



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 245 879**

⑫ Número de solicitud: 200401227

⑬ Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **21.05.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2006**

Fecha de la concesión: **29.11.2006**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2006**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.12.2006

⑲ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑳ Inventor/es: **Becerra Ratia, José;**
Andrades Gómez, José Antonio;
Cifuentes Rueda, Manuel y
Guerado Parra, Enrique

㉑ Agente: **Carpintero López, Francisco**

㉒ Título: **Composición para la reparación ósea o cartilaginosa.**

㉓ Resumen:

Composición para la reparación ósea o cartilaginosa que comprende un conjunto de células madre mesenquimáticas humanas, diferenciadas hacia el linaje condroosteogénico mediante su amplificación con suero humano y un factor de crecimiento transformante beta 1 con un dominio molecular de unión al colágeno I (TGF- β 1-DUC) obtenido en sistemas de expresión eucarióticos, y un material biocompatible al que se absorben las células así procesadas. Esta composición puede usarse mediante implantes en la zona a reparar o directamente por inyección de las células en suspensión, bien en el lugar de la lesión o incluso en la circulación sistémica para procurar su distribución generalizada.

ES 2 245 879 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Composición para la reparación ósea o cartilaginosa.

5 Campo de la técnica

La presente invención tiene su aplicación dentro de la industria biomédica dedicada a la fabricación de agentes que intervienen en la reparación esquelética y, más concretamente, en los procesos de reparación de cartílago y hueso de cualquier etiología, fusiones o artrodesis espinales, osteosíntesis, prótesis para artroplastias, osteoporosis, etc., y cualesquiera otros que precisen reparación o regeneración de tejidos óseo o cartilaginoso y en los que un aporte suplementario de células en diferenciación suponga una ayuda efectiva para la consecución de la reparación tisular de que se trate.

Estado de la técnica anterior

La regeneración tisular es un proceso complejo que supone la culminación del trabajo de una gran variedad de células que, o estaban presentes, o han sido reclutadas en el lugar de la lesión. Todos los sucesos que ocurren en el proceso reparador son guiados por una serie de interacciones entre factores de crecimiento y citoquinas, células y las moléculas que constituyen la matriz extracelular.

En el hueso coexisten una variedad de señales inductoras y de factores de crecimiento que incluye TGF- β , PDGF, BMPs, IGFs y FGFs (Becerra y col. Med Clin 2001; 116:23-34.). De todos ellos, sólo las BMPs son osteoinductores, sin embargo todos se ven implicados en la reparación de una fractura determinada (Reddi Nature Medicine 1998, 3: 837-839; Groeneveld y Burger Eur J Endocrinol 2000; 142:9-21) También en el hueso existen células precursoras osteogénicas que responden al estímulo de la fractura, activándose y produciendo BMPs que inducen la migración de células madre mesenquimáticas (CMMs), las cuales proliferan y se diferencian en células formadoras de hueso (Guerado y col. Rev Ortop Traumatol. 2003; 47, 362-374). No obstante, el conocimiento de la compleja interrelación entre las células madre mesenquimáticas y las precursoras osteoprogenitoras con las señales bioquímicas que modulan su migración, proliferación y diferenciación hacia el linaje osteogénico, presenta todavía importantes lagunas.

Los TGF- β s constituyen un grupo de factores de crecimiento, codificados por una familia génica que se expresa en numerosos tejidos y especies (Kingsley Genes Dev; 1994; 8: 133-146; Bostrom y Asnis, Clin Orthop Relat R, 1998; 355S: 124-131). El hueso fue uno de los primeros tejidos en los que se observó la producción local de un TGF- β con capacidad para regular la función celular (Centrella y col. J Bone Joint Surg 1991; 73-A: 1418-1428). Aunque la fuente principal de TGF- β son las plaquetas, el hueso es el depósito más importante, 100 veces mayor que la de otros tejidos blandos, donde también existe una presencia compartida de BMPs (Roberts y col. Biochemistry 1983; 22:5692-5698).

En los últimos años se han obtenido importantes resultados, a veces contradictorios, cuando se añade TGF- β a células osteoblásticas en cultivo. Su efecto mitogénico u osteodiferenciador, o lo contrario, se ha achacado a heterogeneidad celular en los cultivos, presencia de otros factores de crecimiento, densidad celular, condiciones de cultivo o a un posible efecto bifásico del factor (Noda y col., Endocrinology 1988; 124: 612-617; Stein y Lian, Cellular and Molecular Biology of Bone. San Diego: Academic Press; 47-95 1993). Estudios recientes consideran también la posible existencia de células diana diferentes para TGF- β o BMPs: mientras que los primeros parecen actuar sobre células madre ya comprometidas en el linaje osteogénico, las BMPs pueden actuar sobre células no comprometidas (Ballock y col., J. Orthop. Res. 1997; 15:463-467). En cualquier caso, parece claro que las CMMs son capaces de auto-renovación y amplificación en presencia del TGF- β 1 (Andrades y col., Cells. Exp Cell Res, 1999; 250: 485-498).

Para controlar la biodisponibilidad y asegurar la presencia con cierto control de TGF- β 1 en cultivos de CMMs, recientemente se ha desarrollado un procedimiento experimental por el que, a partir de médula ósea de rata, se ha podido aislar, amplificar e inducir hacia el linaje osteogénico, una población de células, cuando se las cultiva en geles de colágeno, en presencia de un TGF- β 1 con un dominio molecular de unión específica al colágeno I. Se ha propuesto que el dominio de unión al colágeno permite una lenta liberación del factor activo dentro del gel al que está unido, alargando su vida media y mejorando su disponibilidad para actuar sobre las células diana (Andrades y col. Cells. Exp Cell Res, 1999; 250: 485-498).

Es un hecho comprobado que la capacidad de regeneración ósea disminuye con la edad. Mientras el número de células madre hematopoyéticas de la médula ósea permanece a lo largo de la vida, las CMMs de la misma disminuyen enormemente, además de apreciarse una cierta dificultad de progreso por falta de factores osteoinductores o por incapacidad de las propias células para producirlos o responder a ellos (Haynesworth y col., Musculoskeletal Soft-Tissue Aging: Impact on Mobility. Section 1, Chapter 7. Rosemont: AAOS, 80-86, 1994). Es deseable, por tanto, desarrollar procedimientos que posibiliten la selección de CMMs de individuos afectados de incapacidad de reparación ósea, su amplificación *in vitro* y su capacitación hacia el linaje osteogénico.

