada para generar una respuesta del sistema nervioso simpático en el sujeto.

40 En otras realizaciones, las células se pueden mantener en un entorno hipóxico (por ejemplo, 0 a aproximadamente 5 % O₂ a 37 °C).

En ciertas realizaciones, las células cultivadas pueden expresar MYF-5, BMP-7, y/o PRDM16, SSEA4. En otras realizaciones, las células cultivadas a partir de tejido muscular pueden expresar SCA1 y no expresar c-Kit o CD45.

Métodos de diferenciación celular

45 En ciertas realizaciones, las células obtenidas como se describe en el presente documento se mantienen en un medio de diferenciación adecuado, por ejemplo, un medio que no comprende un producto de origen animal. Por ejemplo, las células madre pueden mantenerse en un medio de diferenciación durante un tiempo suficiente para dar como resultado la diferenciación de las células madre en células progenitoras de adipocitos marrones o adipocitos marrones. En realizaciones particulares, las células se mantienen en un medio de diferenciación durante un tiempo suficiente para dar como resultado la diferenciación de las células madre en células que expresan MYF5. En ciertos casos, las células
50 se mantienen en el medio de diferenciación durante, por ejemplo, 1-5 días, 5-10 días, 10-14 días, 14-21 días, 21-28 días o más.

55 En algunas realizaciones, el medio de diferenciación incluye uno o diferenciación más química o la hormona de inductores y/o tiazolidinedionas (como se describe en, por ejemplo, Klien et al, J. Biol Chem 274:34795 - 34802 (1999); Hauner y col., J. Clin. Invest. 84: 1663-1670 (1989)). En algunos casos, el medio de diferenciación incluye insulina, dexametasona, isobutylmetilxantina e indometacina y rosiglitazona. Un medio de diferenciación ejemplar incluye DMEM

(glucosa baja sin rojo fenol); 0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas; 1X NEAA; 1X Glutamax; 1X Gentamicina; 1000 unidades de heparina; 10 ug/ml de insulina; 1 μ M de dexametasona; Indometacina 200 uM; e isobutilmetilxantina 0.5 mM. En otra realización, el medio de diferenciación incluye BMP7. En otra realización, el medio de diferenciación incluye DMEM (glucosa baja sin rojo fenol); 0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas; 1X NEAA; 1X Glutamax; 1X Gentamicina; 1000 unidades de heparina; Isobutilmetilxantina 0.5 mM, indometacina 125 nM, dexametasona 5 uM, insulina 850 nM, T3 1 nM y rosiglitazona 1 uM. En otra realización, el medio de diferenciación incluye DMEM (glucosa baja sin rojo fenol); 0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas; 1X NEAA; 1X Glutamax; 1X Gentamicina; 1000 unidades de heparina; Isobutilmetilxantina 0.5 mM, indometacina 125 nM, dexametasona 5 uM, insulina 850 nM, T3 1 nM y rosiglitazona 1 uM y FNDC5 20 nM.

En algunos casos, las células se mantienen en medio de diferenciación hasta que se detectan uno o más marcadores de la diferenciación de adipocitos marrón. Los ejemplos no limitantes de marcadores de diferenciación incluyen la expresión del efector tipo DFF45 inductor de muerte celular (CIDEA), desiodinaie tipo II, coactivador gamma PPAR (PGC) -1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la exposición de las células a choque de frío mediante el cultivo o la diferenciación de las células durante ciclos diarios de 4 °C - 25 °C durante una hora seguido de cultivo en condiciones estándar (37 °C, 5 % de CO₂ o condiciones hipóxicas)

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen la evaluación del nivel de la adipogénesis luego de mantenimiento en un medio de diferenciación. La adipogénesis se puede evaluar midiendo, por ejemplo, la acumulación de lípidos (por ejemplo, usando tinción con aceite rojo-o (ORO)), la morfología celular (por ejemplo, utilizando inspección visual de las células, por ejemplo, microscópico) o termodinámica celular (por ejemplo, citocromo actividad oxidada, unidades de enzimas Na⁺ -K⁺ -ATPasa u otras enzimas involucradas en la termogénesis de adipocitos marrones). Además, en algunas realizaciones, la adipogénesis de grasa marrón funcional después de la diferenciación puede determinarse mediante ensayos de absorción de ácidos grasos o tasa de consumo de oxígeno.

Métodos de procesamiento adicionales

En algunas realizaciones, las células obtenidas como se describe en el presente documento pueden ser sometidos a un procesamiento adicional antes de la administración en un sujeto. En ciertas realizaciones, una célula obtenida como se describe en el presente documento puede modificarse recombinantemente para expresar uno o más genes, por ejemplo, un gen implicado en la adipogénesis marrón. Por ejemplo, una célula puede transfectarse con uno o más ácidos nucleicos que codifican el efector A tipo DFF45 (CIDEA), desiodinaie tipo II, coactivador gamma PPAR (PGC) -1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 o combinaciones de los genes, antes de la administración a un sujeto.

En otras realizaciones, las células pueden ser células madre pluripotentes derivadas artificialmente (por ejemplo, diferenciadas o parcialmente diferenciadas) a partir de una célula no pluripotente. Por ejemplo, las células de la piel, como los fibroblastos dérmicos, pueden reprogramarse a un estado pluripotente mediante transfección con OCT4, Nanog o SSEA4. Dichas células se conocen en la técnica como células madre pluripotentes inducidas. En otras realizaciones, las células pueden manipularse adicionalmente después de volverse pluripotentes mediante transfección con uno o más ácidos nucleicos que codifican el efector tipo DFF45 A (CIDEA), desiodinaie Tipo II, coactivador gamma PPAR (PGC) -1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 o combinaciones de genes, (es decir, PPARG2, CEBPB, PRDM16).

En realizaciones adicionales, una célula puede ser inactivada mitóticamente antes de la administración en un sujeto. Sin desear limitarse a la teoría, se considera que, tras la administración a un sujeto, las células obtenidas y/o tratadas como se describe en el presente documento expresan ciertos factores que pueden tener un efecto paracrino en las células y tejidos circundantes. De acuerdo con lo anterior, la inactivación mitótica evita una mayor división celular al tiempo que permite que las células inactivadas mantengan el efecto paracrino. En ciertas realizaciones, las células pueden tratarse con irradiación química o gamma suficiente para inactivar mitóticamente las células.

En algunas realizaciones, un extracto celular o lisado se pueden preparar a partir de una célula descrita en este documento y se administra a un sujeto. Por ejemplo, se pueden obtener y cultivar células, y aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10¹⁰ se pueden recoger y usar de células para preparar un extracto libre de células usando métodos conocidos. En un método ejemplar, se prepara un extracto sometiendo las células recolectadas a ciclos de congelación/descongelación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más ciclos de congelación-descongelación) usando un baño de etanol/hielo seco. El extracto se centrifuga luego (por ejemplo, a aproximadamente 14,000 rpm) para eliminar el material insoluble. El extracto se puede administrar a un sujeto.

Métodos de expresión

En ciertas realizaciones, una célula descrita en este documento se puede modificar de forma recombinante para expresar uno o más genes. Dichos ácidos nucleicos pueden incorporarse en un vector de expresión. Los vectores de

expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento pueden administrarse en cualquier vehículo eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de administrar eficazmente el gen componente a las células *in vivo*. Los enfoques incluyen la inserción del gen en vectores virales, incluidos retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, poxvirus, alfavirus y herpes simplex virus-1, o plásmidos bacterianos o eucarióticos recombinantes. Los vectores virales transfectan las células directamente; el ADN plasmídico puede administrarse desnudo o con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectamina) o derivados (por ejemplo, conjugados con anticuerpos), conjugados de polilisina, gramicidina S, envolturas virales artificiales u otros portadores intracelulares similares, así como inyección directa de la construcción génica o precipitación de CaPO₄ llevada a cabo *in vivo*.

En algunas realizaciones, el vector de expresión es un vector viral que contiene una o más secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc). Los vectores de retrovirus se pueden usar como un sistema de suministro de genes recombinantes para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente en humanos como es conocido por un experto en la materia. (Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con dichos virus se pueden encontrar en Ausubel, et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1989), Secciones 9.10-9.14, y otros manuales de laboratorio estándar. Otro sistema de administración de genes virales útil en los presentes métodos utiliza derivados de adenovirus. Otro sistema de vectores virales útil para la administración de ácidos nucleicos es el virus adenoasociado (AAV) como es conocido por un experto en la materia.

