

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 398**

21 Número de solicitud: 202230314

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

07.04.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.10.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

24.10.2022

Fecha de concesión:

23.02.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.03.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ZAPATA GONZÁLEZ, Agustín Gregorio;
ALFARO SÁNCHEZ, David y
RODRIGUEZ SOSA, Mariano Rubén**

54 Título: **MÉTODO PARA POTENCIAR LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES**

57 Resumen:

Método para potenciar la diferenciación osteogénica de células estromales mesenquimales (MSC).

La invención se refiere a un método para potenciar la diferenciación osteogénica de MSC mediante su cultivo en medio osteogénico con la adición de un reactivo bloqueante del receptor EphB3. Dicho reactivo bloqueante puede seleccionarse entre anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión o combinaciones de los mismos.

La invención también se refiere tanto a las células del linaje osteogénico obtenidas mediante el método descrito como a los reactivos bloqueantes del receptor EphB3, para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o fracturas óseas.

Se incluyen también composiciones farmacéuticas que contienen las células del linaje osteogénico obtenidas mediante el método descrito y/o los reactivos bloqueantes del receptor EphB3.

ES 2 925 398 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA POTENCIAR LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de los Productos Farmacéuticos. Más concretamente, se refiere a la obtención de tejido óseo a partir de células estromales mesenquimales de animales y, especialmente, de mamíferos y a procedimientos, reactivos, compuestos y/o moléculas para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o fracturas óseas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

En todo el mundo, más de 20 millones de pacientes se ven afectados anualmente por la pérdida de tejido óseo causada por un trauma o una enfermedad. Ya en 2005, en los Estados Unidos, se realizaron más de medio millón de actuaciones relacionadas con defectos óseos, con un coste de más de 20.500 millones de dólares, mientras que el coste en la Unión Europea en 2010 se estimó en unos 37.000 millones de euros, y se prevé que aumenten en un 25% para el año 2025.

20

Junto con los traumatismos, los problemas de déficit óseo suelen estar asociados a varios factores, como la edad, el sexo y las infecciones, como demuestran los diagnósticos de osteoporosis, osteopenia y los problemas dentales graves relacionados con la pérdida de dientes. También se ha propuesto que el deterioro funcional de las células estromales mesenquimales (MSC) y de las células progenitoras de los osteoblastos es un mecanismo patológico que contribuye a los trastornos óseos, como la osteoporosis (la enfermedad ósea más común) y otras displasias esqueléticas hereditarias raras, que pueden deberse no sólo a una mayor resorción ósea, sino también a problemas en la diferenciación osteogénica de sus progenitores, incluidas las MSC.

30

La osteoporosis ha sido reconocida como una de las enfermedades más importantes que afectan a la población mundial junto con la hipertensión y la diabetes mellitus,

35

siendo su impacto económico similar al coste de otras enfermedades importantes, como los accidentes cerebrovasculares, el cáncer de mama o el infarto de miocardio.

5 En el caso de la osteoporosis, su tratamiento pretende mantener la masa ósea en niveles normales. Las terapias actuales son principalmente fármacos que inhiben la resorción ósea o mejoran la osteogénesis. Los bifosfonatos son los reactivos más utilizados para el tratamiento de la osteoporosis y actúan sobre los osteoclastos, inhibiendo la resorción ósea. *Denosumab*, un anticuerpo contra RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*), también es un agente antirresortivo. Hay pocos
10 agentes anabólicos óseos: *Teriparatida*, un análogo de la hormona paratiroidea que induce la formación de hueso y *Romsozumab*, un anticuerpo contra la esclerostina que mejora la formación ósea e inhibe la resorción. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos antirresortivos mostraron efectos secundarios y son pocos los productos anabólicos óseos. Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas
15 terapias osteoanabólicas para promover la formación de hueso (Hu et al. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 360; doi:10.3390/ijms19020360).

Con el rápido desarrollo de la terapia celular, las MSC humanas surgen como una herramienta adecuada para estudiar la etiología de los trastornos óseos a nivel celular,
20 así como para ser utilizadas terapéuticamente para enfermedades óseas, entre otras muchas patologías.

Las MSC son progenitores multipotentes que existen en casi todos los órganos y tejidos, como la médula ósea, el tejido adiposo, el hígado, el cordón umbilical, los músculos y la
25 pulpa dental. Las MSC son células adherentes al plástico, capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples linajes celulares, principalmente derivados de la hoja media, como osteoblastos, adipocitos y condrocitos. La diferenciación a linaje óseo está modulada por varios factores tanto internos como externos que modulan este proceso. Respecto a los internos, se han descrito múltiples moléculas que regulan la
30 diferenciación ósea de las MSC: *Runx2*, *Sp7* (*Osterix*), *TAZ*, *Foxc2*, *Twist*, *BMP*, *Wnt/ β -catenina*, *IGF-1*, *miR-21*, *miR-31*, *miR-138*, *miR-204*, *miR-637*, etc., aunque también existen otros externos como: estímulos mecánicos (ejercicio, vibración), radiación y dieta rica en grasas (Hu et al. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 360; doi:10.3390/ijms19020360).

35 Uno de los más relevantes es *BMP-2* que se ha empleado tanto en solitario, en forma

de proteína recombinante, como junto a otros factores como: vitamina D, Dexametasona, PDGF, PGF, BMP-7, NELL-1, Ang-1, WSIP1 o PRP. El uso de BMP-2 ha mostrado su eficacia en diversos ensayos como en la regeneración periodontal, en algunos injertos faciales y en las “no-uniones” en cirugía oral. Otros de esos factores como bFGF, PDGF-BB, HGF o IGF-1 se han sobreexpresado en MSC, encontrando también un aumento en la diferenciación osteogénica. (Kim S et al. Adv Exp Med Biol. 2018; 1078:233-244. doi: 10.1007/978-981-13-0950-2_12). De igual modo, se han utilizado lisados de plaquetas acompañados de factores como FGF, TGF, IGF, VEGF, PDGF, IGF, BMP-2, tirosina, calcitrol, estonozolol, dexametasona, β -glicerofosfato y/o ácido F-ascórbico (WO2020161748A1).

Aun así, actualmente, la mayoría de los ensayos de regeneración ósea realizados *in vivo* emplea simplemente MSC autólogas o alogénicas aisladas y cultivadas, sin ninguna modificación que mejore su eficacia.

Otro de los candidatos que se estudia actualmente como regulador del comportamiento de las MSC es el sistema Eph/Ephrina. Las Eph (*Erythropoietin-producing hepatocellular receptors*) son la mayor familia de receptores tirosina kinasa existente en células eucariotas y, mediante la interacción con sus ligandos, las Ephrinas, están implicadas en procesos de atracción/repulsión, adhesión celular, supervivencia, proliferación y diferenciación celular.

Las Ephrinas se dividen en dos familias según su secuencia génica y estructura molecular: las Ephrinas A son proteínas con un dominio GPI (glucosilfosfatidilinositol) de unión a membrana, mientras que las Ephrinas B tienen una región transmembrana, seguida de un fragmento citoplásmico con un dominio PDZ. Las Eph también se dividen en dos grupos, A y B, en base a la homología de sus secuencias y la distinta afinidad por los dos tipos de Ephrinas. Estas moléculas señalizan bidireccionalmente: las Eph transmiten al interior de la célula donde se expresan una señal denominada *forward*, mientras que las Ephrinas transmiten señales llamadas *reverse*.

Desde su descubrimiento hace tres décadas, se ha descrito la implicación de Ephs y Ephrinas en un número creciente de procesos fisiológicos y patológicos en muchos tipos de células y diferentes órganos. La señalización Eph/Ephrina participa en múltiples procesos celulares como: la remodelación del citoesqueleto de actina, la adhesión

célula-sustrato, las uniones intercelulares, la forma y el movimiento de las células. Las vías de señalización de Eph/Ephrinas son determinantes, por tanto, en procesos como la migración y proliferación celular, la distribución y el posicionamiento de las células, el compromiso y diferenciación celular, el patrón tisular y la morfogénesis, la angiogénesis y la plasticidad tisular. Además, también se ha descrito su implicación en la supervivencia celular, la función inmunológica, la secreción y la reparación tisular tras una lesión (Niethamer, T. K., & Bush, J. O. (2019). Getting direction(s): The Eph/ephrin signaling system in cell positioning. *Developmental Biology*, 447(1), 42–57. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.01.012).

