

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 300**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2008 E 08702053 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2111447**

54 Título: **Método para aislar una célula madre humana a partir de toda la profundidad del tejido cartilaginoso**

30 Prioridad:

08.02.2007 GB 0702401

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LIMITED (100.0%)
30-36 NEWPORT ROAD
CARDIFF CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**ARCHER, CHARLES, WILLIAM;
HAVEN, SAMANTHA, NICHOLA y
DOWTHWAITE, GARY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 300 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aislar una célula madre humana a partir de toda la profundidad del tejido cartilaginoso

5 La solicitud describe una célula madre humana, y en particular una célula madre de cartílago articular; una población de células derivadas de ella; un método para la producción de dicha célula madre y dicha población de células madre; el uso de dicha célula madre y dicha población de células en la reparación de tejidos, y en particular la reparación del tejido conectivo, y más específicamente la reparación de articulaciones; y un implante que comprende o que incluye dicha célula madre o dicha población de células.

Introducción

10 El cartílago articular es avascular, aneural y no contiene vasos linfáticos, y tiene un nivel bajo de actividad metabólica en comparación con otros tejidos conectivos tales como el músculo, pero se puede considerar activo por una célula que depende en gran medida de la glicolisis para obtener energía. También tiene una matriz extracelular considerable, de la que depende para proporcionar al cartílago sus propiedades características de articulación indolora de baja fricción. Los dos constituyentes principales del cartílago articular son el condrocito sumamente especializado, que es exclusivo del cartílago, y la matriz, compuesta por una estructura compleja interconectada de proteoglicanos, colágenos y proteínas no colagenosas (Buckwalter y Hunziker, 1999).

15 El cartílago articular se puede dividir en cuatro zonas principales por su profundidad. Estas son las zonas de cartílago superficial; de transición; radial superior e inferior; y calcificado, que van desde la superficie articular externa hasta el hueso subcondral profundo, respectivamente. Aunque las zonas nombradas están presentes, no hay límites 'exactos', que se puedan visualizar entre las zonas. En cada zona hay variaciones biomecánicas y morfológicas (Dowthwaite *et al*, 2004), que incluyen diferencias en la morfología celular (tamaño y forma), empaquetamiento celular, actividad metabólica y el grosor de las capas. También existen diferencias de composición de la matriz entre las zonas, con variaciones de los tipos y cantidades de los diversos colágenos, proteoglicanos, y proteínas no colagenosas.

20 Como máximo, el cartílago articular tiene un grosor de unos pocos milímetros solamente, pero puede alcanzar hasta 7 mm en las articulaciones grandes, tales como la cadera. A pesar de tener un grosor de solamente unos cuantos milímetros, todavía consigue proporcionar resistencia a la compresión, y muestra la capacidad de distribuir las cargas, por lo que, a su vez, reduce las tensiones elevadas localizadas sobre el hueso subcondral (Buckwalter y Hunziker, 1999).