Además de los métodos de transferencia virales, tales como los ilustrados anteriormente, los métodos no virales también se pueden emplear para expresar un ácido nucleico en una célula descritos en este documento. Por lo general, los métodos no virales de transferencia de genes dependen de los mecanismos normales utilizados por las células de mamíferos para la absorción y el transporte intracelular de macromoléculas. En algunas realizaciones, los sistemas de administración de genes no virales pueden depender de rutas endocíticas para la absorción del gen sujeto por la célula objetivo. Los sistemas ejemplares de entrega de genes de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados policationicos tales como poliamina y polilisina, y envolturas virales artificiales. Otras realizaciones incluyen sistemas de inyección de plásmidos como los conocidos por un experto en la materia. Otros vectores no virales incluyen un vector basado en un andamio/región unida a matriz (S/MAR). En realizaciones particulares, una célula descrita en el presente documento se transfecta con una construcción S/MAR-PRDM16, una construcción S/MAR-BMP-7/PRDM16 o una construcción S/MAR-BMP-7. En otra realización, la célula se transfecta con una construcción S/MAR que contiene uno o más ácidos nucleicos que codifican el efector tipo DFF45 A (CIDEA), desiodinaie Tipo II, coactivador gamma PPAR (PGC) -1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 o combinaciones de los genes o una combinación de ellos (es decir, PPARG2, CEBPB, PRDM16).

En algunas realizaciones, un ácido nucleico se puede expresar utilizando construcciones de ADN sin envoltura y/o construcciones de vectores basados en ADN, como se conoce por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, los vectores de ADN pueden introducirse en células diana mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula diana, incluyendo la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, DEAE: transfección mediada por dextrano, lipofección, electroporación, pistola génica, sonoporación o magnetofección.

Todas las técnicas de biología molecular necesarias para generar una construcción de expresión descritos aquí son técnicas estándar que serán apreciados por un experto en la técnica.

Métodos de administración

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir implantar tejido o células, por ejemplo, células obtenidas o aisladas como se describe en el presente documento, en un sujeto a tratar. Las células pueden ser adipocitos marrones diferenciados (por ejemplo, adipocitos marrones aislados o adipocitos diferenciados producidos como se describe aquí), o pueden ser células madre o células no diferenciadas, cuyas células, o su progenie (es decir, células hijas), se diferenciarán en adipocitos marrones después de la implantación. Estos métodos son útiles, por ejemplo, para modificar el metabolismo en un sujeto como se describe aquí.

Antes de la administración en un sujeto, las células se pueden lavar (por ejemplo, en isotónica PBS) para eliminar cualquier contaminante, incluyendo la contaminación de los componentes de muestra de tejido, medios de cultivo o medio de diferenciación, antes de la implantación. El número de células requeridas es variable y depende de una variedad de factores, que incluyen, entre otros, el tipo de célula utilizado, el sitio de implantación de las células (por ejemplo, el número de células que se pueden usar puede estar limitado por el sitio anatómico de implantación), y la edad, el área de superficie y el estado clínico del sujeto. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, o aproximadamente 10¹⁰ células se implantan en el sujeto.

Los métodos para implantar células dentro de un sujeto son conocidos en la técnica, por ejemplo, usando un sistema de administración configurado para permitir la introducción de células en un sujeto. En general, el sistema de suministro puede incluir un depósito que contiene células y una aguja en comunicación fluida con el depósito. Dichos sistemas

de suministro también están dentro del alcance de la invención. Generalmente, dichos sistemas de suministro se mantienen de manera estéril. Varias rutas de administración y varios sitios (por ejemplo, pueden utilizar, subcapsular renal, subcutáneo, sistema nervioso central (incluido intratecal), intravascular, intrahepático, intraesplancítico, intraperitoneal (incluido intraomental), implantación intramuscular).

5 Las células pueden estar en un portador farmacéuticamente aceptable, con o sin un andamio, matriz, u otro dispositivo implantable para el que las células pueden adjuntar (los ejemplos incluyen portadores hechos de, por ejemplo, colágeno, fibronectina, elastina, acetato de celulosa, celulosa nitrato, polisacárido, fibrina, gelatina y combinaciones de los mismos). Inicialmente, 1,000,000 células se sembraron en andamios extracelulares porosos y se cultivaron durante 5 días. La diferenciación en adiposo marrón se inició mediante la adición de DMEM (bajo nivel de glucosa sin rojo fenol) que contenía

10 10 % de lisado de plaquetas humanas;

1X NEAA;

1X Glutamax;

1X Gentamicina;

15 1000 unidades de heparina;

Isobutilmetilxantina 0.5 mM,

Indometacina 125 nM,

Dexametosona 5 μ M,

Insulina 850 nM,

20 T3 1 nM,

Rosiglitazona 1 μ M.

y las células se cultivaron en este medio durante 2 días seguido de una diferenciación adicional durante 18 días adicionales en medios compuestos por:

DMEM (glucosa baja sin rojo fenol);

25 10 % de lisado de plaquetas humanas;

1X NEAA;

1X Glutamax;

1X Gentamicina;

1000 unidades de heparina;

30 Isobutilmetilxantina 0.5 mM,

Indometacina 125 nM,

Dexametosona 5 μ M,

Insulina 850 nM,

T3 1 nM,

35 Rosiglitazona 1 nM

FNDC5 20 nM.

Las células implantadas usando andamios fueron mostradas bajo microscopía electrónica de barrido para insertarse en el andamio. Otras mediciones de la absorción de ácidos grasos por las células mostraron que las células eran metabólicamente activas.

40 En casos particulares, las células se implantan en grasa blanca o grasa marrón en el sujeto, y/o en o cerca de una región anatómica que contiene grasa blanca o la grasa marrón.

5 Cuando se usan células no inmunológicamente compatibles (por ejemplo, cuando se administran células no autólogas a un sujeto), se puede administrar al sujeto un compuesto inmunosupresor, por ejemplo, un fármaco o anticuerpo, en una dosis suficiente para lograr inhibición del rechazo de las células. Los rangos de dosificación para fármacos inmunosupresores son conocidos en la técnica. Los valores de dosificación pueden variar de acuerdo con factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo.

Sujetos

10 Los métodos y composiciones descritos en este documento son útiles para el tratamiento de trastornos metabólicos. En general, los métodos incluyen administrar una cantidad efectiva de células descritas en el presente documento a un sujeto que lo necesite, incluido un sujeto que se ha diagnosticado que necesita dicho tratamiento. Los sujetos pueden incluir mamíferos.

15 En algunas realizaciones, los métodos incluyen la identificación de un sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno metabólico), y administrar al sujeto una cantidad eficaz de tejido o células descrito en este documento. En ciertos casos, el sujeto es diagnosticado como un sujeto con sobrepeso u obesidad, por ejemplo, con un índice de masa corporal (IMC) de 25-29 o 30 o superior o un sujeto con un trastorno relacionado con el peso. Un sujeto que necesita tratamiento con los métodos descritos en este documento puede seleccionarse en función del peso corporal o el índice de masa corporal del sujeto. En algunas realizaciones, los métodos incluyen evaluar al sujeto para uno o más de: peso, depósitos de tejido adiposo, morfología del tejido adiposo, niveles de insulina, metabolismo de la insulina, niveles de glucosa, capacidad termogénica y sensibilidad al frío. En algunas realizaciones, la selección del sujeto puede incluir evaluar la cantidad o actividad de tejido adiposo marrón en el sujeto y registrar estas observaciones.

20 La evaluación se puede realizar antes, durante y/o después de la administración de las células descritas en el presente documento. Por ejemplo, la evaluación se puede realizar al menos 1 día, 2 días, 4, 7, 14, 21, 30 o más días antes y/o después de la administración de las células descritas en este documento.

Metabolismo y trastornos metabólicos

25 El metabolismo es una cascada de reacciones químicas que regulan los mecanismos por los cuales los organismos vivos regulan, mantienen y responden a factores intrínsecos y extrínsecos que afectan su capacidad de mantener, crecer y reproducirse. Un desequilibrio de esta actividad metabólica puede conducir a eventos celulares posteriores que pueden dar lugar a una serie de trastornos degenerativos. Tales trastornos pueden provocar no solo síntomas de una amplia gama de enfermedades, sino que pueden interferir con la metilación adecuada del patrón de impresión de las células germinales masculinas y femeninas, estableciendo así una predisposición genética en la nueva generación a los trastornos degenerativos.

30 En ciertas realizaciones, el tejido o células descritos en este documento se administran a un sujeto para modificar, por ejemplo, aumentar, la actividad metabólica en el sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno tal como, entre otros, obesidad, osteoartritis, hipertensión, diabetes, un trastorno autoinmunitario, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, neoplasia o una deficiencia cardíaca tal como enfermedad cardíaca isquémica. En casos particulares, la administración de células descritas en el presente documento trata el trastorno.

35 En otras realizaciones, los sujetos pueden ser examinados para detectar niveles de marcadores adipogénesis, tales como Efactor A tipo DFF45 (CIDEA), Desiodinaie tipo II, PPAR coactivador gamma (PGC)-1 alfa, PGC-1 beta, la proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM- 16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4, y/o BMP7, y la información utilizada como herramienta de diagnóstico para obesidad, hipertensión, diabetes o enfermedad cardíaca isquémica. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de tejido adiposo o una muestra de sangre de un sujeto y el nivel de efector tipo DFF45 A (CIDEA), desiodinaie tipo II, coactivador gamma PPAR (PGC)-1 alfa, beta PGC-1, proteínas de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM- 16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 y/o BMP7 pueden medirse en la muestra. Un nivel de efector similar a DFF45 A (CIDEA), desiodinaie tipo II, Coactivador PPAR gamma (PGC)-1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 y/o BMP7 por debajo de un nivel predeterminado indica que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno metabólico, como obesidad, hipertensión, diabetes o enfermedad cardíaca isquémica. El nivel predeterminado puede ser el nivel de un marcador en una muestra correspondiente de un sujeto que no tiene el trastorno metabólico. En otras realizaciones más, se pueden medir los niveles de grasa marrón y grasa blanca en un sujeto, por ejemplo, usando exploración PET, y se puede determinar una proporción de grasa marrón a grasa blanca. Una proporción de grasa marrón a grasa blanca inferior a un nivel predeterminado puede indicar que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno metabólico, como obesidad, hipertensión, diabetes o enfermedad cardíaca isquémica.