Realizado fehacientemente lo anterior, es preciso transferir las células así tratadas hasta los lugares donde el paciente necesita de reparación esquelética, vehiculizándolas con el biomaterial adecuado, desarrollando así una suerte

de terapia celular autóloga que permita establecer con eficacia la función osteo-reparadora perdida o seriamente comprometida. De esta forma se evitan, además, los efectos indeseables de la inyección sistémica o local de factores bioactivos, cuyo control más allá del lugar de reparación, de momento, presenta dificultades y cuyos efectos pleiotrópicos son una amenaza que no debe ser obviada.

En cualquier caso, el trasplante de células capacitadas debe hacerse sobre un microambiente que propicie la osteogénesis, cuando la consolidación de dos o más fragmentos óseos es lo que se requiere. En este sentido cuando el foco fracturario o de no consolidación (pseudoartrosis) se caracterice por ser hipervascular con proliferación de tejido condro-osteogénico (no unión o pseudoartrosis hipertrófica), la simple estabilización rígida no dinámica del foco mediante implantes intra o extramedulares debe propiciar la consolidación. En estos casos, el trasplante de células capacitadas hacia linaje osteogénico sobre un transportador ("carrier") de hidroxiapatita o colágeno encuentra un lecho hipervascular y estable tras la osteosíntesis, microambiente ideal para el desarrollo del callo osteogénico. En los casos de no consolidación o pseudoartrosis atrófica es preciso extirpar el tejido fibroso interpuesto entre los fragmentos, dejando hueso con hueso y buscar una fuente vascular mediante perforaciones óseas y cubrimiento con tejido vascularizado (generalmente músculo). Ambos fragmentos tienen que estabilizarse mediante osteosíntesis rígida que evite la movilidad en la interfaz ósea, ya que en caso de movimiento en la interfaz, se destruirá e impedirá la proliferación vascular, así como se estimulará la expresión de mediadores químicos que inducen condrogénesis en vez de osteogénesis (Rüedi y Murphy, AO Principles of fracture management. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 2000; Browne y col., Skeletal Trauma, Basic Science, Management, and Reconstruction. Philadelphia, Saunders, 2003).

Es deseable también, desarrollar procedimientos para incrementar la capacidad de formación de masa ósea en individuos osteoporóticos, por procedimientos que supongan actuar en el desequilibrio existente en estos pacientes entre la formación y la reabsorción ósea, en perjuicio de la primera. La inyección sistémica de células capacitadas *in vitro* hacia el linaje osteogénico permitirá equilibrar esta ecuación.

Explicación de la invención

La presente invención tiene una evidente aplicación para la preparación de agentes y composiciones que sirven para la reparación esquelética, y más concretamente en los procesos de reparación de cartílago, hueso, osteoporosis, prótesis para artroplastias, etc., que pueden inyectarse *in situ* en pequeñas fracturas que no unen o en lesiones cartilaginosas, en la circulación sistémica de individuos osteoporóticos o implantarse adsorbidas en el biomaterial adecuado (colágeno, hidroxiapatita, etc) para promover la formación de cartílago o hueso en lesiones de cierta entidad. Así mismo pueden adsorberse en la hidroxiapatita (periapatita) que recubre a las prótesis para artroplastias de cadera, rodilla, etc, para facilitar la integración biológica de dichas prótesis en el huésped, alargando la vida de las mismas. Estos preparados pueden emplearse también en artrodesis del raquis para promover las fusiones espinales y mejorar la eficiencia de tales operaciones realizadas por los procedimientos habituales con autoinjerto o hueso de banco.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, ésta proporciona un método para aumentar la formación de hueso y/o cartílago en un humano con necesidad de ello mediante la administración a éste de células madre mesenquimáticas humanas, diferenciadas hacia el linaje condroosteogénico mediante su amplificación con suero humano y un factor de crecimiento transformante beta 1 con un dominio molecular de unión al colágeno I (TGF- β 1-DUC) obtenido en sistemas de expresión eucarióticos.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la administración de dichas células capacitadas se realiza mediante inyección *in situ*, en la circulación sistémica o mediante implantes, adsorbidas en el biomaterial adecuado. De modo preferido se realiza mediante el empleo de implantes, adsorbidas las células en el material adecuado, siendo aún más preferido el empleo de hidroxiapatita reabsorbible, con un 50% de porosidad, cámaras de difusión o géles de colágeno.

En una realización preferida de la presente invención, las CMMs humanas han sido ayudadas en su inducción hacia el linaje condroosteogénico utilizando un glucocorticoide. Siendo preferido el empleo de dexametaxona. De un modo aún más preferido, esta inducción se realiza en presencia de dexametaxona y β -glicerofosfato.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, el factor de crecimiento transformante beta 1 fusionado con un dominio molecular de unión al colágeno I se ha expresado en sistemas de expresión eucarióticos. De modo preferido se realiza la expresión empleando células de insecto, y aún más preferido es el empleo de células de insecto transfectadas con *baculovirus*.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de capacitación *in vitro* de células condroosteogénicas a partir de CMMs humanas, el cual comprende las siguientes etapas:

- el cultivo primario de las células madre en un medio suplementado con suero humano y un factor de crecimiento transformante beta 1 con un dominio molecular de unión al colágeno I (TGF- β 1-DUC);
- posterior amplificación mediante la suplementación con suero humano y TGF- β 1-DUC;
- la inducción condro-osteogénica con dexametaxona y β -glicerofosfato.

Las CMMs humanas pueden obtenerse de diferentes tejidos y localizaciones del propio paciente, así como de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica o de la masa interna de blastocistos humanos congelados.

5 En una realización preferida de dicho procedimiento de capacitación, el factor de crecimiento transformante beta 1 fusionado con una dominio molecular de unión al colágeno I se ha expresado en sistemas de expresión eucarióticos. De modo más preferido se emplean células de insecto para la expresión. Siendo aún más preferido el empleo de células de insecto transfectadas con *baculovirus*.

10 De acuerdo con otra realización preferida, el cultivo primario se realiza en un gel de colágeno tipo I humano.

Según otra realización preferida, la selección de las CMMs de la médula ósea se realiza en un cultivo suplementado con una cantidad entre el 0,1 y el 1% de suero humano, preferiblemente el 0,5%.