10

En concreto, la relevancia de las Eph/Ephrinas en la reparación ósea se resume en: EphrinaB2 media la osteogénesis en la reparación de la calvaria; la sobreexpresión de EphB4 en osteoblastos aumenta la formación de hueso en el callo de la fractura durante su cicatrización; la señalización *forward* y *reverse* de EphrinaB1-EphB2 regula una respuesta del periostio frente a la tensión mecánica en el hueso; se ha comprobado que EphrinaB2 y EphB4 modulan la formación y la resorción óseas activando osteoclastos u osteoblastos, respectivamente (US20090186026A1). Recientemente, se ha comprobado la expresión de Eph/Ephrinas durante la formación del callo óseo en las fracturas, estando restringida a EphA4, EphA5 y EphrinB1, y observando que EphrinB1 y EphA5 son los principales mediadores de la hipertrofia de los condrocitos y de la osificación, respectivamente (Kaur et al. Changes in ephrin gene expression during bone healing identify a restricted repertoire of ephrins mediating fracture repair. *Histochemistry and Cell Biology* (2019) 151:43–55). En 2021, Kamath y Benson han publicado un trabajo con resultados contradictorios sobre la implicación de EphB3 como potencial mediador de la osteogénesis, tanto en el desarrollo como en la reparación de lesiones (Kamath RAD, Benson MD. EphB3 as a potential mediator of developmental and reparative osteogenesis. *Cells Tissues Organs*. 2021 Oct 25. doi: 10.1159/000520369. *Epub ahead of print*. PMID: 34695818.). Los escasos resultados descritos son discordantes, dado que parecen depender del parámetro óseo estudiado y de la edad de los animales analizados. Además, en la discusión, los autores indican, por un lado, que EphB3 podría ser un receptor candidato para la acción de las Ephrinas en el crecimiento óseo en desarrollo y, por otro lado, que EphB3 funciona limitando la osteogénesis más que promoviéndola. Achacan estos resultados contradictorios a la dificultad de valorar el efecto de un solo receptor EphB debido a la redundancia funcional que exhibe esta familia de moléculas.

35

Además, la activación *in vitro* de EphB2 con una proteína de fusión produce un aumento de la osteogénesis en MSC humanas provenientes de médula ósea. En ratón, la delección de EphrinaB1 en células productoras de colágeno 1 α 2 produce fallos en el desarrollo óseo, mientras que la activación de la señal *reverse* de EphrinaB1 es esencial para la diferenciación de las células estromales de médula ósea y la formación de hueso. En esta línea, las señales *forward* de EphB2 y *reverse* de EphrinaB1 se han descrito necesarias para la mineralización de la matriz extracelular de la pulpa dentaria. Por otro lado, el par EphB4/EphrinaB2, que está implicado en la maduración y diferenciación de precursores hematopoyéticos, afecta también la capacidad osteogénica del estroma de la médula ósea, de manera que la ausencia de EphB4 produce alteraciones en la médula ósea, aumentando la cantidad de precursores óseos.

Por tanto, hay mucho interés en encontrar tratamientos que promuevan la formación de hueso, para abordar traumatismos y patologías osteodegenerativas.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Método para potenciar la diferenciación osteogénica de células estromales mesenquimales.

Por definición, las MSC tienen capacidad de diferenciación a linaje osteogénico, aunque los mecanismos implicados son escasamente conocidos. Entre todos los elementos que se han estudiado hasta ahora como mediadores de la osteogénesis, el sistema Eph/Ephrina es un posible candidato puesto que se trata de un sistema implicado en la comunicación entre osteoblastos y osteoclastos, que media la dualidad entre la formación y la remodelación ósea, en un contexto normal de homeostasis. Tal y como recoge el estado de la técnica, entre estas moléculas se conocen algunas con efecto osteoclástico y a otras se les atribuye efecto osteoblástico: la delección de EphrinaB1 en precursores de osteoclastos promueve el desarrollo y función de osteoclastos; EphA4 inhibe la actividad osteoclástica, pero no así la formación de osteoclastos; EphrinaB2 ejerce su efecto osteoblástico mediante la activación del receptor EphB4 en osteoblastos; EphrinaB1 también es capaz de promover la diferenciación osteoblástica, junto con los receptores EphB1 y EphB2; sobre el receptor EphB3 se han propuesto funciones ambivalentes. Sin embargo, en nuestro caso, hemos obtenido resultados

sorprendentemente positivos y muy sólidos con el receptor EphB3. En concreto, al bloquear la señal de EphB3 se obtuvieron unos elevados niveles de diferenciación osteogénica. Hasta el momento, se sabía que el bloqueo de EphB3 tiene uso médico frente a distintos tipos de cáncer, como el carcinoma hepático y el carcinoma colorrectal, también se puede utilizar en métodos que confieren neuroprotección y/o en tratamientos frente al daño tisular causado por eventos isquémicos. Sin embargo, en los estudios sobre el sistema Eph/Ephrina y el sistema óseo, este receptor ha sido repetidamente desestimado o, al menos, escasamente estudiado.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para potenciar la diferenciación osteogénica de células estromales mesenquimales que incluye la utilización de un elemento capaz de suprimir la señalización *forward* mediada por EphB3 en las células estromales mesenquimales de mamíferos, incluida la especie humana. Esta ausencia de la señalización *forward* favorece la diferenciación osteogénica de las MSC con el consiguiente incremento de la formación de matriz ósea.

Para realizar este método de potenciación de la diferenciación osteogénica de células estromales mesenquimales conviene, previamente, aumentar el número de MSC con las que trabajar. Para ello, se parte de MSC aisladas que se cultivan *in vitro* hasta alcanzar un 80-90% de confluencia entre las células. Alcanzado ese grado de confluencia se procede a levantar (desadherir) las células del soporte donde han crecido y a incubarlas sobre un nuevo soporte (o sobre varios soportes, en función de las necesidades), utilizando medio de cultivo convencional hasta que las células alcancen de nuevo un 80-90% de confluencia (proceso conocido como “dar un pase”). La desadhesión e incubación se repiten, tal y como se acaba de describir, para aumentar la cantidad de MSC (fase de expansión), hasta un máximo de seis pases.

Las MSC aisladas pueden obtenerse a partir de la médula ósea o del tejido adiposo. Para conseguir un mayor enriquecimiento en MSC, las células aisladas pueden cultivarse en medios de cultivo específicos para este tipo celular, medios de cultivo que favorecen la proliferación de las MSC frente a cualquier otro tipo celular presente tras el aislamiento. Preferentemente, en los distintos pases, se renueva el medio de cultivo, al menos, una vez cada 7 días.

35 Una vez obtenida la cantidad de MSC deseada, el método para potenciar la

diferenciación osteogénica de MSC incluye los siguientes pasos:

- 1) alcanzado un nivel de confluencia del 80-90%", sustituir el medio de cultivo utilizado en la fase de expansión de las MSC por un medio de cultivo osteogénico y añadir un reactivo bloqueante del receptor EphB3;
- 5 2) incubar, al menos, durante 7 días.

Preferentemente, se induce la diferenciación de las MSC cuando han alcanzado una confluencia celular en cultivo de, al menos, el 90%. Por confluencia, en esta memoria descriptiva, se entiende el porcentaje de ocupación que tienen las células con respecto
10 a la superficie del soporte donde se estén cultivando, considerándose que la confluencia es del 100% cuando las células ocupan toda la superficie disponible del soporte.

Los distintos medios de cultivo indicados son de sobra conocidos por el experto en la materia y pueden elaborarse en el laboratorio, normalmente a partir de medios básicos,
15 o adquirirse ya elaborados, listos para su uso o a falta de algún ingrediente.

Medios de cultivo convencionales pueden ser, por ejemplo, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), que es una modificación del medio *Eagle's Basal Medium* (EBM) con una concentración 4 veces superior en aminoácidos, vitaminas y otros componentes
20 adicionales. El medio DMEM presenta varias opciones, con distintas concentraciones de glucosa, con o sin L-glutamina y/o piruvato sódico; y suele requerir una suplementación con suero.

Los medios de cultivo osteogénicos suelen contener dexametasona, ácido ascórbico o
25 fosfato de ácido L-ascórbico, y β -glicerofosfato o β -glicerofosfato sódico, en distintas concentraciones.