Métodos de detección de compuestos de adipogénesis

Las células aisladas o cultivadas como se describe en el presente documento pueden usarse para detectar compuestos que modifican, por ejemplo, aumento o reducir, la actividad metabólica. En algunas realizaciones, una

célula, por ejemplo, una célula progenitora de adipocitos marrón, una célula diferenciada o una célula madre, puede ponerse en contacto con un compuesto de prueba y el nivel de un marcador de adipogénesis, por ejemplo, se puede medir un marcador descrito aquí (por ejemplo, PRDM16, BMP7, UCP1 o MYF5). Un compuesto de prueba que aumenta el nivel de un marcador de adipogénesis en relación con una célula no contactada con el compuesto de prueba se identifica como un compuesto que aumenta la actividad metabólica, mientras que un compuesto de prueba que reduce un marcador de adipogénesis se identifica como un compuesto que disminuye la actividad metabólica. En otra realización, la célula es un adipocito blanco y se transfecta con una construcción que expresa un gen indicador (es decir, GFP, luciferasa) bajo el control del efector tipo DFF45 A (CIDEA), Desiodinaie Tipo II, coactivador gamma PPAR (PGC)- 1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 o una combinación de ellos. Un compuesto de prueba que aumenta el nivel de un marcador de adipogénesis en relación con una célula no contactada con el compuesto de prueba se identifica como un compuesto que aumenta la actividad metabólica, mientras que un compuesto de prueba que reduce un marcador de adipogénesis se identifica como un compuesto que disminuye la actividad metabólica.

En un método ejemplar, una célula descritos en este documento se transfecta con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica un efector A tipo DFF45 (CIDEA), Desiodinaie tipo II, Coactivador PPAR gamma (PGC)-1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4, BMP7, MYF5 o una combinación de ellos, bajo el control de un promotor inducible. Los ejemplos no limitativos de tales promotores incluyen promotores regulados químicamente (es decir, tetraciclina, esteroides y metales), o promotores específicos de temperatura que activarán y promoverán la expresión a una temperatura permisiva, como la temperatura corporal inferior a la normal de un sujeto.

En un ejemplo, un promotor específico de temperatura se coloca en una corriente arriba vector viral o no viral de un ácido nucleico que codifica un efector A tipo DFF45 (CIDEA), Desiodinaie tipo II, Coactivador PPAR gamma (PGC)-1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 o una combinación de ellos, MYF5 y/o BMP7. Una célula aislada del tejido adiposo (blanco o marrón), médula ósea, piel, músculo o cordón umbilical se transfecta con el vector. La célula se cultiva luego a la temperatura permisiva (que permite la expresión génica del promotor) en presencia o ausencia de un compuesto de prueba, y se determina el efecto del compuesto de prueba sobre la adipogénesis.

Los compuestos de prueba incluyen, por ejemplo, proteínas (incluidos anticuerpos), mutéinas, polinucleótidos, aptámeros de ácido nucleico, hormonas (es decir, Irisina) y moléculas orgánicas pequeñas peptídicas y no peptídicas. Los compuestos de prueba pueden aislarse de fuentes naturales, prepararse sintéticamente o recombinantemente, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos particulares no limitantes de compuestos de prueba incluyen 2,4-dinitrofenol, efedrina, sibutramina, FGF21, ácidos biliares y agonistas de receptores adrenérgicos Beta-3.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan por referencia en su totalidad. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen en este documento.

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos. No deben interpretarse como limitantes del alcance o contenido de la divulgación de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Procesamiento de aislamiento de grasa marrón

En un ejemplo, un paciente primero se sometió a un ^{18}F – fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) PET-TC para identificar depósitos de grasa marrón. Antes de someterse a la exploración PET-CT, el paciente estuvo expuesto a temperaturas que oscilaban entre 1 °C y 25 °C (para aumentar la absorción de ^{18}F -FDG) durante 1 - 2 horas por día durante un período de un mes. Los depósitos identificados dentro del área cervical-supraclavicular y mediastínica se sometieron a biopsia con una aguja. Las biopsias de grasa marrón se lavaron tres veces en DPBS (-) y se trataron con colagenasa de 0.075 % - 0.2 % tipo 1A con agitación vigorosa a 37 °C durante 30 - 60 minutos o se trataron con EDTA durante 30 minutos y se sometieron a interrupción mecánica del tejido durante 5 - 30 minutos. El tejido/células se lavaron tres veces con DPBS (-), y se inyectaron 1×10^6 - 1×10^{10} células en depósitos de grasa blanca en el paciente. Opcionalmente, después del aislamiento enzimático o mecánico de tejido/célula, el tejido/células se expusieron a temperatura fría (0 °C - 4 °C) durante 1 - 48 horas antes de la inyección.

Ejemplo 2 - Cultivo de grasa parda

En este ejemplo, las células se cultivaron antes de la inyección en un paciente. Las células obtenidas a partir del Ejemplo 1 se colocaron en placas en matraces de hiper a una concentración de 1000 células /cm² en un medio de cultivo que comprende en esta realización:

DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol

5 0.5 - 20 % de lisado de plaquetas humanas

1X NEAA

1X Glutamax

1X Gentamicina

1000 unidades de heparina

10 Se cultivaron células durante 3-6 semanas. Luego, las células se caracterizaron por citometría de flujo y se analizaron para la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: SCA-1, CD34, SSEA1, SSEA4, OCT4, CD31, Wnt5a, actividad de telomerasa, alfa-SMA, STRO-1, MYF5, PRDM16 o UCP1. Las células se expandieron a concentraciones de 1×10^6 - 1×10^{10} para la implantación en depósitos de grasa blanca del paciente.

Ejemplo 3: diferenciación de células en células grasas marrones

15 En este ejemplo, las células (tales como células madre o precursoras de adipocitos marrones) obtenidas a partir de un depósito de grasa marrón de un paciente se diferenciaron y posteriormente e inyectaron en un paciente. Las células obtenidas a partir del Ejemplo 1 se sembraron a 1000 células/cm² en hiper matraces que contienen un medio de diferenciación que comprende, en esta forma de realización:

DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol

20 0.5 - 20 % de lisado de plaquetas humanas

1X NEAA

1X Glutamax

1X Gentamicina

1000 unidades de heparina

25 10 ug/mL de insulina

1 uM dexametasona

200 uM Indometacina

0.5 mM Isobutilmetilxantina

En una realización alternativa el medio de diferenciación incluyó:

30 DMEM (bajo en glucosa sin rojo fenol)

0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas;

1X NEAA;

1X Glutamax;

1X Gentamicina;

35 1000 unidades de heparina;

Isobutilmetilxantina 0.5 mM,

Indometacina 125 nM,

Dexametasona 5 uM,

Insulina 850 nM,

40 T3 1 nM,

Rosiglitazona 1 uM.

y las células se cultivaron en este medio durante 2-6 días seguido de una diferenciación adicional durante 6-21 días adicionales en medios compuestos por:

DMEM (bajo en glucosa sin rojo fenol);

- 5 0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas;
- 1X NEAA;
- 1X Glutamax;
- 1X Gentamicina;
- 1000 unidades de heparina;
- 10 Isobutilmetilxantina 0.5 mM,
- Indometacina 125 nM,
- Dexametasona 5 uM,
- Insulina 850 nM,
- T3 1 nM,
- 15 Rosiglitazona 1 nM
- FNDC5 20 nM.

- 20 Después de ser mantenido en el medio de diferenciación durante 10-30 días, las células se caracterizaron mediante la expresión de Efeotor A tipo DFF45 (CIDEA), desiodinaie Tipo II, Coactivador PPAR gamma (PGC)-1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4. 1×10^6 - 1×10^{10} de las células se preparan para inyección en el paciente.

Ejemplo 4: Cultivo y diferenciación de células madre embrionarias

- 25 En este ejemplo las células madre embrionarias de grado clínico se cultivaron y expandieron primero. Luego, las células se diferenciaron en pre-adipocitos de grasa marrón o adipocitos de grasa marrón completamente diferenciados exponiendo las células, en una realización, a los siguientes medios:

DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol

0.5 - 20 % de lisado de plaquetas humanas

1X NEAA

1X Glutamax

- 30 1X Gentamicina
- 1000 unidades de heparina
- Insulina 10 ug/ml
- Dexametasona 1 uM
- Indometacina 200 uM

- 35 Isobutilmetilxantina 0.5 mM

En otra realización, las células se cultivaron durante 2-6 días en un medio que comprende:

DMEM (bajo en glucosa sin rojo fenol);

0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas;

1X NEAA;

- 40 1X Glutamax;

1X Gentamicina;
1000 unidades de heparina;
Isobutilmetilxantina 0.5 mM,
Indometacina 125 nM,

- 5 Dexametosona 5 uM,
Insulina 850 nM,
T3 1 nM,
Rosiglitazona 1 uM.