15 Según una realización preferida, la amplificación tiene lugar durante un periodo comprendido entre 1 a 25 días, durante los que el medio de cultivo se suplementa con una cantidad entre el 5% y el 25% de suero humano, preferiblemente el 20%.

20 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, ésta proporciona células con capacidad condroosteogénica obtenibles de acuerdo con el procedimiento de capacitación anterior, que comprende la selección, amplificación e inducción condroosteogénica de las CMMs.

25 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de las células con capacidad condroosteogénica obtenibles de acuerdo con el procedimiento de capacitación anterior, en la preparación de una composición para la reparación ósea y/o cartilaginosa en humanos.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición capaz de inducir osteogénesis que comprende un material biocompatible y osteoconductor, y un conjunto de células con capacidad condroosteogénica obtenibles según el procedimiento de capacitación anterior.

30

Breve descripción de los dibujos

Figura 1.- a) Células de MO cultivadas *in vitro* 10 días en gel de colágeno, en presencia de rhTGF- β 1-DUC. Se observan escasas células aisladas. Células de MO cultivadas 35 días en gel de colágeno (b y c), en presencia de rhTGF- β 1-DUC e inducidas con dexametasona y β -glicerofosfato, respectivamente. Se observa una mayor densidad de células y algunas colonias de las mismas. x60.

Figura 2.- En a) se muestran radiografías de cuatro cámaras de difusión tras el periodo de implantación en el tejido subcutáneo de la rata. Las distintas densidades indican diferente calidad y cantidad de tejido neoformado. b) Muestra una sección histológica de una cámara tras el periodo de implantación, en la que se pusieron células cultivadas en condiciones de control, sin rhTGF- β 1-DUC; su interior está lleno de material más o menos fibroso, sin que se encuentren acúmulos de tejido condro-osteóide (asterisco, filtro de la cámara). Rojo sirio-hematoxilina. x10. c) Aspecto que presenta la sección de una cámara a baja magnificación, en la que se pusieron células procesadas *in vitro* en presencia de rhTGF- β 1-DUC, en la que se detectan varias condensaciones de tejido neoformado (flechas) junto a los filtros (asterisco) que destacan del resto. Rojo sirio-hematoxilina. x10. d) Detalle de uno de esas condensaciones donde se distinguen dos clases de tejido, uno con aspecto cartilaginoso (círculo lleno), poco teñido, y otro intensamente teñido con aspecto osteóide (círculo vacío). Por fuera del tejido pálido se observan unas fibras más teñidas que semejan un pericondrio (flechas). Rojo sirio-hematoxilina. x40. e) Sección paralela a la anterior, teñida con tricrómico de Goldner que muestra de color azul intenso (círculo vacío) el tejido mas denso (osteóide) y en color pálido lo que se asemeja a cartilago (círculo lleno). Rodeando el acúmulo aparecen unas fibras azuladas que parecen constituir una capa de pericondrio (flechas). x40. f) Cuando se colorea otra sección paralela con Azul alciano, el tejido cartilaginoso aparece de color azul (círculo lleno), mientras que el osteóide aparece sin color (círculo vacío), así como el pericondrio. x40. Estos hechos son congruentes con una neo-formación condro-osteóide. Tanto el Rojo sirio como el tricrómico tiñen intensamente el colágeno, sobre todo el del tipo I, propio del tejido óseo y el pericondrio, mientras que el Azul alciano tiñe los restos ácidos y sulfatados de los proteoglucanos, abundantes en la matriz cartilaginosa.

Figura 3.- Secciones de tejido formado en el lugar donde se practicaron los implantes de hidroxiapatita con células procesadas como se indica en el texto. Dado que el material se descalcificó antes de ser cortado y coloreado, los espacios vacíos (asteriscos) corresponden a las paredes de las trabéculas de hidroxiapatita. Los huecos entre dichas paredes ahora se encuentran llenos de un tejido que puede denominarse medular (círculos llenos), mientras que adosado a dichas trabéculas aparecen unas láminas finas de tejido neoformado (flechas). En a) se observa cómo el tejido que tapiza las paredes de la hidroxiapatita se ha es abundante en colágeno (rojo intenso con el Rojo sirio) (flechas), como se demuestra por la birrefringencia que aparece en b) al iluminar la misma sección con luz polarizada. Ese colágeno resulta ser del tipo I, como lo demuestra la positividad (flechas) que aparece cuando se tratan estos cortes de tejido con el antisuero anti-colágeno I, mostrado en c). x20. En d) se muestra, con mayores aumentos, que el nuevo tejido tiene células en su interior a modo de osteoblastos que quedan atrapados en la matriz que ellos mismos van sintetizando (Tricrómico de Goldner). El nuevo tejido se presenta con una coloración roja (tejido más maduro) o verdosa (tejido

inmaduro). X40. En e) se presenta una sección de una zona próxima a la hidroxiapatita implantada (asteriscos) donde puede observarse que varias trabéculas de tejido del huesped presentan nuevas aposiciones de hueso joven de color verde-azulado, lo que indica cierta actividad osteogénica, no sólo donde pusimos la HA, sino también en los alrededores, lo que indica una “cierta osteoinducción a distancia” provocada, probablemente, por las células que “difunden” de la HA (Tricrómico de Goldner). x20. Por el contrario, en f) se muestra la sección de una zona del mismo hueso del huesped, alejada de donde fueron colocadas los fragmentos de HA, donde se ve que las trabéculas óseas no muestran adición de tejido nuevo, y por tanto que la osteoinducción no fue mucho más allá de la zona de los implantes. x20.