Por reactivo bloqueante, en esta memoria descriptiva, se entiende el reactivo, elemento, compuesto, molécula y/o molécula modificada capaz de suprimir la señalización *forward*
30 mediada por EphB3 y que se puede seleccionar del grupo formado por: anticuerpos, péptidos bloqueantes de EphB3 o proteínas de fusión, RNA de interferencia (RNAi) y/o shRNA bloqueante de la expresión del gen de EphB3, edición del gen que codifica EphB3 mediante la técnica CRISPR/CAS o combinaciones de los mismos.

35 Entre los anticuerpos antiEphB3 se pueden seleccionar anticuerpos policlonales o

monoclonales. Los péptidos bloqueantes son pequeñas moléculas proteicas diseñadas artificialmente para unirse de manera específica a distintos dominios de activación del receptor EphB3 e impedir la unión de la ephrina correspondiente. En cuanto a las proteínas de fusión, estas deben estar formadas por el receptor EphB3, al que se le ha unido otro dominio proteico, como puede ser la fracción constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG), e impedir la señalización a través de EphB3. El método de silenciamiento empleando RNAi, se basa en seleccionar y sintetizar un RNA de doble cadena (dsRNA) que induzca la degeneración de un RNA mensajero al que se une por homología. En este caso particular, el dsRNA tiene la secuencia homóloga con el RNA mensajero para el receptor de EphB3. De forma similar, los RNA de horquilla corta (shRNA) son secuencias artificiales de RNA que también generan RNAi para impedir la expresión del gen seleccionado, pero deben ser introducidos en las células mediante plásmidos o vectores virales. De esta forma, su expresión es continua, pudiendo mantener por más tiempo el bloqueo de la expresión génica. En nuestro caso, la secuencia de estos shRNA debe ser homóloga a la del gen de EphB3. Mediante el método de CRISPR-CAS también se busca silenciar específicamente la expresión de EphB3, para lo cual se debe generar una guía complementaria a la secuencia de DNA del gen que codifica para EphB3 para que el sistema corte esa secuencia provocando que no se exprese ese gen y no se sintetice la proteína correspondiente.

20

En el paso 2), preferentemente, se renueva el medio osteogénico con el reactivo bloqueante, al menos, cada 7 días.

A lo largo del método de potenciación de la diferenciación osteogénica de MSC, las condiciones de CO₂, temperatura y humedad son las habitualmente utilizadas por el experto en la materia: 5% CO₂, 37°C y 100% humedad.

25

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de las células del linaje osteogénico obtenidas mediante el método de potenciación de la diferenciación osteogénica descrito más arriba, en un método para el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o de fracturas óseas.

30

Las células del linaje osteogénico incluyen todos los tipos celulares existentes desde la MSC hasta el osteoblasto maduro. Según los distintos autores, estos tipos celulares reciben diferentes nombres, siendo los más comunes: células osteoprogenitoras,

35

preosteoblastos, osteoblastos y osteoblastos maduros.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un reactivo bloqueante del receptor EphB3 para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o de
5 fracturas óseas.

El bloqueante del receptor EphB3 puede seleccionarse del grupo formado por anticuerpos poli o monoclonales, péptidos bloqueantes de EphB3 o proteínas de fusión, RNAi y/o shRNA bloqueante de la expresión del gen de EphB3, edición del gen que
10 codifica EphB3 mediante la técnica CRISPR/CAS o combinaciones de los mismos.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un reactivo bloqueante del receptor EphB3 para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o de fracturas óseas.
15

En esta composición farmacéutica, el bloqueante del receptor EphB3 puede seleccionarse del grupo formado por anticuerpos poli o monoclonales, péptidos bloqueantes de EphB3 o proteínas de fusión, RNAi y/o shRNA bloqueante de la expresión del gen de EphB3, edición del gen que codifica EphB3 mediante la técnica
20 CRISPR/CAS o combinaciones de los mismos.

Así mismo, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende células del linaje osteogénico obtenidas mediante el método descrito más arriba, para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o fracturas óseas
25

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen células del linaje osteogénico obtenidas mediante el método descrito más arriba y un reactivo bloqueante del receptor EphB3.

Ejemplos de las enfermedades con deficiencia de tejido óseo para las que se pueden usar las células del linaje osteogénico obtenidas mediante el método descrito más arriba, los reactivos bloqueantes y/o las composiciones farmacéuticas de la invención son: osteoporosis, tanto primaria como debida al uso de fármacos que la inducen (principalmente inmunosupresores esteroideos), osteopenia, osteogénesis imperfecta, enfermedad renal crónica, hipertiroidismo, celiaquía, etc., preferentemente en
35

mamíferos y, entre ellos, en la especie humana.

La invención supone un aporte nuevo en los procedimientos de diferenciación osteogénica de las células estromales mesenquimales de mamíferos, que mejora notablemente la capacidad de obtener gran cantidad de hueso, con aplicación en el
5 tratamiento de enfermedades y/o fracturas óseas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

15 **Figura 1.** Expresión relativa (ER) de factores de transcripción pro-osteogénicos (RunX2, ALP y Dlx5) en hMSC de médula ósea cultivadas 7 días en medio osteogénico (MO) con diferentes bloqueantes, a 5 y 10 µg/ml (* p valor<0.05, ** p valor<0.01 y *** p valor<0.005).

20 **Figura 2.** Expresión relativa (ER) de factores de transcripción pro-osteogénicos (RunX2, ALP, Dlx5, SP7 y MSX2) en hMSC de médula ósea cultivadas 7 días con diferentes bloqueantes a 5µg/ml (* p valor<0.05, ** p valor<0.01 y *** p valor<0.005).

Figura 3. Cuantificación de la diferenciación osteogénica, por tinción de Rojo de Alizarina (AR) y cloruro de cetilpiridina (CPC), de hMSC de médula ósea tratadas 21
25 días con diferentes bloqueantes a 5µg/ml (* p valor<0.05, ** p valor<0.01 y *** p valor<0.005).

Figura 4. Expresión relativa (ER) de factores de transcripción pro-osteogénicos en la
30 línea celular hTERT transducida para sobreexpresar EphB3. (* p valor<0.05 y ** p valor<0.01).

Figura 5. Cuantificación de la diferenciación osteogénica durante 14 días, por tinción de AR y CPC, de la línea celular hTERT transducida para sobreexpresar EphB3 (***) p
35 valor<0.005).

Figura 6. Expresión relativa (ER) de factores de transcripción pro-osteogénicos en MSC de ratones WT (sin modificar) y deficientes en EphB3 (EphB3^{-/-}), cultivadas 7 días (** p valor<0.01 y *** p valor<0.005).

5

Figura 7. Diferenciación osteogénica de MSC murinas, de ratones WT y EphB3^{-/-}, tras 21 días de cultivo. **A y B:** imágenes de los cultivos teñidos con AR (100X, escala = 200µm). **C:** cuantificación de la diferenciación osteogénica durante 21 días, por tinción de AR y CPC (*** p valor<0.005).

10

Figura 8. Análisis óseo morfométrico por microtomografía de rayos-X (microCT). **A:** imágenes de las reconstrucciones 3D de las vértebras de animales control sanos, ovariectomizados y tratados con dexametasona. **B y C:** cuantificación del volumen óseo (%BV/TV) y del grosor de las trabéculas (Tb.th) (*** p valor<0.005) de los tres grupos de animales.

15

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitativos de su alcance.

20

Ejemplo 1. Aislamiento y cultivo de MSC.

Las MSC humanas se obtuvieron tanto de médula ósea (Hospital Universitario de Valladolid) como de tejido adiposo (Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid) a partir de diferentes donantes sanos y de acuerdo con la Declaración de Helsinki; además, los Comités de Ética de ambos hospitales autorizaron la cesión para la realización del estudio.

25

Para conseguir un mayor enriquecimiento en MSC, las células aisladas se cultivaron inicialmente en medio de cultivo específico MesenCult™ Proliferation Kit (STEMCELL Technologies, Francia), que favorece la proliferación de las MSC frente a cualquier otro tipo celular presente tras el aislamiento. Se dispusieron en flasks T150 (soporte de cultivo), con 16ml de medio y 750.000 células (5.000 cél/cm²). Los cultivos se mantuvieron en un incubador de CO₂ a 37°C de temperatura y condiciones saturantes de humedad (100%). El medio de cultivo se renovó, al menos, una vez a la semana.