A esto le sigue una diferenciación adicional durante 6-21 días adicionales en medios compuestos por:

- 10 DMEM (glucosa baja sin rojo fenol);
0.5 % - 20 % de lisado de plaquetas humanas;
1X NEAA;
1X Glutamax;
1X Gentamicina;

- 15 1000 unidades de heparina;
Isobutilmetilxantina 0.5 mM,
Indometacina 125 nM,
Dexametosona 5 uM,
Insulina 850 nM,

- 20 T3 1 nM,
Rosiglitazona 1 uM,
FNDC5 20 nM.

- 25 Opcionalmente, se transfectaron las células, antes de la diferenciación o después de la diferenciación, con un vector no viral (andamio/matriz región adjunto (S/MAR)) con un gen PRDM-16 por sí mismo o en tándem con BMP-7 o Efector tipo MYF-5 o DFF45 A (CIDEA), Desiodinaie tipo II, Coactivador PPAR gamma (PGC)-1 alfa, PGC-1 beta, proteína de desacoplamiento (por ejemplo, UCP1), PRDM16 o CIG30, PRDM-16, CYC1, NDUFA11, NDUFA13, CMT1A, ELOVL3, DIO2, LHX8, COX8A, CYFIP2, Cox8b, Glut4 o una combinación de ellos impulsados por un promotor fuerte como CAGGS o PGK. Luego, las células se inactivaron con un método basado en productos químicos, como mitomicina C o irradiación gamma, y se implantaron en un paciente a concentraciones de 1×10^6 - 1×10^{10} células.

- 30 Ejemplo 5 - Biopsia de depósito humano con grasa marrón

- 35 En este ejemplo, un paciente fue sometido a ^{18}F -PETCT escanear para identificar el tejido que tiene la actividad metabólica. Se identificó un área con alta actividad metabólica dentro de la región mediastínica humana del paciente. Además, este paciente debía someterse a una cirugía cardiotorácica de rutina. En el momento de la cirugía, la región estaba expuesta, y dentro de esta región se diseccionó un depósito de grasa marrón de 5 x 5 cm y se colocó en solución salina estéril.

- 40 Un depósito de grasa marrón fue descubierto en el mediastino que contiene una población de células madre que expresan marcadores únicos diferentes que los encontrados en otras células madre, incluyendo células madre aisladas de depósitos adiposos blancos. Estas células madre recientemente identificadas se separaron del depósito de grasa marrón mediastino y se cultivaron durante más de 20 pasajes y aún conservaron un cariotipo normal. Estas células también son capaces de sufrir adipogénesis (blanca y marrón), osteogénesis y condrogénesis.

Ejemplo 6 - Aislamiento de células de biopsia de depósito de grasa marrón humana

El depósito de grasa humana marrón aislado en el Ejemplo 5 se lavó 5-10 veces en solución salina estéril. La biopsia se cortó con unas tijeras hasta que las piezas tengan un tamaño aproximado de 0.1 - 0.5 cm. El material se lavó 3 veces por centrifugación a 1200 RPM durante 5 minutos. El material se digirió luego usando colagenasa o dispasa

durante no más de una hora en un baño de agua con agitación a 37 °C. Después de que se completó la digestión, la reacción enzimática se terminó agregando un volumen igual de medio completo. Luego se filtró el material usando un filtro de 100 µM y la suspensión de células individuales se lavó 3 veces con medio completo.

Ejemplo 7 - Cultivo de células aisladas de biopsia de depósito humano de grasa marrón

- 5 La suspensión de células individuales se describe en el Ejemplo 6 se sembró en matraces de cultivo celular a una concentración de 5.000 - 10.000 células/cm². Después de aproximadamente 3-6 días, las células estaban listas para pasar (Fig. 2). Las células después de someterse a más de 10 pases mostraron un cariotipo normal. El análisis por RT-PCR de las células de grasa marrón cultivadas demostró que eran positivas para CEBPB, UCP-1, UCP-2, PPARG, PGC-1, PRDM-16. Es importante tener en cuenta que las células aisladas de depósitos adiposos blancos fueron negativas para PRDM-16 y PGC-1. (Fig. 3). De acuerdo con lo anterior, la expresión de PRDM-16 y/o PGC-1 se puede usar para diferenciar entre células adiposas blancas y células adiposas marrones. Además, CEBPB, UCP-1, UCP-2, PPARG, PGC-1, PRDM-16 pueden usarse como marcadores para identificar células adiposas de color marrón.

- 15 La tinción de las células mostró que son positivas para los marcadores de células madre HCAM y CD90 (Figs. 4A y B). Las células expandidas también expresaron exosomas (Fig. 9). La citometría de flujo de la población celular demostró que las células eran negativas para los siguientes marcadores de superficie celular: CD34, CD19, CD86, HLA DR, Lin, CD106, CD80, CD 117. La población celular también era baja para SSEA4 y Stro-1. Las células fueron positivas para CD63, CD90, HLA ABC, CD105, CD73, CD166, CD 9, CD44 (Figs. 5A-F) que son marcadores de células madre adiposas marrones indiferenciadas.

Ejemplo 8 - Diferenciación de células en Adiposo (blanco y marrón)

- 20 Las células expandidas se sembraron en placas de cultivo celular y se suplementaron con medio de diferenciación adipogénica (Life Technologies). Los medios se cambiaron cada 3 días y se permitió que la diferenciación continuara durante 14 días. Después de 7 días en medios de inducción, las gotas de grasa eran visibles dentro del cultivo (Fig. 6), lo que indica que las células habían comenzado a diferenciarse en células adiposas.

La tinción con aceite rojo O demostró una diferenciación positiva en células adiposas (Fig. 7).

- 25 La identificación de gotas de grasa marrón positivas en la diferenciación se observó mediante la acumulación de gotas de grasa más pequeñas (Fig. 7B) en comparación con las encontradas en células diferenciadas de células derivadas de depósitos de grasa blanca, que producen gotas de grasa más grandes (Fig. 7A)

- 30 En otra realización las células madre se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 50.000 células/pozo. Se añadió medio de diferenciación de adipogénesis blanco o marrón. Para la adipogénesis marrón, se añadió FNDC5 6 días después de la inducción como se describió previamente. Se usó 0.3 % de aceite rojo O (Sigma Aldrich) para la tinción para detectar la acumulación de lípidos intracelulares.

Ejemplo 9 - Inducción condrogénica y osteogénica de células

- 35 Las células expandidas se sembraron en placas de cultivo celular y se suplementaron con medio osteogénico y condrogénico (Life Technologies). Los medios se cambiaron cada 3 días y se permitió que la diferenciación continuara durante 21 días. La confirmación de la diferenciación en condroblastos y osteoblastos se observó mediante la tinción de las células con rojo alizariano u anticuerpo de osteocalcina y azul alciano (figuras 8A y B). Estos datos indican que las células progenitoras aisladas de depósitos de grasa marrón mantienen la capacidad de diferenciarse en una variedad de tipos de células distintas del adiposo blanco o el adiposo marrón.

Ejemplo 10 - Uso terapéutico de células progenitoras de grasa marrón

- 40 Los ratones NOD-SCID son severamente inmunodeficientes y se usan como un sistema modelo para probar terapias basadas en células humanas. Los ratones se criaron con concentrado alto en grasas/carbohidratos durante todo el período de prueba. Los ratones se dividieron en dos grupos: 10 ratones no tratados sirvieron como controles y 10 ratones recibieron una única inyección subcutánea debajo de la piel dorsal de aproximadamente 1 millón de células progenitoras de grasa marrón humana cultivadas como se describe en los ejemplos 5 - 9. Los siguientes análisis se midieron durante cuatro meses después de la inyección: glucosa en plasma, triglicéridos, colesterol, leptina y adipón. El peso corporal también fue monitoreado. La línea de base es 23 +/- 5 g en el grupo control y 25 +/- 7 g en el grupo tratado. El grupo de control recibió una inyección simulada de solución portadora (DPBS) sin células.

- 50 En comparación con el grupo de control que recibió una inyección simulada de solución de vehículo solamente (DPBS) sin células, la cohorte experimental que recibió una dosis de 1,000,000 de células demostró una disminución en la glucosa en plasma, triglicéridos, colesterol, y la ganancia de peso durante un Período de seguimiento de cuatro meses. Los niveles de adiponectina y leptina también se correlacionaron con niveles mejorados debido a que recibió la dosis celular. Esto está en marcado contraste en comparación con los ratones de control no tratados que recibieron la solución portadora simulada (Figs. 10 - 12).