10 Ejemplos

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Diseño y obtención de la proteína recombinante de fusión humana TGF- β 1 con un dominio de unión al colágeno I (rhTGF- β 1-DUC)

El ADNc para el gen de TGF- β 1 se obtuvo mediante RT-PCR, usando una ADN-polimerasa con capacidad de corrección. Como molde se utilizó ARN total, extraído mediante el método de Chomczynski y Sacchi (1987), a partir de células de osteosarcoma humano MG63 (ref. en ATCC: CRL-1427). Los cebadores (*primers*) son diseñados con ayuda de un *software* (Oligo v6.6), a partir de las secuencias de los ARNm publicadas en el *genbank*. Los productos de PCR fueron clonados “en romo”, en un plásmido de mantenimiento (pBSK II, Stratagene). Una vez clonados los genes, se comprobaron mediante secuenciación de ambas hebras. Usando como molde estos plásmidos, se amplificaron por PCR con *pfu*-AND-polimerasa, la región que codifica para el péptido maduro. Los cebadores que se utilizan incorporan el Dominio de Unión al Colágeno (DUC) y sitios de restricción adecuados para clonar direccionalmente en un plásmido de transferencia de un sistema de expresión en *baculovirus*, que contiene una secuencia para un péptido señal de secreción, específico para células de insecto (pAcGP67B, Pharmingen). Para obtener el factor sin DUC, los cebadores tenían sólo los sitios de restricción. El cebador para la cadena con sentido tenía la siguiente estructura: 5'- (*Bam*HI)-secuencia del DUC-GGAGGA-(*Nhe*I)-6 primeros nucleótidos péptido maduro TGF- β 1. El cebador para la cadena antisentido estaba constituido por varios nucleótidos del extremo 5' del gen y que comprendían el codón de paro. Además tenía el sitio Not I. En todos los casos, se comprobó la construcción mediante secuenciación del producto de PCR o del plásmido de transferencia que lo contiene.

Una vez que tuvimos el plásmido de transferencia para el factor con y sin DUC, se cotransfectaron células de insecto (sf9) con una mezcla compuesta por el plásmido de transferencia y un ADN de *baculovirus* comercial (Bac-Vector3000, Novagen), que tiene eliminado además del gen de la poliedrina, otros genes que codifican para cistein-proteasas. Usamos un método de transferencia mediado por liposomas (lipofectina, Novagen), según las instrucciones de la casa comercial.

Una vez transferidos los ADN a las células, se cultivaron en medio TNM-FH durante varios días, hasta que se observó afectación en las células. Durante este tiempo, en el interior de las células ocurre una recombinación homóloga por la que se transfiere al ADN vírico, “río abajo” del promotor de la poliedrina, una región del plásmido que comprende la secuencia del péptido señal más la del factor con o sin DUC. Este proceso genera virus infectivos que matan a la célula, se liberan al medio e infectan a otras células.

De la mezcla de virus recombinantes que había en el sobrenadante del cultivo se seleccionó un virus recombinante. Esto se realizó mediante el ensayo de placa, el cual consiste en sembrar un cultivo de células semiconfluente con diluciones del sobrenadante de transfección. Tras el periodo de infección (1 h), se cubrió la placa con agarosa disuelta en medio de cultivo y se dejó cultivando 4 días. Con esto se consiguió que la dispersión de la infección ocurra en el entorno de algunas células, lo cual generó una placa de lisis. Estas placas de lisis fueron sacadas individualmente y depositadas en un pequeño volumen de medio para extraer los virus. En función del nº y tamaño de las placas de lisis de la primera selección, este procedimiento se repitió una vez más a partir de una placa de lisis anterior y así nos aseguraremos de tener un virus recombinante clonado. Una vez amplificado este virus se analizó por PCR con los cebadores específicos para el factor, para comprobar que contenía el gen de interés. A continuación fue necesario generar un stock de gran volumen que había de ser titulado, para saber el nº de pfu/ml (unidades formadoras de placa/ml).

A partir de este punto, para cada virus recombinante, se establecieron las condiciones adecuadas de infección, con objeto de obtener una producción óptima. Para ello, se sembraron con un número conocido de células, placas de 12 pocillos. En ellas se planificó sembrar distintas proporciones de nº de virus/célula (MOI, *multiplicity of infection*), además de distintos tiempos de cultivo. Se probaron MOI de 0.1, 1 ó 10, muestreando a 48, 72 y 96 h de incubación. Con objeto de que el suero del medio de cultivo no contaminase con proteínas no deseadas, tras las primeras 24 horas después de la infección, el cultivo se continuó con medio sin suero o un porcentaje muy pequeño. Una vez finalizada cada situación experimental, se recogió el sobrenadante y se centrifugó para eliminar restos celulares.

Las células del pocillo se rompieron por congelación-descongelación y se realizó un extracto con PBS. Ambas

muestras se analizaron por SDS-electroforesis (condiciones desnaturalizantes) y sin agentes reductores. El gel de poli-acrilamida se tiñó con Azul de *Coomassie* (si no fuese lo suficientemente sensible, se puede realizar una tinción con plata). También se analizaron las distintas muestras mediante *immunoblot* utilizando anticuerpos específicos para TGF- β 1. Utilizamos un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y detectamos su presencia por quimioluminiscencia (CSPD, Amersham). Con esta información evaluamos la proporción de monómero/dímero que se produjo y el rendimiento del sistema.

Para obtener una cantidad importante de proteínas recombinantes, se inició un cultivo líquido de aproximadamente 250 ml, con unas 500.000 cels/ml. Cuando alcanzó un crecimiento de unos 2×10^6 cels/ml, se inoculó con el virus, usando el MOI más alto y cuyo rendimiento fue mayor. A las 24 horas se retiró el medio con suero y se siguió cultivando las células con medio sin suero, el número de días determinado por los ensayos previos. Transcurrido este tiempo, se purificaron las proteínas según el protocolo descrito por Aono y col. (1995). El método utiliza cromatografía de intercambio catiónico, usando una columna de SP-Sepharosa (Amersham-Pharmacia). El medio de cultivo se equilibró a pH 8 y se añadió urea 4 M. La columna se equilibró con un tampón Tris-HCl 20 mM pH8, urea 4 M. Tras pasar por la columna el medio, se lavó con el tampón y se eluyeron las proteínas con un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0.7 M. A las distintas fracciones se midió la absorbancia a 280 nm y aquellas que tenían proteínas fueron analizadas por electroforesis, siguiendo la técnica descrita anteriormente. Las fracciones positivas, fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración y utilizadas en ensayos de actividad biológica. La concentración de proteínas de esta fracción final se midió por Bradford.

Ejemplo 2

Obtención y preparación de células madre mesenquimáticas humanas

Las células madre mesenquimáticas humanas se obtuvieron de médula ósea (MO) humana tras extracción quirúrgica de la cresta ilíaca de donantes informados. El tejido medular se lavó en medio completo (α -MEM GIBCO, HD, EE.UU.) con antibióticos (100 mg/ml penicilina G (sigma), 50 mg/ml gentamicina (sigma) y 0,3 mg/ml de fungizona (Flow- ICN)). La suspensión de células individualizadas se obtuvo tras disgregación secuencial a través de agujas de calibre 18, 20 y 22, y finalmente filtradas a través de filtros estériles de teflón de 20 micrómetros (Cell Strainer, Falcon, Lincoln Park, NJ) para separar restos de tejido y acúmulos celulares.