Condrocitos

30 El cartílago articular normal contiene un tipo de células, el condrocito sumamente especializado rodeado por la matriz extracelular (Buckwalter, 1998). En la mayoría de los casos, el condrocito está "aislado citoplásmicamente" (Archer y Francis-West, 2003) de sus células adyacentes, y casi nunca forma contactos célula-célula excepto en la parte más superficial del tejido. Cada condrocito, por lo tanto, está completamente rodeado por la matriz con la que interacciona libremente. Los condrocitos difieren en su morfología y actividades metabólicas entre las zonas del cartílago articular. En general, el condrocito tiene una morfología redondeada o poligonal, excepto en los límites tisulares en los que puede aparecer aplanado o discoide, es decir, en la superficie articular de las articulaciones (Archer y Francis-West, 2003). El papel principal del condrocito es el mantenimiento de la matriz extracelular intrincada del cartílago, en particular las estructuras hidrófilas solubles, tales como hialuronano y agregano (Knudson, 2003). Intracelularmente, el condrocito contiene orgánulos que son típicos de los de una célula metabólicamente activa (Archer y Francis-West, 2003) que desempeñan un papel fundamental en la síntesis de la matriz, funcionando continuamente para sintetizar y sustituir una gran proporción de matriz respecto del volumen, principalmente compuesta de proteoglicanos, glicosaminoglicanos y colágenos (Buckwalter y Hunziker, 1999). Algunos condrocitos contienen además prolongaciones cortas o microvellosidades, que pueden detectar alteraciones mecánicas en la matriz. Esto se consigue a medida que se prolongan desde la célula directamente en la matriz. Los filamentos intracitoplasmáticos, lípidos, glicógeno y vesículas secretoras permiten que los condrocitos interactúen con la matriz. Los condrocitos maduros se distinguen fácilmente de otras células, ya que tienen una morfología esferoide. También tienen cantidades abundantes de colágeno tipo II, grandes proteoglicanos agregados y proteínas no colagenosas específicas entreteladas en una red, que forma una matriz cartilaginosa que cubre y rodea sus membranas celulares (Buckwalter y Hunziker, 1999).

50 **Zonas**

Zona superficial

55 La zona superficial (Figura 2) es extremadamente fina, y consiste en dos capas. La capa más superficial es acelular, y consiste en una película fina y clara de material amorfo conocida como lamina splendens que recubre una lámina de microfibrillas de colágeno tipo II finas y densamente empaquetadas (Buckwalter y Hunziker, 1999), y comprende en gran medida lubricina. La capa celular más profunda está compuesta de condrocitos aplanados, discoides encerrados dentro de una matriz rica en colágeno, que está situada en posición paralela a la superficie articular (Dowthwaite *et al*, 2003). Estas células sintetizan la matriz, que es abundante en colágeno, fibronectina y agua, y

baja en contenido de proteoglicanos en comparación con el de las zonas más profundas.

La capa densa de fibrillas de colágeno tiene una orientación paralela a la de la superficie, y proporciona al cartílago sus propiedades mecánicas características, que incluyen el tener una fuerza de tensión elevada y ser capaces de resistir la fuerza tangencial a la que se le somete (Buckwalter y Hunziker, 1999). La red de fibrillas de colágeno permite también el movimiento de moléculas hacia dentro y hacia fuera del cartílago, tales como anticuerpos y moléculas grandes del cartílago, respectivamente.

Diverso estudios han demostrado que la zona superficial del cartílago articular está implicada en la regulación del desarrollo y crecimiento del tejido. Los estudios de desarrollo en el laboratorio han identificado que el cartílago articular crece mediante el crecimiento aposicional desde la superficie articular (Hayes *et al* 2001), y que este método de crecimiento permite que se establezca la arquitectura zonal diferente de este tejido heterogéneo. Estos estudios también han demostrado que el crecimiento está controlado por una población de condrocitos que se dividen lentamente en la zona superficial del cartílago articular, y una población de células que se dividen más rápidamente en la zona de transición (Hayes *et al* 2001). Estas observaciones no solamente justifican la naturaleza aposicional del crecimiento del cartílago articular y la variación zonal, sino que también sugieren la presencia de una población de células progenitoras de condrocitos articulares específicas en la zona superficial y una población de células amplificadoras de transición en la zona de transición. Además, se ha descubierto que la zona superficial es un centro de señalización debido a la expresión de diversos factores de crecimiento y sus receptores, que desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis de la articulación diartrodial por medio de la síntesis de la matriz diferencial (Dowthwaite *et al*, 2003). También se ha demostrado *in vivo* que la zona superficial es responsable del crecimiento aposicional del cartílago articular (Hayes *et al*, 2001), y los estudios *in vitro* recientes han demostrado que la zona superficial del cartílago articular contiene una población de células progenitoras (Dowthwaite *et al*, 2004).