35

Cuando las células alcanzaron un 80%-90% de confluencia (entendiendo por confluencia el grado de ocupación que tienen las células del soporte donde se están cultivando), se levantaron (se desadhirieron) empleando un reactivo para eliminar las uniones establecidas entre las células y la superficie de cultivo; en este caso, se
5 utilizaron 6ml de tripsina 0.025% (Hyclone, EEUU) diluida en medio de cultivo DMEM (Lonza, Suiza). Transcurridos 5 min de incubación a 37°C, se golpeaba suavemente el fondo del flask, para favorecer la desadhesión de las células, y se detenía la reacción con DMEM + 10% de suero FBS (Gibco, EEUU).

10

Una vez contadas, las células en suspensión se pasaron a otro flask T150 con 16ml de medio de cultivo convencional: DMEM (Lonza) + 10% suero fetal bovino (FBS (Gibco)), 1% de antibiótico/antimicótico (Linus, Alemania), 1% de L-glutamina (Linus) y 1% de piruvato sódico (Sigma-Aldrich, EEUU), donde volvieron a adherirse y siguieron
15 proliferando (esto es lo que denominamos “dar un pase”), aumentando el número de MSC en el cultivo. Las MSC utilizadas en todos los ensayos descritos estaban en fase 3-6.

Ejemplo 2. Caracterización de las MSC.

20 Las MSC en cultivo, además de por su capacidad de adhesión al plástico y su morfología fibroblástica, se caracterizaron fenotípicamente por citometría de flujo para comprobar el grado de pureza del cultivo. Para ello, se emplearon anticuerpos contra moléculas de superficie que las MSC. Así, las MSC humanas presentaban el fenotipo CD73⁺ CD90⁺ CD105⁺ CD166⁺ CD14⁻ CD34⁻ CD45⁻ HLA-DR⁻, y las murinas Sca1⁺ CD29⁺ CD44⁺
25 CD73⁺ CD105⁺ CD106⁺ CD11b⁻ CD45⁻.

Ejemplo 3. Diferenciación de las MSC.

Una vez caracterizadas las MSC, según se describe en el ejemplo 2, se sembraron en otro nuevo soporte de cultivo, diferente según el ensayo a realizar, a una densidad de
30 6.000 células/cm² para que alcanzaran rápidamente un nivel de confluencia no menor del 90%. Las MSC se cultivaron en medio convencional, DMEM (Lonza) suplementado con un 10% de FBS (Gibco) y un 1% de L-glutamina (Linus), 1% piruvato sódico (Sigma-Aldrich) y 1% antibiótico/antimicótico (Linus). El medio de cultivo se renovó al menos una vez a la semana hasta que las células alcanzaron una confluencia del 90%.

35

Se realizaron dos tipos de ensayos de diferenciación que se llevaron a cabo en soportes de cultivo diferente: RT-qPCR, para el que las MSC se sembraron en flasks T25 y 5 ml de medio convencional, y tinción histológica con Rojo de Alizarina (AR) que se realizó en placas P24, con 500 μ l de medio convencional.

5

Al alcanzar la confluencia deseada, se sustituyó el medio de cultivo convencional por otro osteogénico. En este ejemplo, se utilizó MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (STEMCELL Technologies). A este medio se le incorporó el reactivo bloqueante de EphB3 correspondiente para potenciar la diferenciación osteogénica de las MSC.

10

Ejemplo 3.1. Determinación de la concentración de trabajo de los bloqueantes, empleando un anticuerpo policlonal anti-EphB3 (AF5667) y una proteína de fusión EphB3-Fc, a dos concentraciones diferentes: 5 μ g/ml y 10 μ g/ml.

15

Como reactivos bloqueantes se utilizaron un anticuerpo policlonal anti-EphB3 (R&D Systems, USA) y una proteína de fusión EphB3-Fc (R&D Systems). Se analizaron diferentes concentraciones (5 μ g/ml y 10 μ g/ml) del anticuerpo y de la proteína de fusión en el medio osteogénico, que se mantuvieron durante 7 días en los flasks T25 con las MSC a un 90% de confluencia en el cultivo. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y las células se levantaron con tripsina (tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1), congelándose para extraer su RNA con posterioridad. Para ello, se empleó un kit de extracción de RNA total (Biotools, España) y, una vez cuantificado, se retrotranscribieron 0,5 μ g a cDNA/tubo empleando un kit con una retrotranscriptasa de alta capacidad (Applied Biosystems). Con ese cDNA se realizó una PCR cuantitativa que permitía averiguar la cantidad de transcritos de los genes de interés que estaban presentes en las células analizadas. Los genes seleccionados para realizar este protocolo codifican para factores de transcripción relacionados con la diferenciación ósea de las MSC: Runx2, ALP y Dlx5. En varios tratamientos se observó un aumento de la expresión de varios de estos genes de diferenciación, respecto a la condición control, similar en ambas concentraciones por lo que se decidió continuar en el resto de los análisis con 5 μ g/mL de los reactivos bloqueantes (Figura 1).

35

Ejemplo 3.2. Análisis genético de la diferenciación osteogénica a 7 días con varios bloqueantes de EphB3 a 5 μ g/ml: anticuerpo policlonal anti-EphB3 (AF5667), anticuerpo monoclonal anti-EphB3 (MAB5667), anticuerpo monoclonal anti-EphB3 (MAB56671) y

proteína de fusión EphB3-Fc.

Todos los reactivos bloqueantes son comercializados por R&D Systems. En este caso, se utilizaron a una concentración de 5µg/ml, en medio osteogénico y durante 7 días,
5 para el análisis genético de la diferenciación.

Para analizar la diferenciación a corto plazo, se sembraron 150.000 células en cada flask T25, con 5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado como se indica en el Ejemplo 1. Tras alcanzar un 90% de confluencia, se comenzó a inducir la diferenciación
10 osteogénica empleando medio de cultivo MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (STEMCELL Technologies) y cada uno de los reactivos bloqueantes a analizar, a una concentración de 5µg/ml, que se mantuvieron durante 7 días. Posteriormente, las células se levantaron con tripsina (tal y como se ha descrito anteriormente) y se congelaron para extraer su RNA con posterioridad. Para ello, se siguió el mismo
15 protocolo descrito en el Ejemplo 3.1. Los genes seleccionados para realizar este protocolo codifican para factores de transcripción relacionados con la diferenciación ósea de las MSC: Runx2, ALP, Dlx5, SP7 y Msx2. En casi todos los genes se observó una mayor expresión en las MSC tratadas con anticuerpo policlonal anti-EphB3 (AF5667) y EphB3-Fc, al compararlas con la condición control en la que sólo se utilizó
20 medio osteogénico (Figura 2).

Ejemplo 3.3. Análisis histológico de la diferenciación osteogénica a 21 días con varios bloqueantes de EphB3 a 5µg/ml: anticuerpo policlonal anti-EphB3 (AF5667), anticuerpo monoclonal anti-EphB3 (MAB5667), anticuerpo monoclonal anti-EphB3 (MAB56671) y
25 proteína de fusión EphB3-Fc.

Para comprobar la duración necesaria del bloqueo de la señalización de EphB3, se analizó la diferenciación tras 21 días de cultivo en medio osteogénico, en diferentes condiciones. Se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de cultivo P24 con 500µl
30 de medio DMEM suplementado como se describe en el Ejemplo 1, hasta alcanzar aproximadamente un 90% de confluencia. Seguidamente, se incorporaron a las MSC los distintos tratamientos previamente mencionados, de la siguiente forma:

- 7 días en medio osteogénico con cada uno de los reactivos bloqueantes estudiados, a 5µg/ml, seguidos de 14 días más sólo con medio osteogénico.

- 14 días en medio osteogénico con cada uno de los reactivos bloqueantes estudiados, a 5µg/ml, seguidos de 7 días más sólo con medio osteogénico.

En todos los casos, se cambiaron los medios de cultivo correspondientes cada 7 días.

5 Además de los distintos tratamientos, en estos ensayos se realizaron dos controles: uno en el que las MSC se mantuvieron en DMEM suplementado, como se indica en el Ejemplo1, durante los 21 días y otro en el que crecieron con medio osteogénico, pero sin agregar los bloqueantes.