Ejemplo 3

Cultivo de MSCs en geles de colágeno

La suspensión celular obtenida según el ejemplo 2, se centrifugó a 100 g durante 5 min. El centrifugado se resuspendió en medio de cultivo con muy baja concentración de suero del propio paciente (SH, 0,5%).

Antes de disponer las células en los pocillos de cultivo, placas de 48, se depositó en el fondo de los mismos 100 ml. de una solución de colágeno I humano (Sigma-Aldrich), a una concentración de 0,35 mg/ml. a pH 7.4. Sobre una capa se depositaron 150 ml por pocillo, de una mezcla de colágeno I, TGF- β 1 a una concentración de 1 mg/ ml. y 2×10^6 células de médula ósea. Las placas de cultivo se introdujeron en la estufa de cultivo a 37°C, durante 15 min. para permitir la formación del gel de colágeno, que hasta este momento se mantenía líquido. A continuación se depositaron 150 ml por pocillo de medio de cultivo que también contenía la misma concentración de TGF- β 1. Los cultivos así dispuestos se cultivaron en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, a 37°C y 100% de humedad relativa. Cada 3 días se cambió el medio de cultivo, añadiendo en cada caso, la misma concentración de TGF- β 1.

La concentración óptima de TGF- β 1 fue investigada en ensayos previos de respuesta quimiotáctica. Para cada condición experimental se mezclaron 150 ml de colágeno (0,35 mg/ml) con la concentración del factor previamente seleccionado como la de mayor capacidad quimiotáctica. Cultivos confluentes de médula ósea de rata se disociaron y las células se colocaron en el compartimento superior de las cámaras Boyden (Neuroprobe, Rockville, MD) a una concentración 2×10^5 células/ml de α -MEM. El compartimento inferior de la cámara contenía el medio con las distintas concentraciones del factor a ensayar. Después de 4 h. de incubación a 37°C en 5% de CO₂, se sacaron los filtros y se fijaron en metanol; se lavaron, se tiñeron y se montaron en portas. La quimiotaxis se cuantificó contando el número de células que migraban en 20 campos del microscopio (x400) en cada filtro.

Ejemplo 4

Procedimiento experimental para la capacitación de las células (selección, amplificación e inducción)

Las células de MO se mantuvieron en las condiciones experimentales descritas antes durante 10 días, cambiando el medio de cultivo, y por tanto el TGF- β 1, cada 3 días. Transcurridos esos 10 días se implementó el medio de cultivo con 10% de suero del propio paciente (SH 10%). Terminando así el período denominado de selección y comienza el de amplificación, que se mantuvo durante el tiempo necesario para obtener una cantidad de células que haga posible el trasplante, pero en todo caso, este período no debe superar los 25 días. Terminado este período el medio se implementó con dexametasona (10^{-8} M) y β -glicerofosfato (2 mM) que actúan como agentes químicos osteoinductores. A este período de sólo 2 días se le llama de inducción.

ES 2 245 879 B1

Durante el tiempo que duró el cultivo de las células, se tomaron muestras a los días 0, 10, 14, 18, 21, 24, 27, 30, 33 y 36 y se realizaron análisis del nº de células y presencia de fosfatasa alcalina y contenido de calcio. Las Tablas I, II, III representan los valores obtenidos. En ellas se observa cómo el TGF- β 1-DUC incrementa el número de células respecto al control. Lo mismo ocurra con la síntesis de fosfatasa alcalina. El contenido de calcio también va incrementándose con los días de cultivo, mientras que en el control los valores son imperceptibles.

El examen microscópico de los cultivos durante el proceso descrito, muestra cómo las células proliferan a lo largo de los días de cultivo e incluso forman colonias durante el período de amplificación, cuando están en presencia de TGF- β 1-DUC (Figura 1). Cuando las células son tratadas con el TGF- β 1 comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN), permanecen dispersas o escasamente agrupadas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la replicación celular (µg ADN).

	Días de cultivo									
	0	10	14	18	21	24	27	30	33	36
Control	28.5 ± 1.55	2.9 ± 0.67	4.9 ± 0.52	6.6 ± 0.91	8.2 ± 0.86	8.5 ± 0.74	9.0 ± 0.70	9.3 ± 0.82	9.7 ± 0.88	10.6 ± 0.76
rhTGF-β1-F2	0.0 ± 0.00	6.8 ± 0.89	14.1 ± 2.74	19.5 ± 2.79	20.3 ± 1.49	22.8 ± 1.65	25.4 ± 2.10	27.8 ± 2.23	29.1 ± 2.00	31.7 ± 2.56

Los datos corresponden a los valores medios y sus ± SD para cada cuatro muestras.

TABLA 2. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad fosfatasa alcalina (U FA/µg ADN).

	Días de cultivo									
	0	10	14	18	21	24	27	30	33	36
Control	2.2 ± 0.20	0.2 ± 0.01	1.0 ± 0.03	1.4 ± 0.06	1.4 ± 0.05	1.5 ± 0.07	1.5 ± 0.09	1.5 ± 0.12	1.4 ± 0.10	1.44 ± 0.11
rhTGF-β1-F2	2.2 ± 0.20	1.0 ± 0.03	2.9 ± 0.27	3.8 ± 0.21	3.4 ± 0.17	3.5 ± 0.15	3.5 ± 0.21	4.2 ± 0.28	3.6 ± 0.24	3.18 ± 0.19

Los datos corresponden a los valores medios y sus ± SD para cada cuatro muestras.

TABLA 3. Efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido en calcio (µg Ca/pocillo).

	Días de cultivo									
	0	10	14	18	21	24	27	30	33	36
rhTGF-β1-F2	ND	ND	ND	0.045 ± 0.07	0.062 ± 0.08	0.075 ± 0.06	0.086 ± 0.09	0.170 ± 0.01	0.171 ± 0.01	0.173 ± 0.01

ND, no se detecta. p < 0.01 comparado con los cultivos controles. Los datos corresponden a los valores medios y sus ± SD para cada cuatro muestras.