Equivalentes

Ha de entenderse que, aunque la divulgación se ha descrito en conjunción con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una célula grasa marrón, el método comprende:
aislar una célula madre de un tejido graso marrón obtenido; y
cultivar la célula madre en un medio de diferenciación que no comprende un producto de origen animal, en el que el medio de diferenciación comprende insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina, indometacina, triyodotironina (T3), rosiglitazona, proteína 5 que contiene dominio de fibronectina tipo III (FNDC5), y 0.5 a 20 % de lisado de plaquetas humano:
generar así la célula de grasa marrón,
en el que la célula madre es positiva para uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD63, CD90, HLA ABC, CD105, CD73, CD166, CD9, CD44 y
en el que la célula madre es negativa para uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD34, CD19, CD86, HLA DR, Lin, CD106, CD80, CD117.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de diferenciación comprende además un anticoagulante seleccionado de un grupo que consiste en heparina y ácido-citrato dextrosa.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además exponer la célula de grasa marrón en el medio de diferenciación a condiciones hipóxicas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de diferenciación comprende 10 a 20 % de lisado de plaquetas humano.
5. Un método para identificar un compuesto que modifica la actividad metabólica de una célula de grasa marrón, el método comprende:
aislar una célula madre de un tejido de grasa marrón obtenido;
cultivar la célula madre en un medio de diferenciación que no comprende un producto de origen animal, en el que el medio de diferenciación comprende insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina, indometacina, triyodotironina (T3), rosiglitazona, proteína 5 que contiene dominio de fibronectina tipo III (FNDC5) y 0.5 a 20 % de lisado de plaquetas humanas, generando así la célula de grasa marrón humana;
poner en contacto la célula grasa marrón con el compuesto; determinar la actividad metabólica de la célula de grasa marrón en presencia del compuesto; y comparar la actividad metabólica de la célula de grasa marrón humana en presencia del compuesto con la actividad metabólica de la célula de grasa marrón en ausencia del compuesto,
en el que la diferencia entre la actividad metabólica de la célula de grasa marrón en presencia del compuesto y la actividad metabólica de la célula de grasa marrón en ausencia del compuesto identifica los compuestos que modifican la actividad metabólica de la célula de grasa marrón,
en el que la célula madre es positiva para uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD63, CD90, HLA ABC, CD105, CD73, CD166, CD9, CD44, y
en el que la célula madre es negativa para uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD34, CD19, CD86, HLA DR, Lin, CD106, CD80, CD117.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la determinación de la actividad metabólica de la célula de grasa marrón en presencia del compuesto comprende medir la adipogénesis.
7. El método de la reivindicación 5, en el que la determinación de la actividad metabólica de la célula de grasa marrón en presencia del compuesto comprende medir la expresión génica de al menos un marcador de adipogénesis seleccionado de un grupo que consiste en: dominio PR que contiene 16 (PRDM16), proteína morfogenética ósea 7 (BMP7), proteína de desacoplamiento 1 (UCP1), proteína de desacoplamiento 2 (UCP2) o factor miogénico 5 (MYF5).
8. El método de la reivindicación 5, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en proteína, anticuerpo, péptido, muteína, polinucleótido, aptámero de ácido nucleico, hormona, molécula orgánica pequeña de péptido y molécula pequeña no peptídica.
9. Un método para diferenciar una célula madre en una célula grasa marrón, el método comprende:
poner en contacto una célula madre aislada con un medio de diferenciación que no comprende un producto de origen animal, generando así la célula grasa marrón, en el que el medio de diferenciación comprende insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina, indometacina, triyodotironina (T3), rosiglitazona, proteína 5 que contiene el dominio de fibronectina tipo III (FNDC5) y 0.5 a 20 % de lisado de plaquetas humanas;

en el que la célula madre es positiva para uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular: CD63, CD90, HLA, ABC, CD105, CD73, CD166, CD9, CD44, y

en el que la célula madre es negativa para una o más de las siguientes células marcadores de superficie: CD34, CD19, CD86, HLA DR, Lin, CD106, CD80, CD117.

5 10. El método de la reivindicación 9, en el que la célula de grasa marrón expresa el dominio PR que contiene 16 (PRDM-16), coactivador receptor-gamma activado por proliferador de peroxisomas (PGC-1), o una combinación de los mismos.

11. Un método para diferenciar una célula madre en una célula de grasa marrón, el método comprende:

10 poner en contacto la célula madre con un primer medio de diferenciación que no comprende un producto de origen animal, en el que el primer medio de diferenciación comprende insulina, dexametasona, isobutimetilxantina, indometacina, triyodotironina (T3), rosiglitazona y lisado de plaquetas humano del 0.5 al 20 %;

15 poner en contacto la célula madre con un segundo medio de diferenciación que no comprende un producto de origen animal, en el que el segundo medio de diferenciación comprende insulina, dexametasona, isobutimetilxantina, indometacina, triyodotironina (T3), rosiglitazona, proteína 5 que contiene dominio de fibronectina tipo III (FNDC5), y 0.5 a 20 % de lisado de plaquetas humanas;

generando así una célula grasa marrón.