10 Transcurridos los 21 días de cultivo, se fijaron las células durante 1h a 4°C con etanol 70% frío. Seguidamente, se lavaron dos veces los pocillos con PBS 1X y se agregó la solución de trabajo de Rojo de Alizarina (1g de *Alizarin Red* sólido + 50ml de agua destilada y pH 4.1), dejándose durante 20 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron dos veces con agua destilada estéril.

15 Para cuantificar colorimétricamente la tinción, se lavaron las células con agua una vez más y se incubaron con una solución de CPC 10% (1g de cloruro de cetilpiridina en 10ml de fosfato de sodio 10mM, pH7), durante 20 minutos en agitación horizontal y a temperatura ambiente. Para finalizar, se pusieron 20µl de cada tratamiento en una placa
20 de ELISA P96, se diluyeron con 180µl de la solución de CPC 10% y se cuantificaron en un lector de ELISA a 562nm. Se utilizó como blanco la solución de CPC 10% y los valores obtenidos en cada tratamiento se referenciaron a una curva patrón, hecha con concentraciones conocidas de Rojo de Alizarina diluido en CPC 10%.

25 En todos los casos se observó un aumento de la cantidad de Rojo de Alizarina al bloquear la señal de EphB3, siendo significativo en los tratamientos con el anticuerpo policlonal AF5667 y con EphB3-Fc, tanto a 7 como 14 días, comparando con la condición control de medio osteogénico (Figura 3).

30 **Ejemplo 4. Diferenciación de línea celular hTERT con sobreexpresión de EphB3.**

En este caso, se utilizó una línea celular de MSC humanas (hTERT, cedida por el Hospital Universitario de Valladolid), transducida con un vector lentiviral para sobreexpresar el gen EphB3 humano y dos genes reporteros: proteína fluorescente roja (RFP) y resistencia a blasticidina, obteniéndose la línea celular hTertMSC-EphB3. Como
35 control se emplearon hTERT (hTertMSC-Control) transducidas sólo con los genes

reporteros. Para enriquecer las poblaciones deseadas, se añadió blasticidina (5ug/mL) al medio de cultivo empleado (DMEM suplementado, descrito en el Ejemplo 1) y, una vez expandidas, se aislaron las células RFP⁺, tanto de la población control como de la que sobreexpresaba EphB3, empleando un citómetro separador FACSAria (Becton Dickinson, CA, USA). Antes de comenzar los análisis de diferenciación se comprobó por RT-qPCR que las células efectivamente sobreexpresaban EphB3.

Para los ensayos de diferenciación, se sembraron 150.000 células de cada tipo (hTertMSC-EphB3 y hTertMSC-Control) en sendos flasks T25 con DMEM suplementado y una vez alcanzado el 90% de confluencia, se sustituyó el DMEM por medio MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (STEMCELL Technologies), que se mantuvo durante 7 días. Transcurrido este tiempo, las células se levantaron con tripsina (tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1) y se congelaron para extraer su RNA con posterioridad.

Para realizar la extracción de RNA, se siguió el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 3.1. Los genes seleccionados para realizar este protocolo codifican para factores de transcripción relacionados con la diferenciación ósea de las MSC: RunX2, ALP, SP7, Msx2 y Dlx5. Se observó que las hTERT que sobreexpresaban EphB3 (hTertMSC-EphB3) presentaban una menor expresión de todos los genes evaluados con actividad pro-osteogénica, comparadas con la condición control, siendo significativamente más baja en RunX2, ALP y SP7 (Figura 4).

Por otro lado, también se analizó la diferenciación histológica tras 14 días de cultivo en medio osteogénico. Para ello, se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de cultivo P24, con 500µl de medio DMEM suplementado como se describe en el Ejemplo 1 hasta alcanzar una confluencia aproximada del 90%. Seguidamente, comenzó el tratamiento con medio osteogénico MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (STEMCELL Technologies) que se mantuvo durante 14 días, cambiándolo cada 3-4 días.

Transcurridos 14 días de cultivo, se fijaron las células durante 1h a 4°C con etanol 70% frío. Seguidamente, para valorar la osteogénesis se procedió a la tinción con Rojo de Alizarina y CPC, siguiendo el mismo método que el descrito en el Ejemplo 3.3.

35

En este caso se obtuvo una cantidad significativamente menor de Rojo de Alizarina en las hTERT que sobreexpresaban EphB3 comparado con las células control (Figura 5).

Ejemplo 5. Análisis genético e histológico de la diferenciación osteogénica en ratones EphB3 *knockout*.

5 Se analizaron MSC procedentes de tejido adiposo de ratones silvestres (WT) y ratones *knockout* deficientes en EphB3 (EphB3^{-/-}), que fueron aisladas siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 1. Se pusieron en cultivo y se dieron repetidos pases hasta comprobar su fenotipo por citometría de flujo. Una vez preparadas las células (entre los
10 pases 3 y 6), se sembraron a una densidad de 6.000 cél/cm² en flasks T25 y en placas P24, con medio MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (STEMCELL Technologies), para analizar por RT-qPCR (como ya se ha descrito en el ejemplo 4) y por tinción con Rojo de Alizarina (como se ha descrito en el ejemplo 3.3), respectivamente. Las MSC de los T25 estuvieron 7 días en cultivo, mientras que las de la tinción histológica
15 estuvieron 21 días, renovándoles el medio una vez a la semana.

Mediante RT-qPCR, se encontró un aumento significativo de la expresión de varios de los genes pro-osteogénicos analizados (RunX2, Msx2 y Osx; Figura 6), en las MSC EphB3^{-/-}, respecto a las células WT.

20

En las tinciones histológicas, también encontramos claras evidencias de una mayor acumulación de fosfato cálcico en los pocillos con células EphB3^{-/-}, cuantificados mediante la tinción con Rojo de Alizarina (Figura 7).

Ejemplo 6. Ensayos *in vivo* en dos modelos murinos de osteoporosis.

Se utilizaron dos modelos animales de osteoporosis emulando las dos causas más frecuentes de aparición de la osteoporosis en humanos: disminución de los niveles de estrógenos y tratamiento prolongado con glucocorticoides.

30 El primer modelo se basa en la pérdida de tejido óseo que produce la bajada en los niveles de estrógenos, debido al aumento en la actividad osteoclástica y a la disminución de la diferenciación de los osteoblastos (algo similar a lo que ocurre en la menopausia humana). Para conseguir este descenso hormonal en los ratones, se realizó una ovariectomía bilateral (OVX). Brevemente, se anestesió a los ratones hembra de dos
35 meses de edad, con una mezcla de xilacina y ketamina, y se realizaron dos cortes en

piel y músculo para exponer los ovarios y extirparlos con ayuda de un bisturí caliente (para cauterizar los vasos sanguíneos) y una pinza. Posteriormente, se suturaron las incisiones y se mantuvieron los ratones durante 2 meses hasta que se analizaron.

5 El segundo modelo está basado en el efecto de los glucocorticoides sobre el proceso de remodelación ósea, ya que aumentan la supervivencia y activación de los osteoclastos provocando un aumento de la degradación de hueso. Se emplearon ratones hembra de dos meses de edad que fueron tratadas con 2,5mg/kg/día de dexametasona (DEX) durante 14 días, inyectada por vía intraperitoneal, y se analizaron
10 al día siguiente de finalizar el tratamiento.

Ambos procedimientos experimentales se realizaron en ratones WT y EphB3^{-/-}.

Todos los animales tratados fueron sacrificados por dislocación cervical, extrayéndoles
15 el fémur izquierdo y la segunda vértebra lumbar, para ser analizados mediante microtomografía de rayos-X (microCT) (Figura 8A).

En ambos modelos patológicos, se determinó que los ratones WT presentaban el fenotipo osteoporótico esperado, mostrando una disminución significativa tanto del
20 volumen óseo (BV/TV), calculado como la relación del volumen de hueso (BV) y el volumen total (TV) de la sección analizada, como del grosor de las trabéculas (Tb.Th) en fémur y vértebra, que se cuantificaron mediante el *software* BoneJ (GitHub) (Figura 8B y C).

25 Sin embargo, los ratones EphB3^{-/-} no presentaban diferencias entre los controles sanos y cualquiera de los animales con inducción de la osteoporosis (OVX o DEX), en ninguno de los parámetros analizados (Figura 8A, B y C). Esto nos permite concluir que la falta de EphB3 en estos ratones evita que presenten el fenotipo osteoporótico típico que sí observamos en los ratones WT.