Ejemplo 5

Transferencia de las células capacitadas

Terminado el período de cultivo, los geles de colágeno se digirieron con collagenasa y se disgregaron las células con tripsina 0,05% y EDTA 0,02%, a 37°C. Las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en medio sin suero. Tras el recuento correspondiente, parte de ellas se introdujeron en cámaras de difusión Millipore que se implantaron en el tejido subcutáneo de la rata, y otra parte se absorbieron en fragmentos de hidroxiapatita que se implantan en una lesión ósea concreta (Figura 3).

Ejemplo 6

Implantación subcutánea. Formación de hueso ectópico

Las cámaras de difusión con 1×10^6 células humanas capacitadas por el procedimiento descrito y suspendidas en medio sin suero se implantaron subcutáneamente en la espalda de ratas Fischer 344 hembras de 7 meses de edad, previa anestesia con inyección subcutánea de pentobarbital sódico 3,5 mg/ 100 g de peso corporal. Se practicó una incisión de 2 cm. en la línea media de la espalda para introducir las cámaras. Cada rata albergó varias cámaras con células tratadas con TGF- β 1-DUC y otras control, con células que transcurrieron el período de cultivo sin tratamiento o con TGF- β 1 comercial. Las heridas fueron suturadas y desinfectadas con Betadine. Cuatro semanas después (período de implantación), las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de anestésico y las cámaras extraídas para su estudio histológico y radiográfico. Este último se practicó con rayos X de baja intensidad. Para el estudio histológico, las cámaras se fijaron en Bounin o en Formalina tamponada al 10%. Tras la fijación se disolvió el anillo plástico de las cámaras por inmersión en acetona. Tras la deshidratación, se incluyeron en parafina y se cortaron sagitalmente a varios niveles, a 5 micrómetros de grosor. Las secciones fueron teñidas por diferentes técnicas histoquímicas o inmunocitoquímicas con anticuerpos contra diferentes tipos de colágeno, con objeto de analizar el tejido formado en el interior de las cámaras durante el período de implantación.

En la figura 2 se presentan imágenes radiográficas e histológicas de diferentes cámaras que demuestran la naturaleza cartilaginosa y ósea del tejido formado en las mismas. Frente a las cámaras control en las que apenas se observa un tejido fibrilar, en las experimentales se observan grandes superficies de tejido con características cartilaginosas, junto a otras donde la matriz osteoide parece el preludio de un tejido óseo plenamente constituido. Los datos sugieren que el tejido cartilaginoso parece transformarse en osteoide-óseo, por lo que ello parece indicar que en el interior de las cámaras se da un auténtico proceso de osificación endocondral.

Ejemplo 7

Ejemplo de Implantación en una fractura de tibia

Fragmentos de hidroxiapatita Proosteon 500 (Interpore) de alrededor de 0,5 cm de diámetro fueron embebidas con la suspensión celular, goteando sobre ellas varios microlitros, y cambiando la posición de las mismas para asegurar que la mayoría de sus cavidades quedaban llenas de células. Las células así dispuestas se trasladaron al quirófano, cuidando la asépsia y la temperatura ligeramente por encima de los 0°C. Anestesiado el paciente, se procedió a la preparación de las superficies de fractura y se introdujeron separadamente los fragmentos de hidroxiapatita. Esta fractura era realmente una no unión o pseudoartrosis atrófica, caracterizada por un foco avascular con tejido fibroso, sin proliferación de tejido condro-osteogénico vascularizado. Por tanto, previamente al implante, y en el mismo tiempo quirúrgico, se extirpó el tejido fibroso de los extremos fracturarios, dejando ambas superficies en tejido óseo esclerótico y perforándolas hasta encontrar respectivamente proximal y distalmente una fuente vascular. Los fragmentos de hidroxiapatita se colocaron en los agujeros y periféricos al foco fracturario "on lay". El resto de los fragmentos de hidroxiapatita, hasta un total de 95, se colocaron en la línea de fractura. Tras colocar los fragmentos de hidroxiapatita con las células condro-osteocompetentes, ambos fragmentos óseos se estabilizaron de forma rígida, no dinámica, mediante una placa atornillada de titanio a compresión con tornillos también de titanio, cumpliendo un principio de neutralización.

En la figura 3 se presentan imágenes de secciones histológicas realizadas en biopsia tras seis semanas de implantación. En ellas se muestra el tejido neoformado en contacto con las paredes de la hidroxiapatita con cualidades de tejido óseo, así como la formación de tejido medular en los huecos que quedan entre las trabéculas del mineral. Las pruebas que se presentan demuestran que el tejido formado tiene características de hueso en proceso de maduración. Así mismo, las imágenes muestran que la osteoinducción se extiende a las proximidades de los implantes pero no mucho más allá, lo que puede explicarse porque las células transplantadas son las responsables de tal osteoinducción, extendiéndose esta allí donde las células, de forma espontánea, difunden en la zona del implante. Las zonas más alejadas del implante no presentan síntomas de osteoinducción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de capacitación *in vitro* de células condro-osteogénicas a partir de células madre mesenquimáticas humanas que comprende:
- 10 a. el cultivo primario de las células madre en un medio suplementado con suero humano y un factor de crecimiento transformante beta 1 con un dominio molecular de unión al colágeno I (TGF- β 1-DUC);
- b. posterior amplificación mediante la suplementación con suero humano y TGF- β 1-DUC;
- c. la inducción condro-osteogénica utilizando un glucocorticoide.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 donde el glucocorticoide es dexametasona.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 donde en la inducción además se emplea β -glicerofosfato.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 donde el factor de crecimiento transformante beta 1 fusionado con un dominio molecular de unión al colágeno I se ha expresado en sistemas de expresión eucarióticos.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 donde el sistema de expresión eucariótico empleado son células de insecto.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 donde las células de insecto son transfectadas con *baculovirus*.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 donde el medio de cultivo es un gel de colágeno tipo I humano.
- 30 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 donde la suplementación inicial del medio de cultivo se realiza con una cantidad entre el 0,1% y el 1% de suero humano, preferiblemente el 0,5%.
- 35 9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 en el que la amplificación tiene lugar durante un periodo comprendido entre 1 a 25 días durante los que el medio de cultivo se suplementa con una cantidad entre el 5% y el 25% de suero humano, preferiblemente el 20%.
- 40 10. Células con capacidad condro-osteogénica obtenibles de acuerdo con el procedimiento de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9.
11. Uso de las células con capacidad condro-osteogénica de acuerdo con la reivindicación 10 en la preparación de una composición para la reparación ósea y/o cartilaginosa en humanos.
- 45 12. Composición para la reparación ósea y/o cartilaginosa en humanos capaz de inducir osteogénesis que comprende un material biocompatible, osteoconductor, y un conjunto de células con capacidad condro-osteogénica según la reivindicación 10.
13. Composición para la reparación ósea o cartilaginosa en humanos de acuerdo con la reivindicación 12 donde dicha composición se administra por inyección *in situ* en la circulación sistémica.
- 50 14. Composición para la reparación ósea o cartilaginosa en humanos de acuerdo con la reivindicación 12 donde dicha composición se administra mediante implantes adsorbidas en el material adecuado.
- 55 15. Composición para la reparación ósea o cartilaginosa de acuerdo con la reivindicación 14 donde el material empleado para el implante es hidroxiapatita o cámaras de difusión.