Además, la patente de EE.UU. 2006/0239980 describe que el cartílago articular obtenido de la zona superficial del tejido cartilaginoso humano se puede digerir enzimáticamente para producir una población de condrocitos que, por medio del cultivo, se pueden desdiferenciar hasta el tejido condroprogenitor. Sin embargo, no hay datos en este documento con respecto a la estabilidad fenotípica de este tejido, y no hay ninguna afirmación o indicación de que el tejido represente células madre aisladas, y por lo tanto es cuestionable el uso de este tejido desdiferenciado como fuente fiable de material para la reparación tisular.

En el pasado, se identificó una población de células condroprogenitoras en la zona superficial de cartílago articular bovino (Dowthwaite *et al* 2004). Esta población se obtuvo aprovechando la adhesión diferencial de los condrocitos bovinos a la fibronectina. Los condroprogenitores, además de caracterizarse por su adhesión incrementada a fibronectina, también tuvieron una eficacia de formación de colonias incrementada. Además, esta población condroprogenitora exhibió plasticidad en cuanto a su ruta de diferenciación cuando se ensayó *in ovo*. Las células condroprogenitoras bovinas se injertaron en diversos linajes de tejido conectivo de polluelo, tales como tendón y hueso, además de cartílago, y las células injertadas expresaron marcadores tisulares característicos tales como colágeno tipo I y, además, se orientaron de una manera funcional.

Recientemente, se han ampliado los estudios anteriores y se ha descubierto, sorprendentemente, que es posible aislar una población de células madre humanas, a partir de toda la profundidad del tejido cartilaginoso humano. Esto va contra la sabiduría convencional, que enseña que la responsable del crecimiento y desarrollo del tejido es la zona superficial, o superficie, del cartílago.

De hecho, los experimentos han demostrado que es posible aislar una población de células madre humanas a partir de la zona media, así como de la zona superficial, del tejido cartilaginoso.

Un aspecto adicionalmente sorprendente de este trabajo es el hecho de que las células madre derivaron de tejido humano envejecido. El cartílago humano envejecido tiende a ser más fino que el cartílago normal, y es menos activo metabólicamente.

Además, se ha descubierto que las células madre humanas aisladas parecen inmortales, ya que ya han superado 80 duplicaciones de población, y permanecen viables. Esto contrasta con los condroprogenitores bovinos anteriores que se aislaron previamente, que se caracterizaron por una duplicación de población de aproximadamente 50, en cuyo momento fueron evidentes varias características de la senescencia dependiente de la telomerasa. Estos hechos indican que los condroprogenitores bovinos no fueron células madre.

En contraste, estas células madre muestran auto-renovación; tal como se demuestra por las continuas duplicaciones de población. Para poner en contexto la cifra actual de 80 duplicaciones de población, se debe tener en cuenta que la cifra de Hayflick para la duplicación de población es 52. Leonard Hayflick, en 1965, observó que las células que se dividen en un cultivo celular se dividen alrededor de 50 veces antes de morir. Las células madre que tienen la capacidad de regenerar continuamente nuevas células sobreviven a toda la vida del organismo endógeno.

Además, se demostró que las células madre humanas todavía pueden producir cartílago cuando se cultivan en condiciones permisivas de cultivo de sedimento después de 70 duplicaciones de población.

Se deduce que las células madre humanas aisladas tienen la capacidad de experimentar una expresión masiva con vistas a proporcionar tejido conectivo nuevo y, de hecho, la cantidad de expansión es tal que se podría sustituir una porción o sección completa de tejido humano, tal como cartílago, mediante el uso de esta única fuente de células madre.

5 Además, las nuevas células madre exhiben plasticidad fenotípica, ya que estas células se pueden injertar de manera funcional en diversos tipos de tejido conectivo para producir diferentes tipos de tejido conectivo.