30

REIVINDICACIONES

1. Método para potenciar la diferenciación osteogénica de células estromales mesenquimales (MSC) aisladas y cultivadas *in vitro* y obtener células del linaje osteogénico que incluye los siguientes pasos:
- 5
- 1) alcanzada una confluencia entre células del 80-90% sustituir el medio de cultivo utilizado para cultivar las MSC por un medio osteogénico y añadir un reactivo bloqueante del receptor EphB3;
 - 2) incubar durante al menos 7 días.
- 10
2. Método para potenciar la diferenciación osteogénica de MSC, según la reivindicación 1, en el que el cultivo *in vitro* de las MSC aisladas se realiza en un medio de cultivo que favorece la proliferación de MSC.
- 15
3. Método para potenciar la diferenciación osteogénica de MSC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso 1) se realiza cuando las células alcanzan una confluencia del 90%.
4. Método para potenciar la diferenciación osteogénica de MSC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se renueva el medio osteogénico con el reactivo bloqueante del receptor EphB3, al menos, cada 7 días.
- 20
5. Método para potenciar la diferenciación osteogénica de MSC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células son de mamífero.
- 25
6. Método para potenciar la diferenciación osteogénica de MSC, según la reivindicación 5, en el que el mamífero es humano.
7. Células MSC obtenidas según el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o fracturas óseas.
- 30
8. Células MSC obtenidas según el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso según la reivindicación 7 en el que las patologías óseas con deficiencia de tejido óseo pertenecen al grupo que comprende: osteoporosis
- 35

primaria, osteoporosis inducida por fármacos, osteopenia, osteogénesis imperfecta, enfermedad renal crónica, hipertiroidismo, celiaquía.

5 9. Reactivo, elemento, compuesto, molécula y/o molécula modificada bloqueante del receptor EphB3 para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o fracturas óseas.

10 10. Reactivo, compuesto y/o molécula bloqueante del receptor EphB3, según la reivindicación 9, seleccionado del grupo formado por: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión o combinaciones de los mismos.

15 11. Reactivo, compuesto y/o molécula bloqueante del receptor EphB3, según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde las patologías óseas con deficiencia de tejido óseo pertenecen al grupo que comprende: osteoporosis primaria, osteoporosis inducida por fármacos, osteopenia, osteogénesis imperfecta, enfermedad renal crónica, hipertiroidismo, celiaquía.

20 12. Reactivo, compuesto y/o molécula bloqueante del receptor EphB3, según cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para su uso en un mamífero.

13. Reactivo, compuesto y/o molécula bloqueante del receptor EphB3, según la reivindicación 12, donde el mamífero es humano.

25 14. Composición farmacéutica que incluye un reactivo, un elemento, un compuesto, una molécula y/o una molécula modificada bloqueante del receptor EphB3 para su uso en el tratamiento de patologías óseas con deficiencia de tejido óseo y/o de fracturas óseas.

30 15. Composición farmacéutica, según la reivindicación 14, donde el reactivo, elemento, compuesto, molécula y/o molécula modificada bloqueante del receptor EphB3 se selecciona del grupo formado por: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión o combinaciones de los mismos.

35 16. Composición farmacéutica que incluye células del linaje osteogénico obtenidas según el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

17. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14-15 que incluye células del linaje osteogénico obtenidas según el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 5 18. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, donde las patologías óseas con deficiencia de tejido óseo pertenecen al grupo que comprende: osteoporosis primaria, osteoporosis inducida por fármacos, osteopenia, osteogénesis imperfecta, enfermedad renal crónica, hipertiroidismo, celiaquía.