Figura 1.

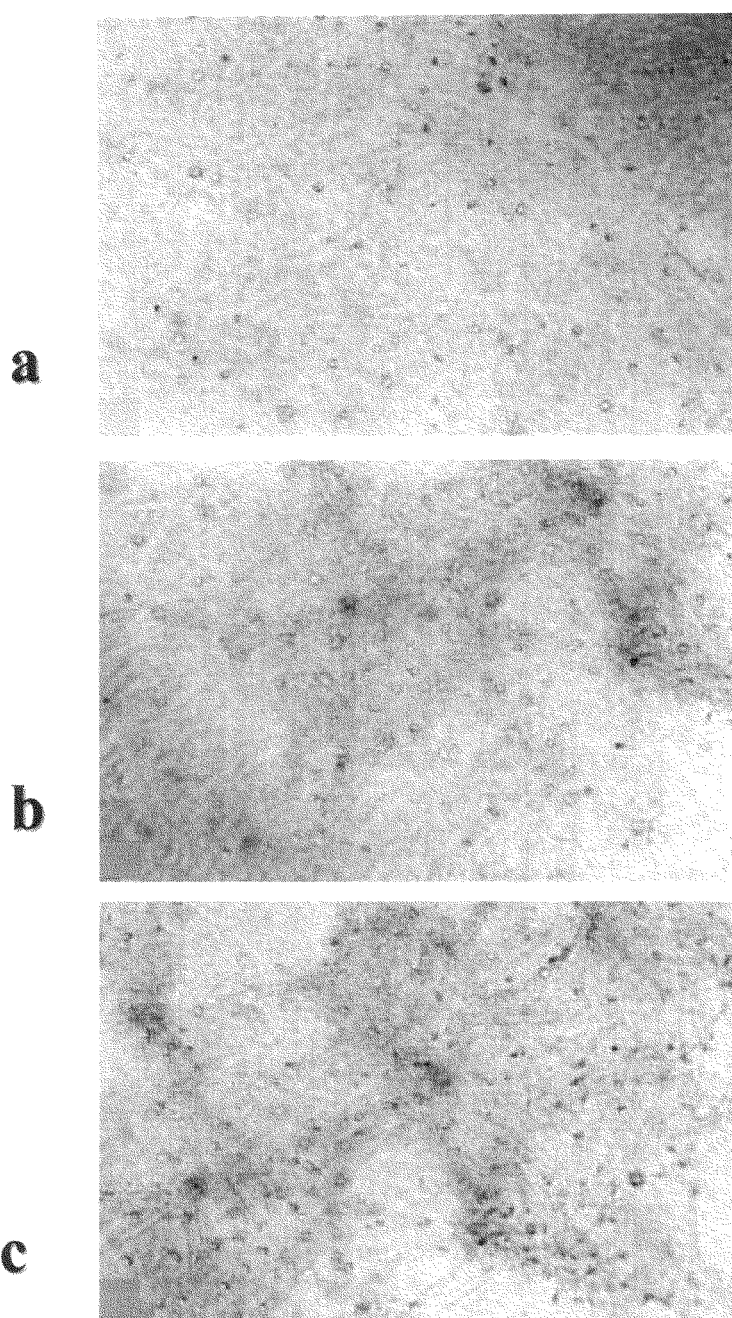


Figura 2.