El aislamiento del nuevo tejido implica la explotación de una característica única del tejido. Esta es la expresión de una secuencia proteica que se une de manera selectiva con una afinidad excepcionalmente elevada a una secuencia RGD de fibronectina. La secuencia RGD de fibronectina comprende los aminoácidos Arginina, Glicina y 10 Ácido Aspártico. Varias células tienen la capacidad de unirse a esta secuencia si se cultivan durante una cantidad suficiente de tiempo (generalmente horas). En contraste, las células madre, incluso después de un aislamiento enzimático bastante agresivo, se unen a la secuencia en minutos y, de hecho, después de 20 minutos, es posible aislar una colonia que comprende las células madre humanas.

Finalmente, el tejido diferenciado de esta fuente de células madre expresa al menos una proteína estructuralmente 15 relevante, concretamente colágeno Tipo I, cuando se injerta en el tejido conectivo de polluelos en desarrollo.

La referencia en la presente memoria a la expresión célula madre incluye la referencia a una célula que puede producir continuamente células hijas inalteradas y que también tiene la capacidad de producir células hijas que tienen diferentes propiedades más limitadas.

La referencia en la presente memoria a una célula progenitora incluye la referencia a una célula en división con la 20 capacidad de diferenciarse, e incluye las supuestas células madre en las que todavía no se ha demostrado la auto-renovación.

Como será evidente para los expertos en la técnica, el tejido cartilaginoso tiene una capacidad limitada de auto-reparación. Existen varias limitaciones sobre la capacidad del cartílago de repararse a sí mismo en cuanto al restablecimiento de una articulación diartrodial funcional a largo plazo. El tejido de reparación condral tiene una 25 estructura y composición intermedias entre el cartílago hialino y el fibrocartílago, que raramente, si lo hace, reproduce la estructura real del cartílago articular. Existe una alteración en la orientación y la organización de las fibrillas de colágeno, la incapacidad de hacer interacciones importantes entre macromoléculas, en particular los proteoglicanos y la red fibrilar de colágeno, lo que da como resultado una disminución de la rigidez y la capacidad de resistir cargas de compresión. Un factor importante que contribuye a la baja capacidad reparadora del cartílago articular es que el tejido es avascular y aneural. 30

Se están desarrollando tratamientos para intentar superar los problemas que se afrontan cuando se intentan tratar los defectos del cartílago articular. Los tratamientos potenciales necesitan integrarse de manera eficaz en un tejido con un defecto que tiene las mismas propiedades mecánicas estructurales que el cartílago articular. Los tratamientos de trasplante basados en células actuales implican el uso de condrocitos autólogos amplificados para el trasplante 35 en el defecto para generar un tejido reparativo que con suerte sea similar al del cartílago articular nativo. Este tratamiento de trasplante basado en células se conoce como Implantación de Condrocitos Autólogos (ACI) y fue descrito por Brittberg *et al* (1994) para el tratamiento de los defectos de todo el grosor del cartílago. El problema de esta técnica es que implica la extracción de cartílago articular sano de una región no lesionada que no soporte peso de la articulación. La investigación actual está dirigiéndose al uso potencial de células madre mesenquimatosas (MSCs) como fuente de células para el uso en la modificación de tejidos y su infiltración en estructuras biodegradables. Se ha centrado la atención de manera exhaustiva en las MSCs derivadas de médula ósea, pero 40 actualmente se están considerando otros muchos tipos de tejidos como fuentes de MSC, tales como cartílago y líquido sinovial.

Se deduce que las células madre tienen un uso significativo en la reparación del cartílago. Sin embargo, las células madre se podrían usar para la reparación de otras formas de tejido conectivo, tales como ligamentos, piel o hueso. 45

Además, aunque las células madre son adecuadas para la reparación autóloga, en particular la reparación del cartílago, estas células también se podrían usar de manera alogénica, ya que se ha demostrado que otras muchas células madre son inmunosupresoras.

Declaraciones de la Invención

50 Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona una célula madre humana aislada de cartílago humano envejecido.

La referencia en la presente memoria al cartílago humano envejecido incluye la referencia al cartílago de un adulto, y lo más preferiblemente un adulto maduro o un adulto cuyo cartílago tiende a ser más fino que el cartílago normal y/o es menos activo metabólicamente.