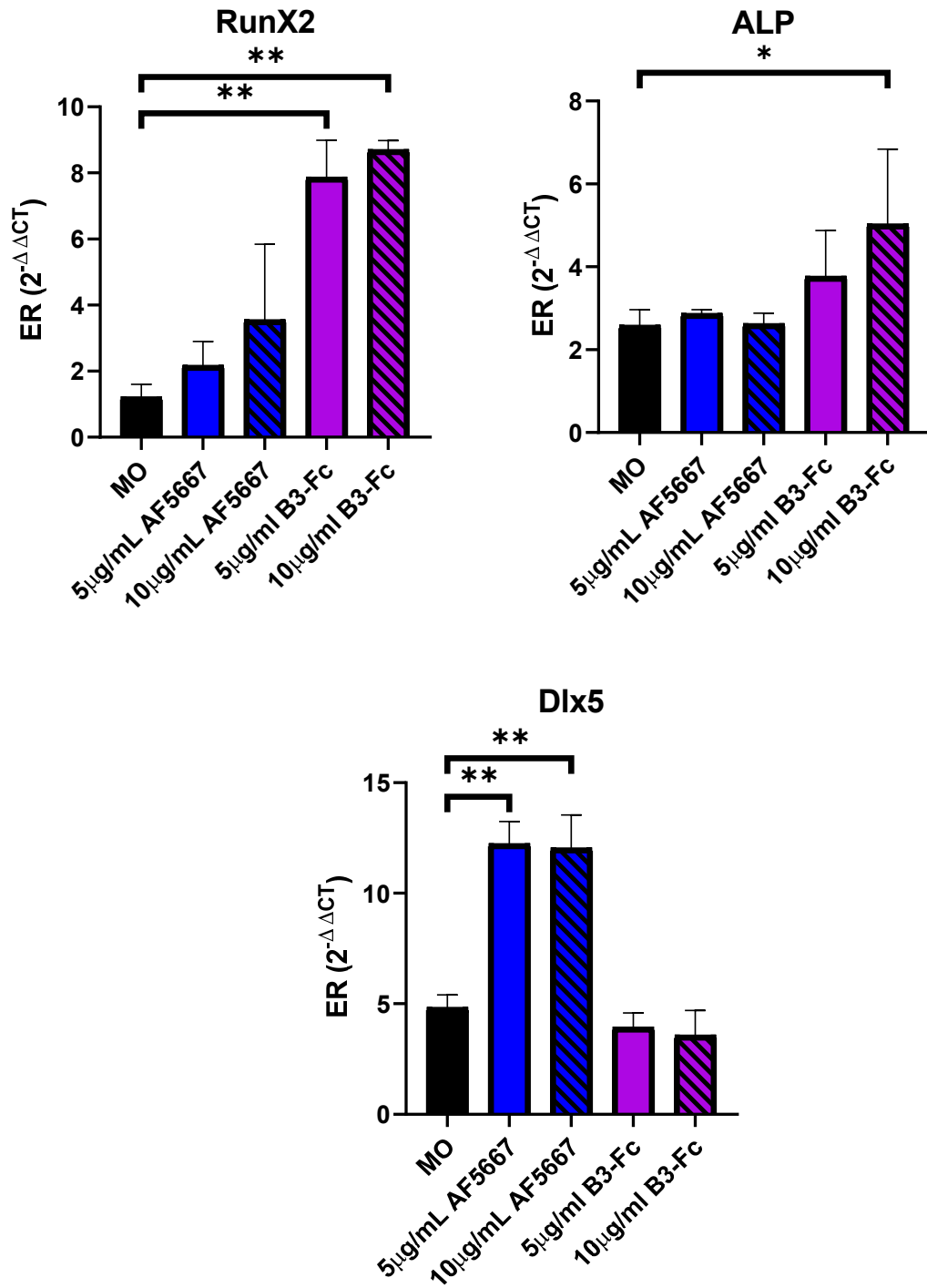


Fig. 1

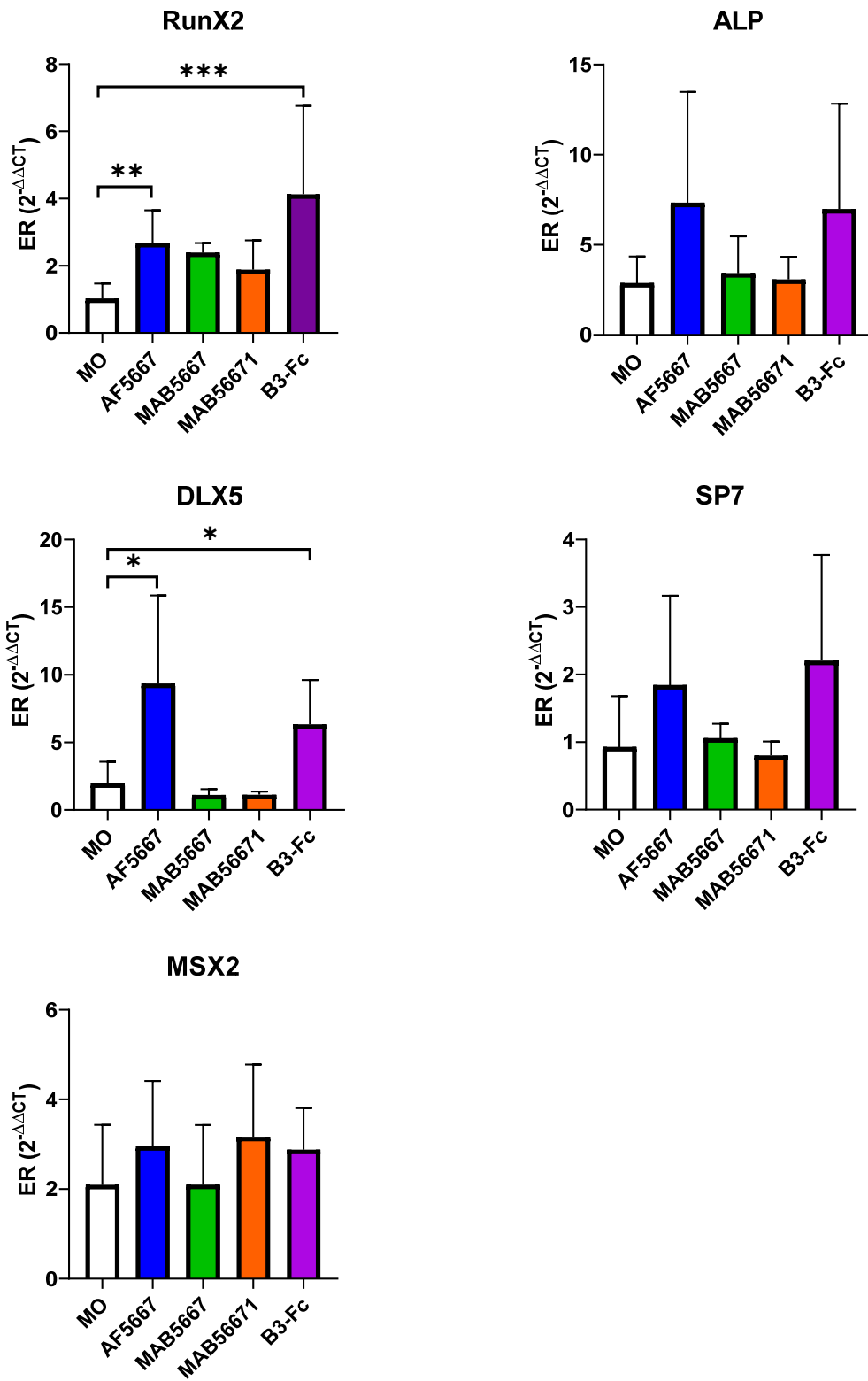


Fig. 2

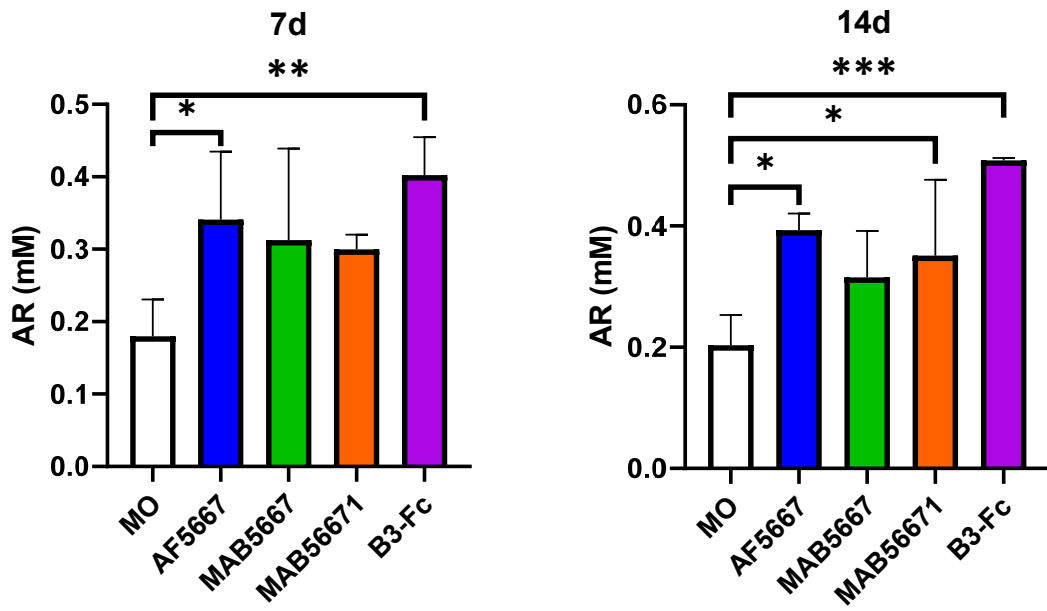


Fig. 3

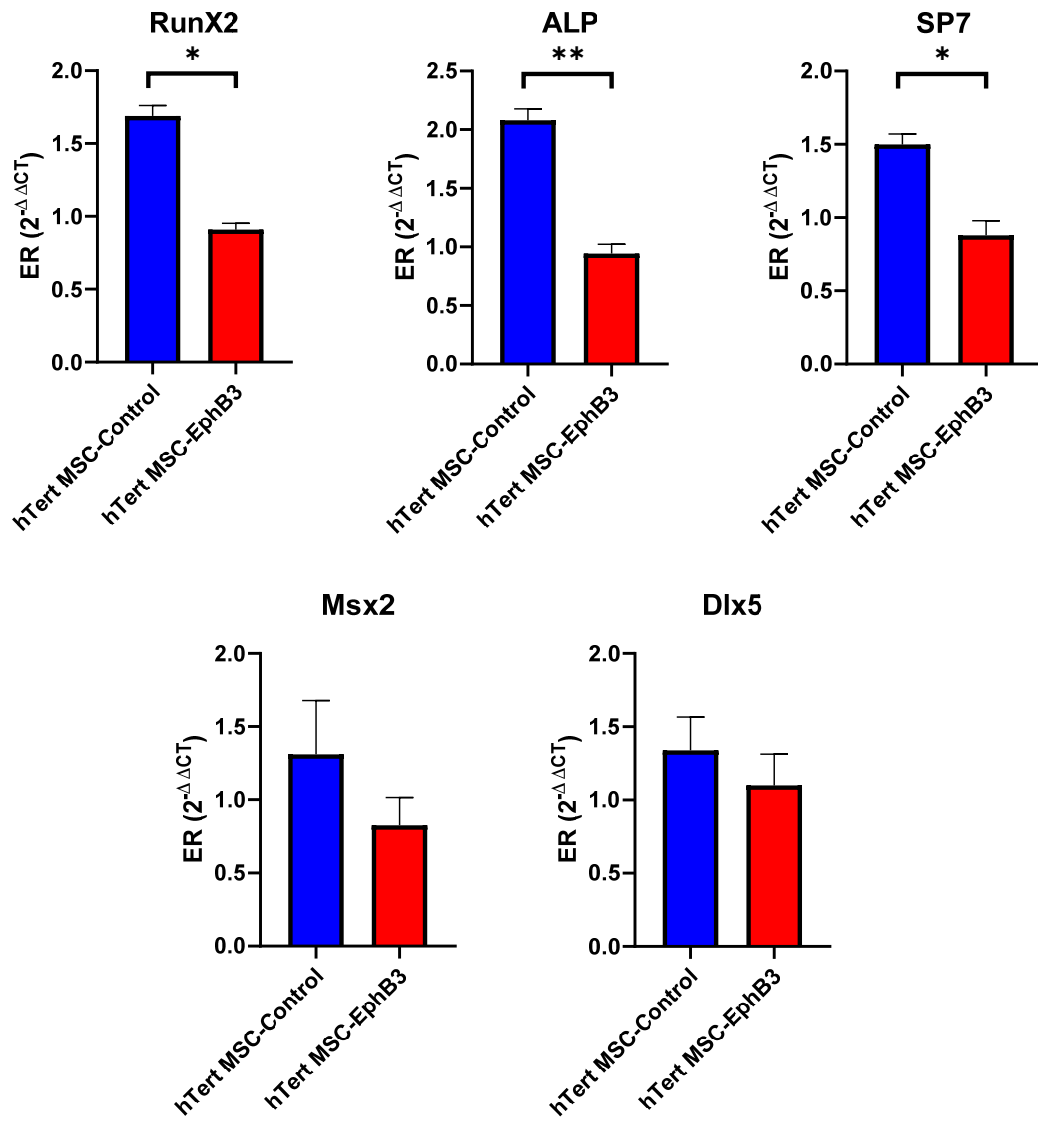


Fig. 4