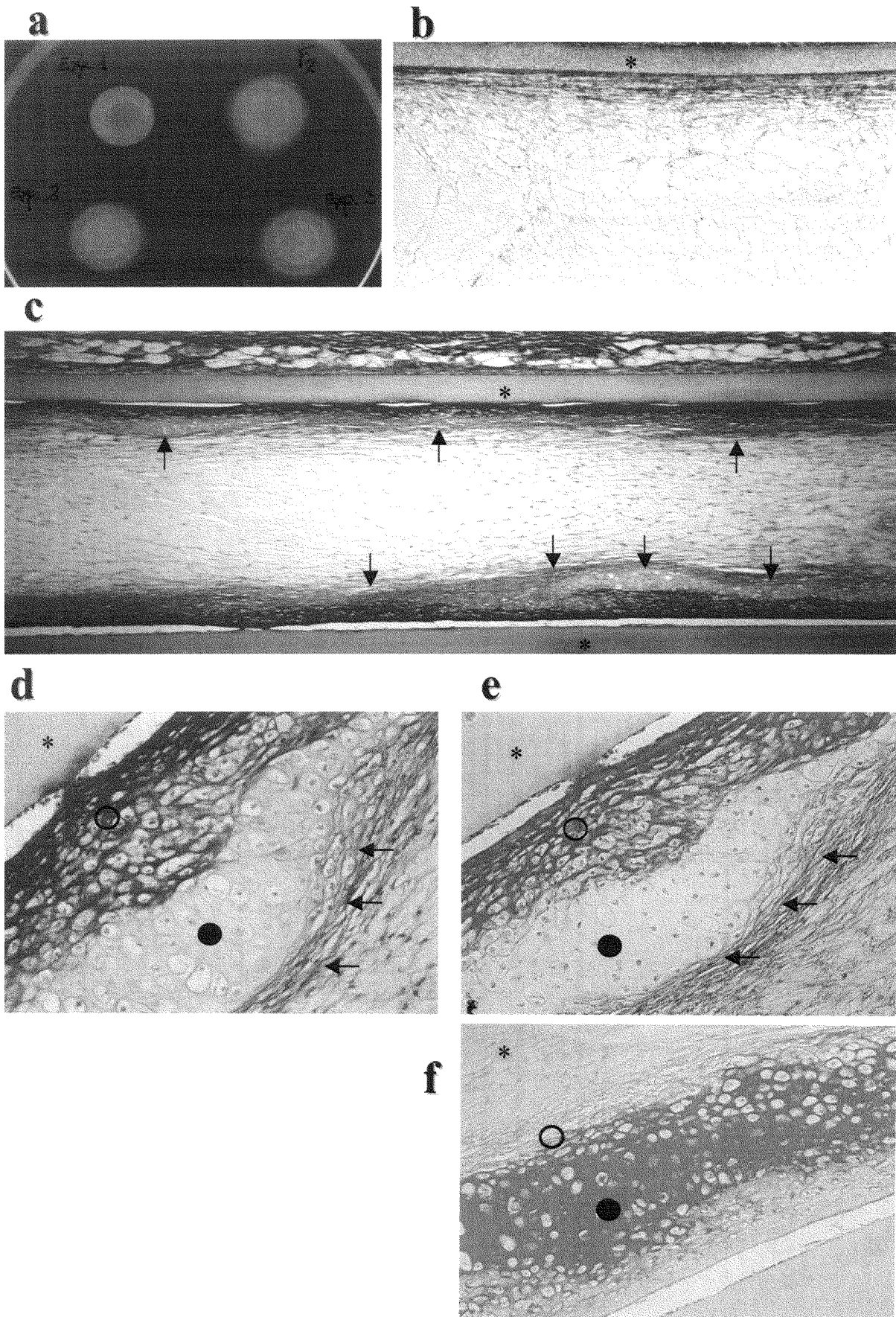
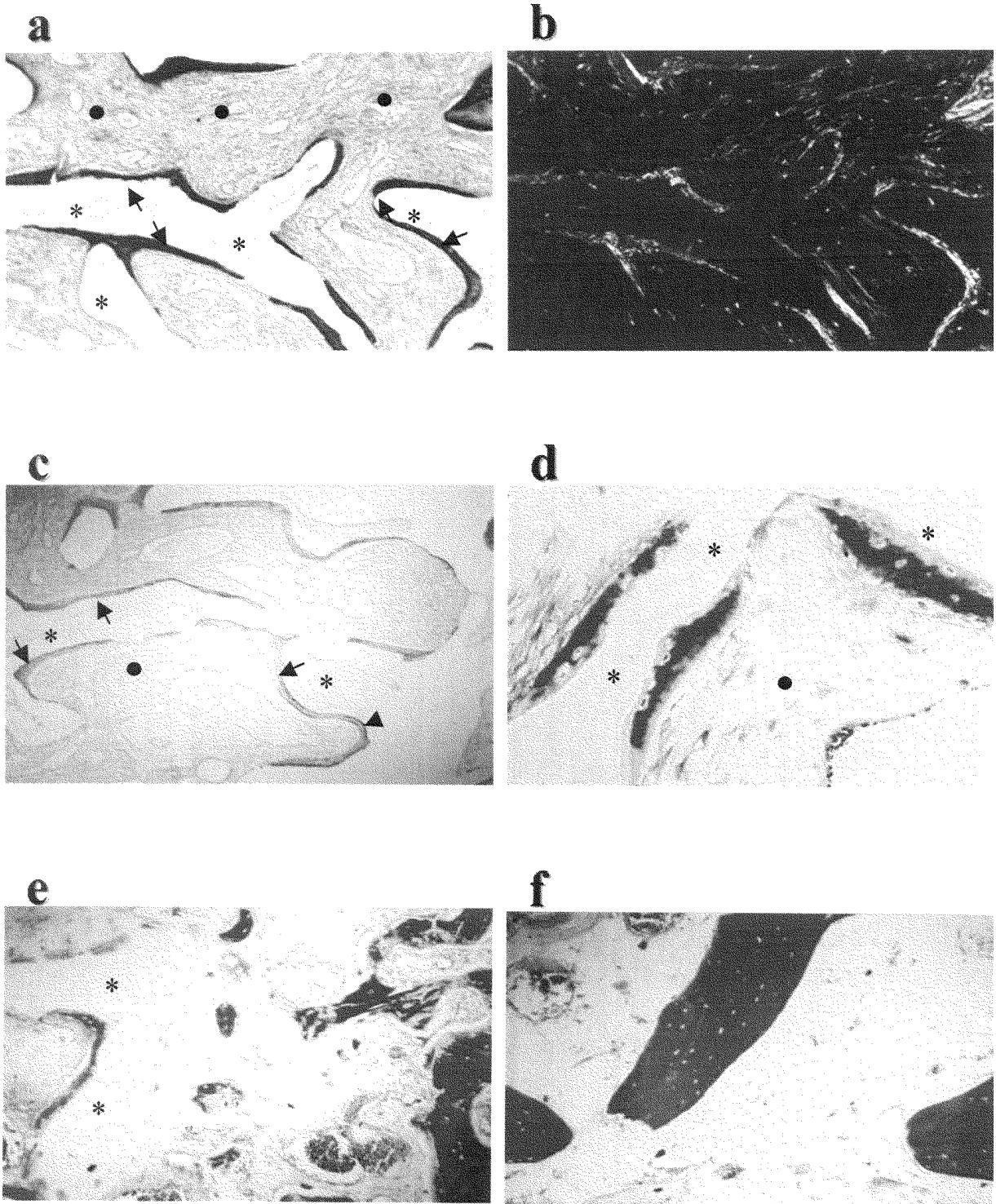


Figura 3.





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 245 879

⑫ Nº de solicitud: 200401227

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.05.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ANDRADES JA et al. . ^A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells."Exp Cell Res. 1999 Agos 1, 250(2):485-98.	1-15
X	ANDRADES JA et al. . ^A modified rhTGF-beta1 and rhBMP-2 are effective in initiating a chondro-osseous differentiation pathway in bone marrow cells cultured in vitro.Çonnect Tissue Res. 2003, 44(3-4):188-97.	1-15
X	MURAGLIA A. et al. Çlonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model."J. Cell Sci. 2000 Abr, 113(Pt 7):1161-6.	10
A	GORDON E.M. et al. Çapture and expansion of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with a transforming growth factor-beta1-von Willebrand's factor fusion protein for retrovirus-mediated delivey of coagulation factor IX."Hum Gene Ther. 1997 Jul 20, 8(11):1385-94.	1-15
A	BECERRA J. et al. "Bone regeneration, cell therapy and tissue engineering."Med Clin (Barc.). 2001 Enero 13, 116(1):23-34.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.12.2005

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/06 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)