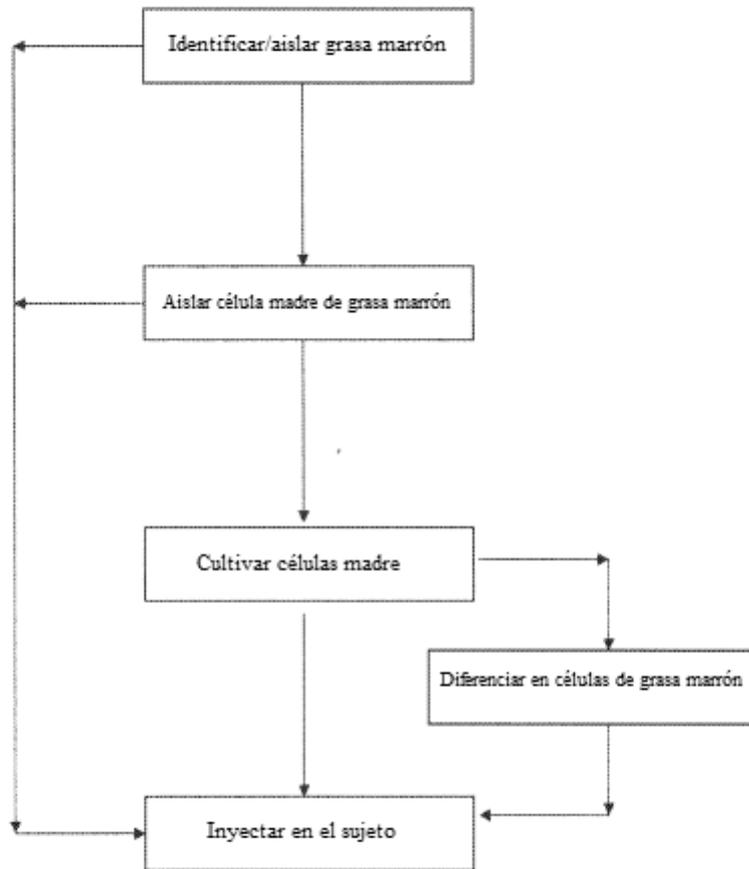


FIG. 1

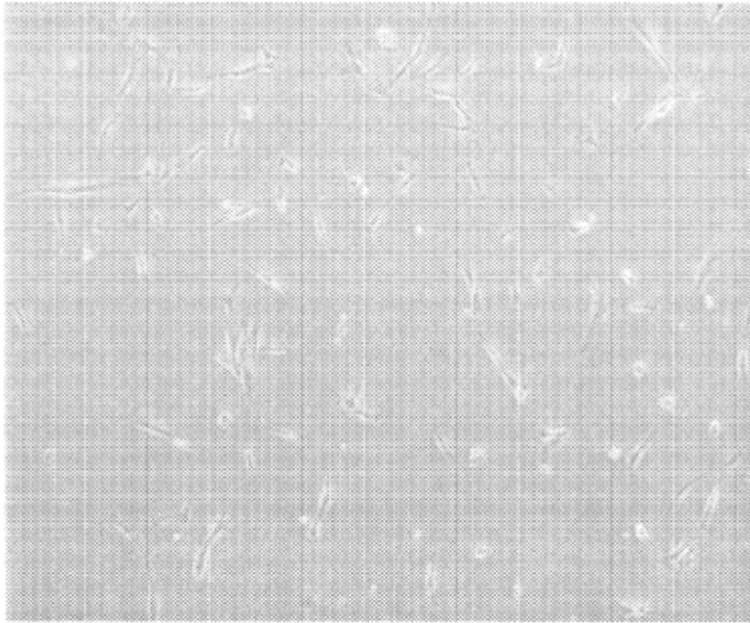


FIG. 2

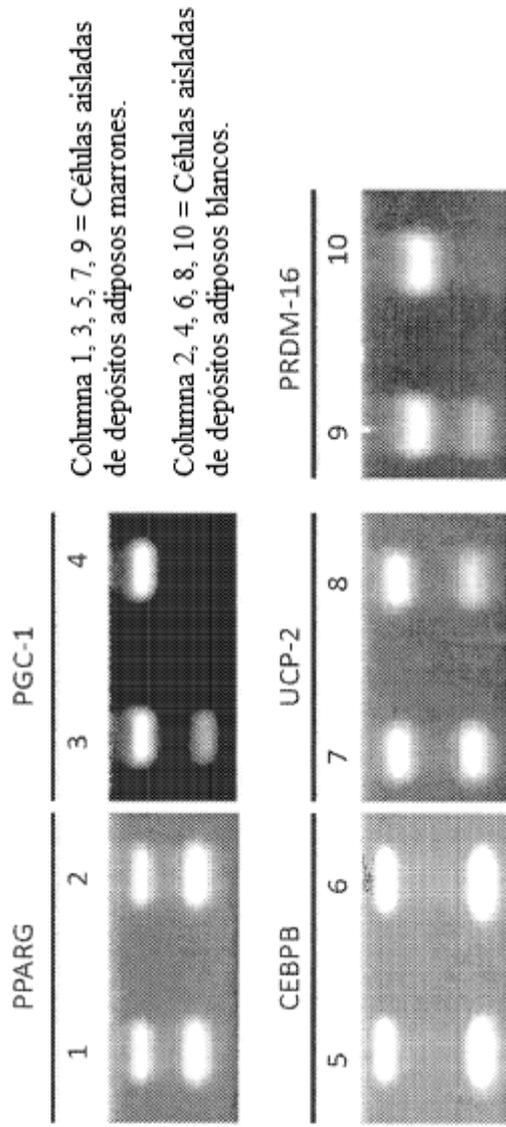


FIG. 3

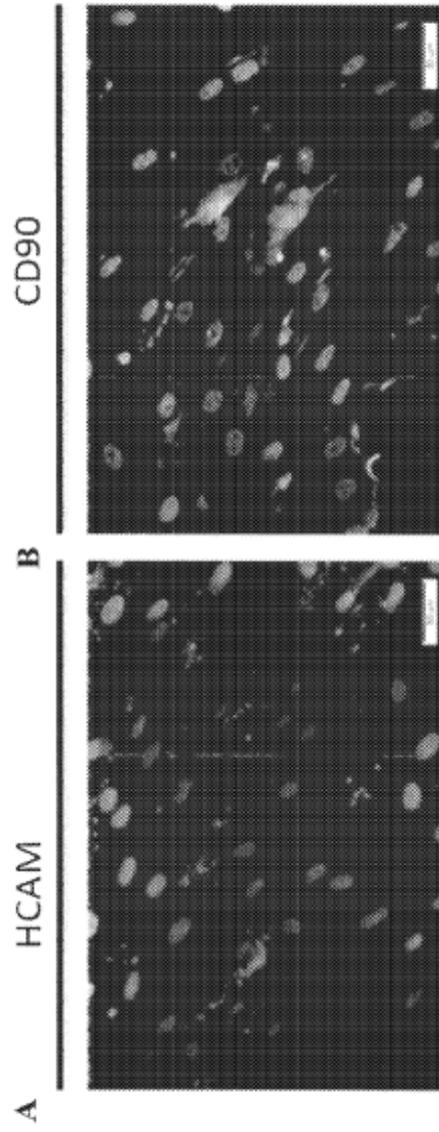


FIG. 4

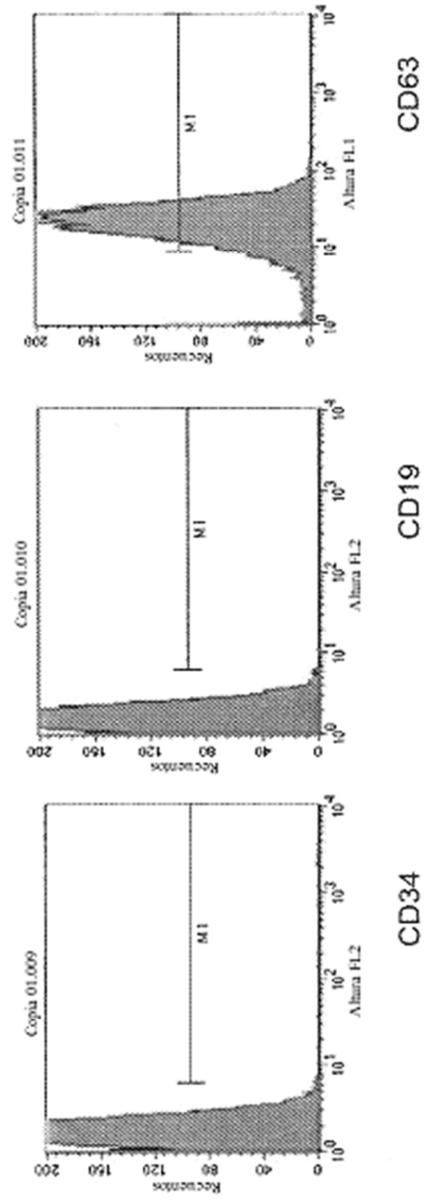


FIG. 5A

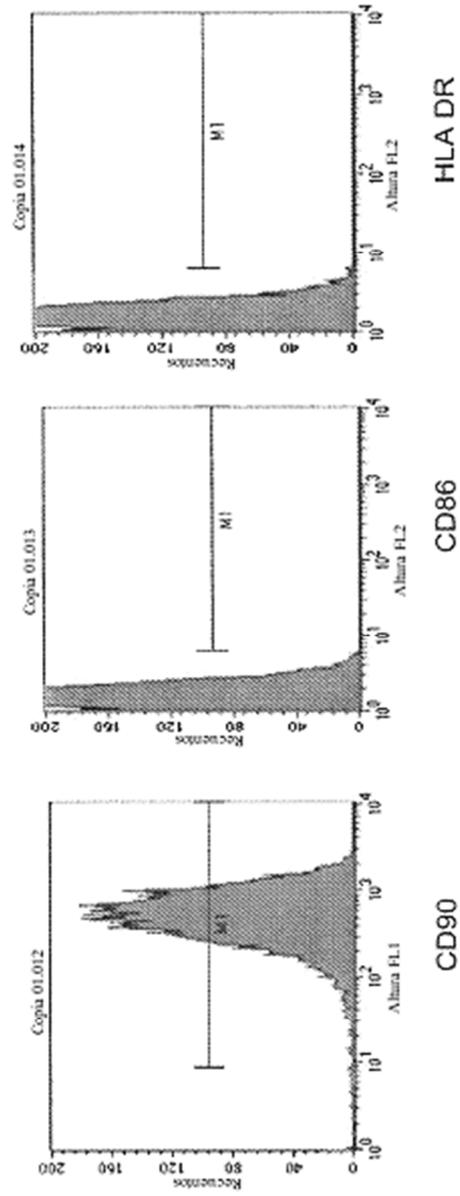