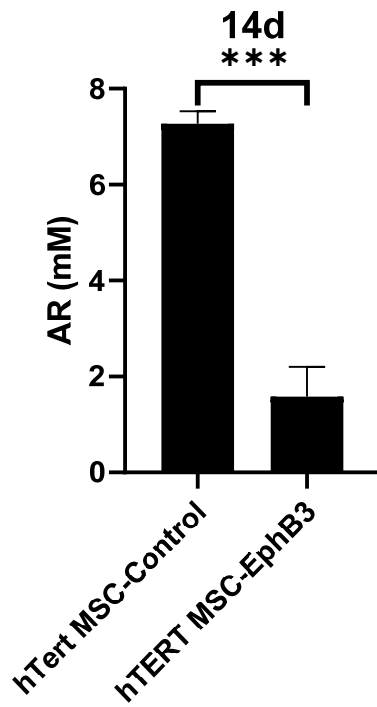


Fig. 5

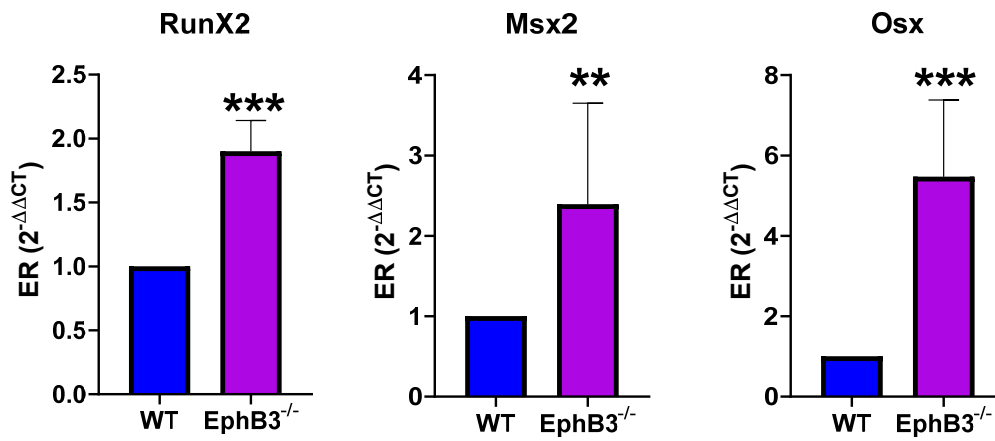


Fig. 6

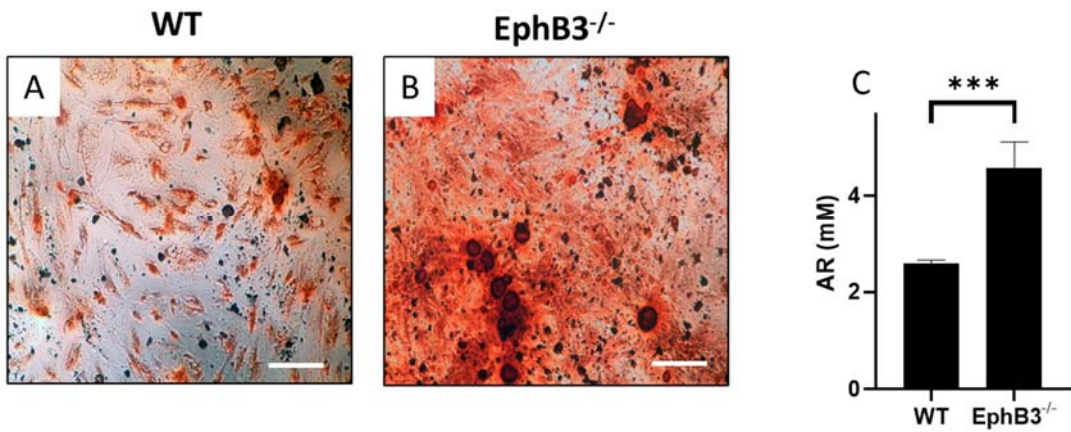


Fig. 7

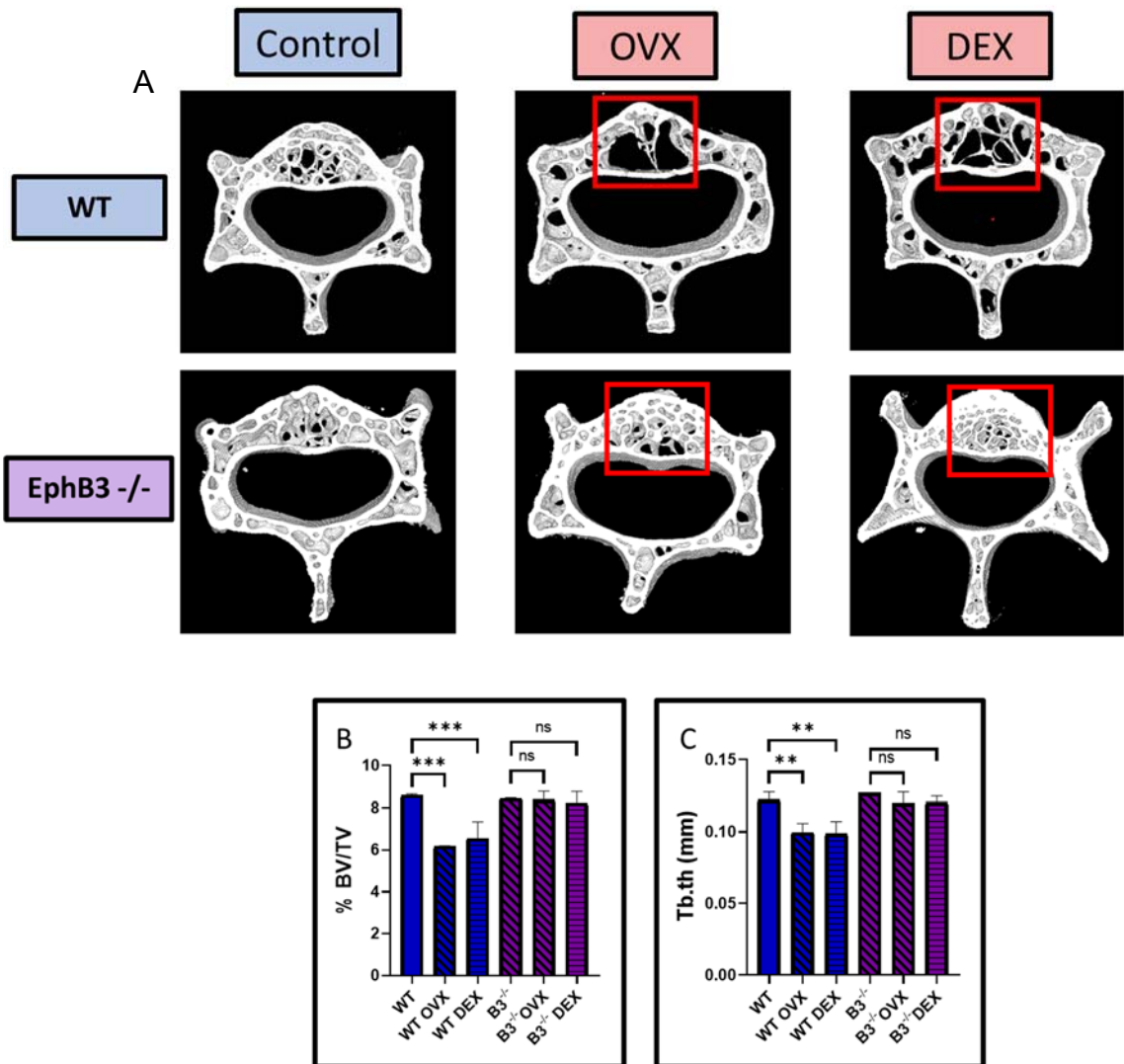


Fig. 8