FIG. 5B

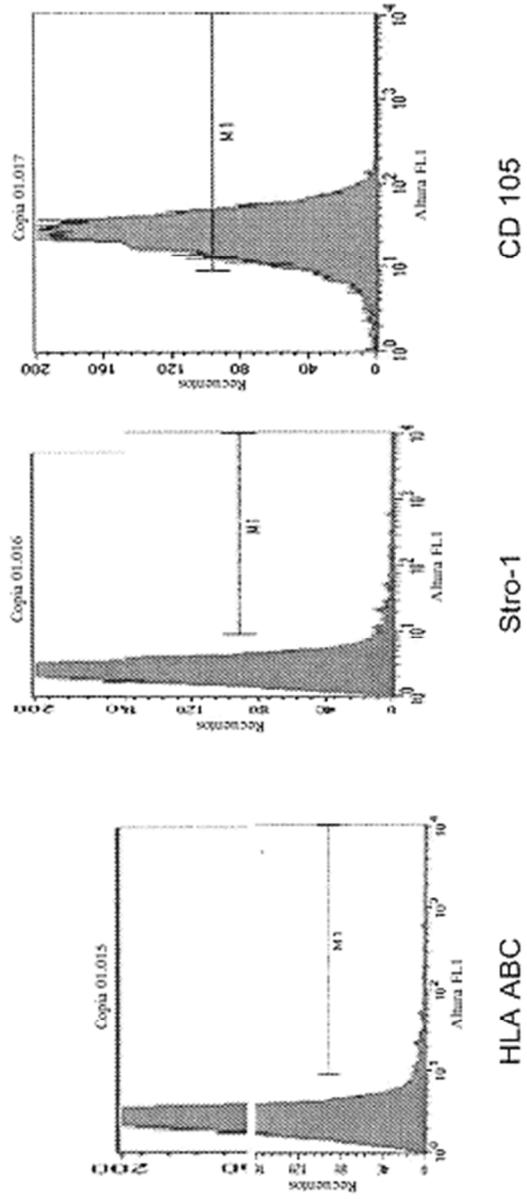


FIG. 5C

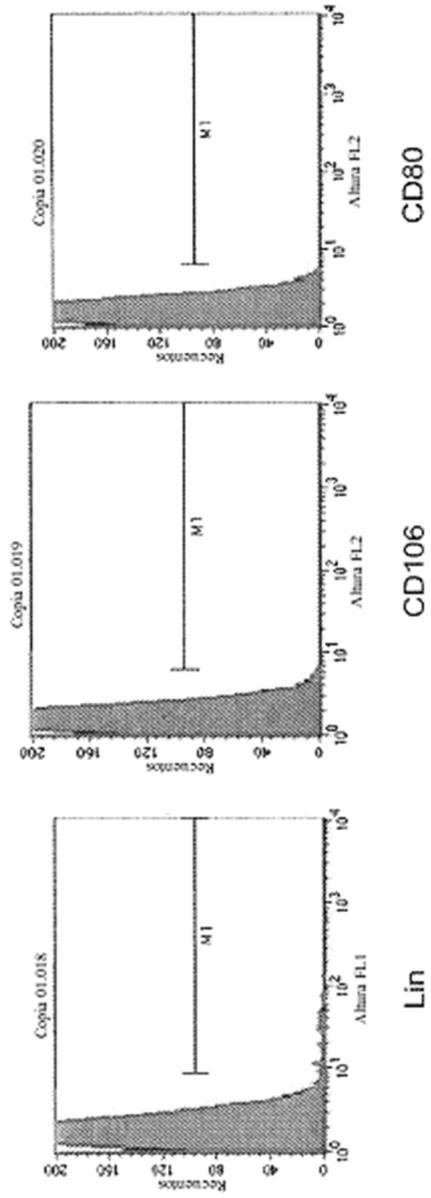


FIG. 5D

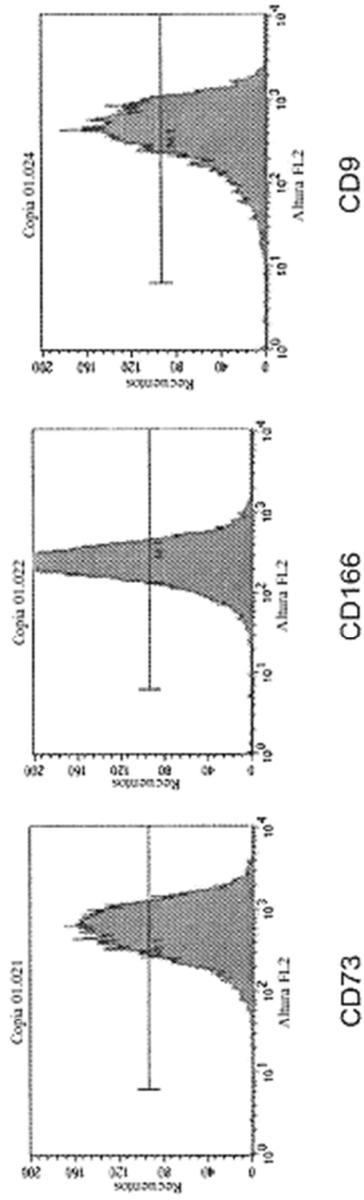


FIG. 5E

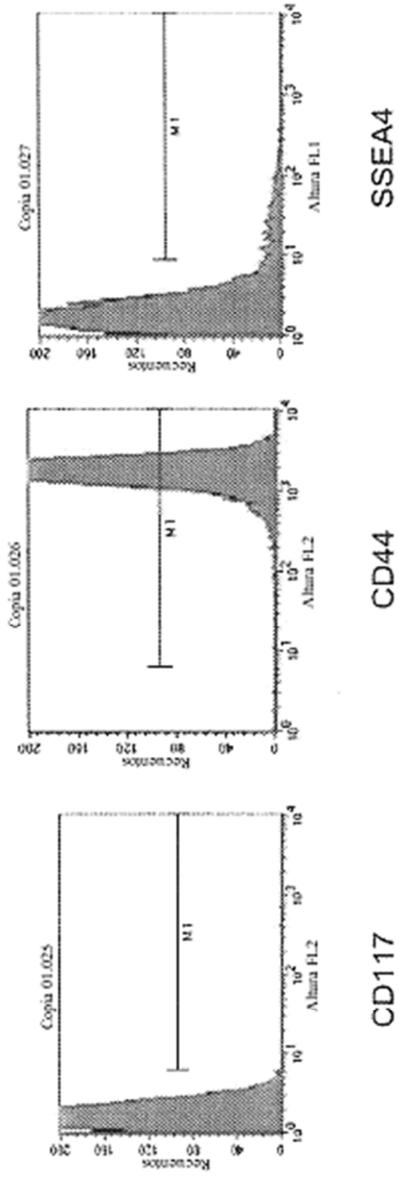


FIG. 5F



FIG. 6

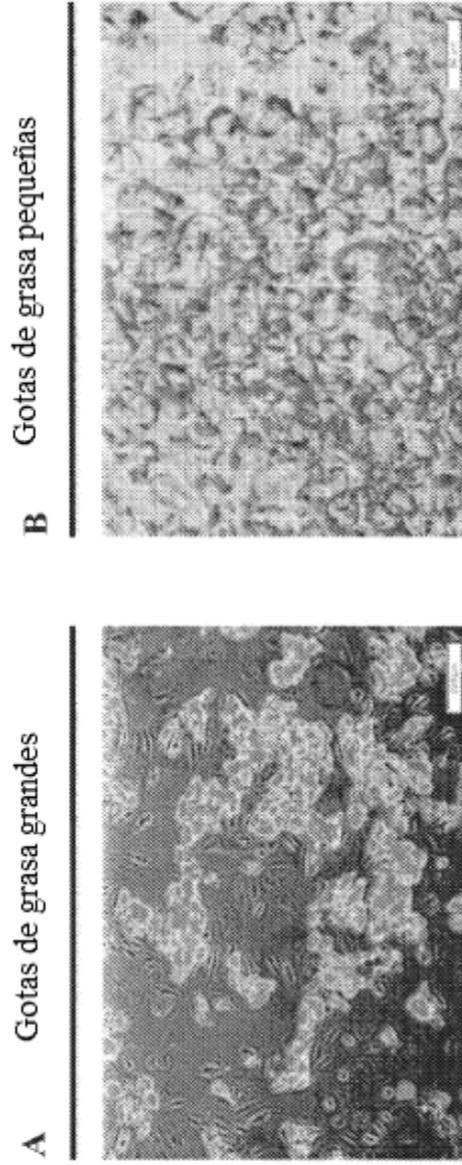


FIG. 7

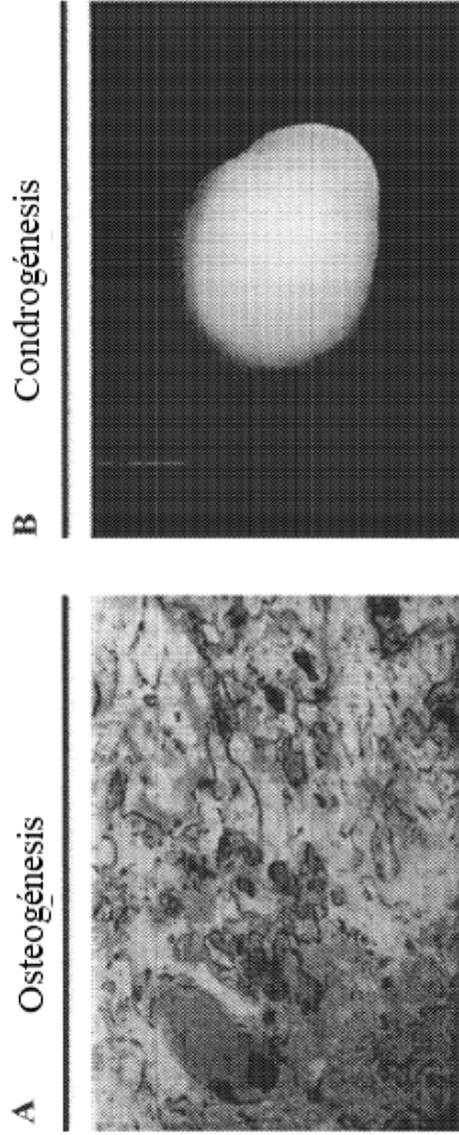


FIG. 8

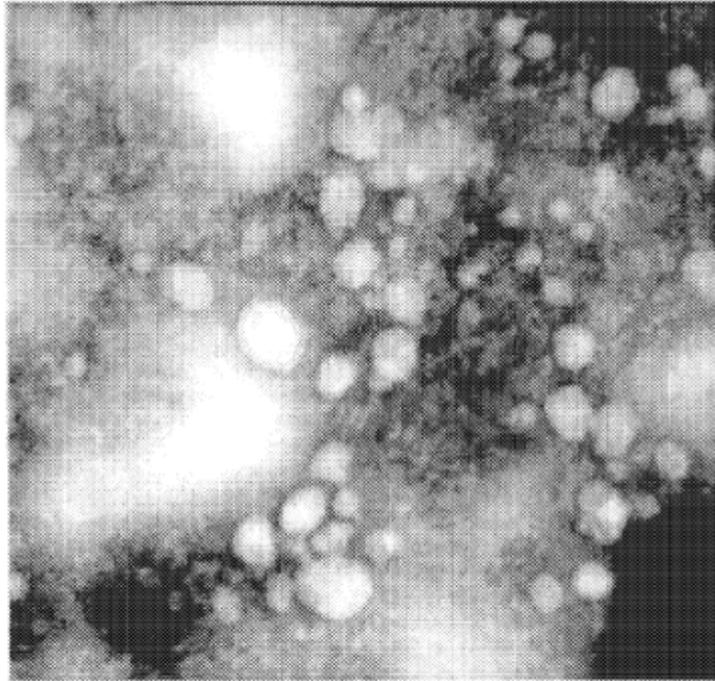


FIG. 9

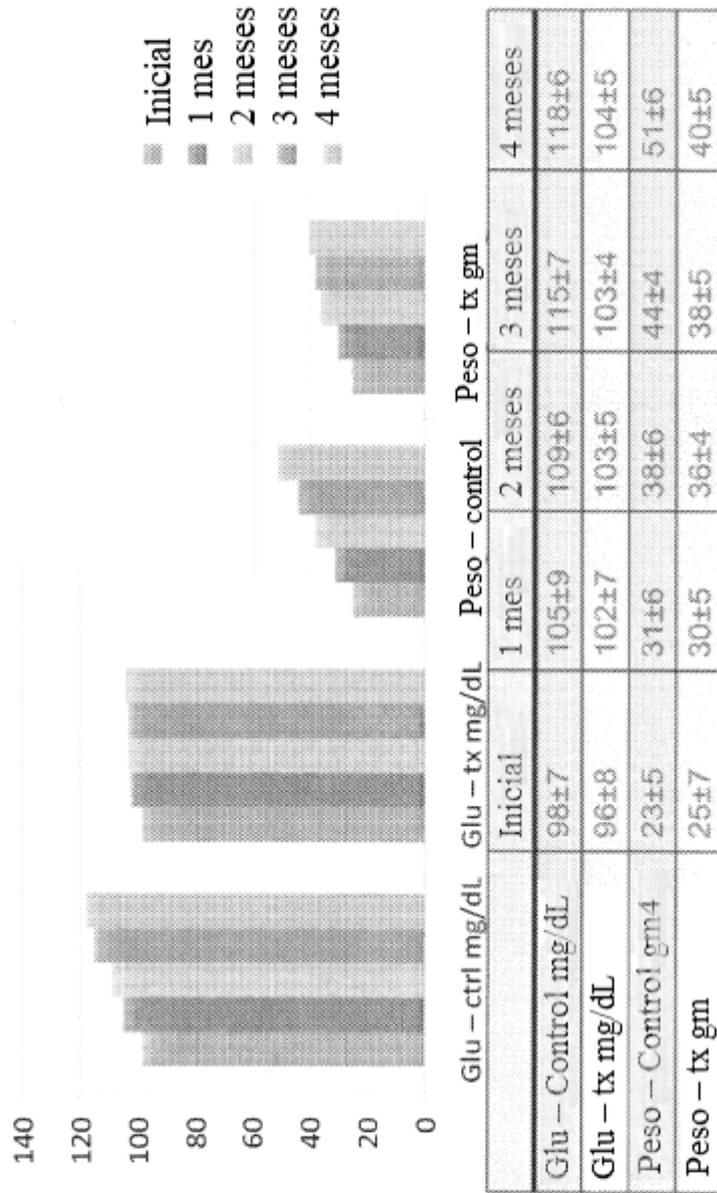


FIG. 10

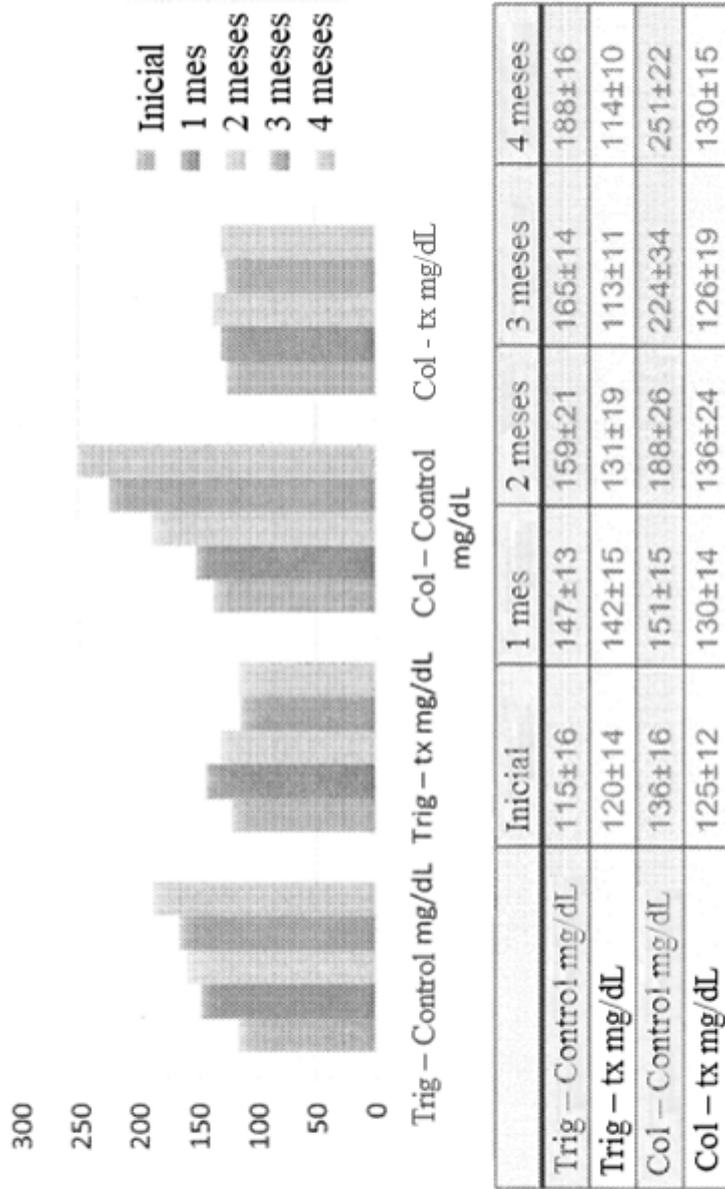


FIG. 11

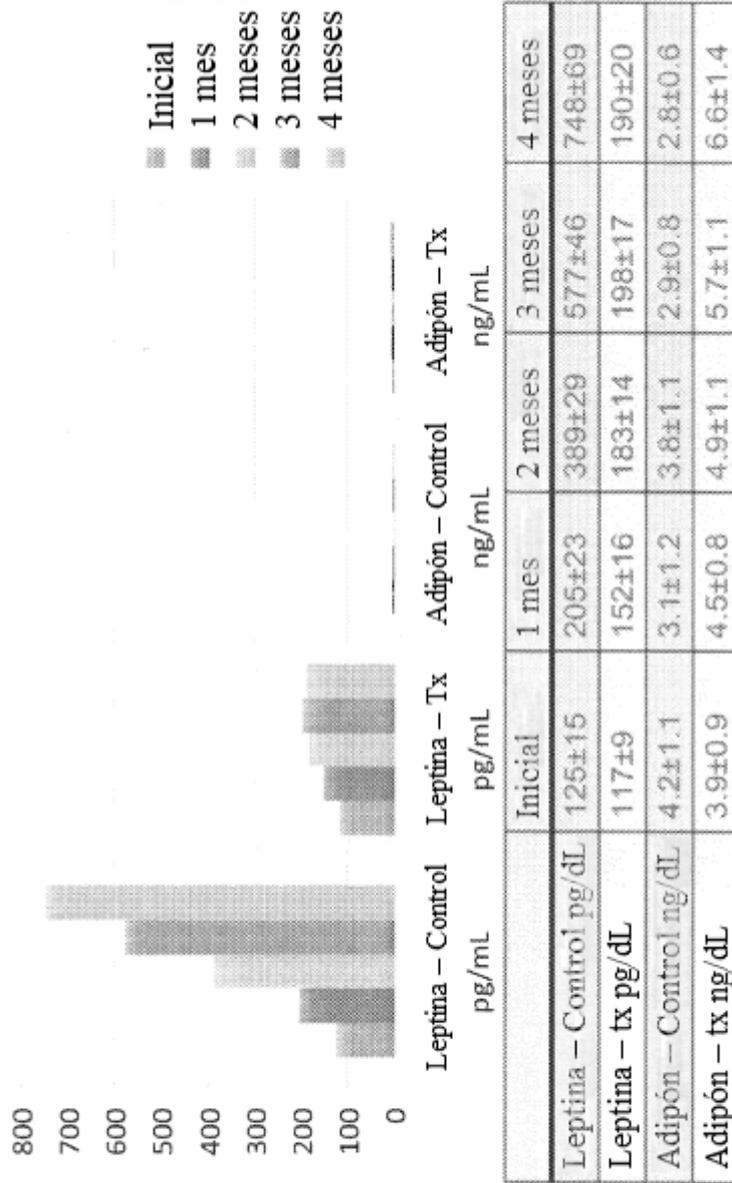


FIG. 12