55 Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona una célula madre humana aislada a partir de toda la

profundidad del tejido cartilaginoso.

En una realización preferida de la invención, dicha célula madre humana se aísla de la zona superficial o media del tejido cartilaginoso, o de ambas.

5 La referencia en la presente memoria a la 'toda la profundidad del tejido cartilaginoso' significa que se usa la totalidad de la profundidad del tejido desde la superficie hasta la base como fuente de la célula madre.

Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona una célula madre humana que se caracteriza por uno o más de los siguientes rasgos:

1. su aislamiento a partir de toda la profundidad del cartílago articular humano;
- 10 2. su aislamiento mediante adhesión de afinidad elevada a fibronectina o un fragmento de la misma que contiene la secuencia RGD;
3. una duplicación de población mayor de 52;
4. la capacidad de diferenciarse hasta cualquier tipo de tejido conectivo;
5. la expresión de uno o más de los siguientes marcadores de células madre: STRO1, MSX1 o notch 1;
6. su aislamiento a partir de cartílago humano envejecido.

15 Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona una población de células de tejido conectivo humano derivadas de la célula madre anterior.

Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona el uso de la célula madre anteriormente descrita en la reparación de tejidos.

20 Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona el uso de una población de células de tejido conectivo humano derivadas de la célula madre descrita en la presente memoria en la reparación de tejidos.

Según las enseñanzas de la presente memoria, se proporciona un implante para el uso en la reparación de tejidos, que comprende una célula madre, o una población de células derivadas de ella, como se describe en la presente memoria.

Según la invención, se proporciona un método para aislar una célula madre humana que comprende:

- 25 a) digerir el tejido cartilaginoso articular humano obtenido a partir de toda la profundidad del tejido cartilaginoso para liberar los condrocitos, mediante el uso de enzimas;
- b) exponer a los condrocitos aislados a fibronectina y/o un fragmento de la misma que contiene la secuencia RGD; y
- c) aislar las células que se unen a fibronectina o a dicho fragmento.

30 En un método preferido de la invención, dichos condrocitos liberados se cultivan con fibronectina o una secuencia RGD, tal como un fragmento de fibronectina que contiene la misma.

35 En un método adicionalmente preferido de la invención, dicho cartílago articular se digiere con una combinación de pronasa y colagenasa, y más preferiblemente el cartílago articular se expone a 70 unidades/ml de pronasa durante 3 horas a 37 °C, seguido de la exposición a 300 unidades/ml de colagenasa durante un periodo más largo, en general durante la noche, a 37 °C.

En un aspecto adicional de la invención, los condrocitos digeridos se filtran o se centrifugan para aislar el tejido condrocítico.

Cuando tiene lugar una centrifugación, se realiza a 2000 rpm durante 5 minutos.

Los condrocitos aislados, preferiblemente, se siembran después en pocillos revestidos con fibronectina.

40 En un método preferido de la invención, el tejido cartilaginoso articular es tejido envejecido o cartílago de un adulto.

La invención se describirá a continuación con referencia a las figuras siguientes, en las que:

la Figura 1 muestra una sección a través del tejido cartilaginoso

la Figura 2A muestra la adhesión inicial de condrocitos humanos a fibronectina. Se observó que una cohorte de condrocitos se adhirió a fibronectina en 20 minutos en comparación con los controles ($p < 0,05$);

la Figura 2B muestra que los condrocitos que se adhieren a fibronectina en 20 minutos pueden formar colonias que consisten en más de 32 células en 8 días y, además, el número de colonias se incrementa con el tiempo en cultivo en comparación con los controles ($p < 0,05$);

5 la Figura 2C muestra que las células madre humanas derivadas de manera clonal o los condroprogenitores se pueden sub-cultivar de manera exhaustiva y experimentar más de 80 duplicaciones de población;

10 la Figura 3 muestra vistas de células clonales derivadas de la adhesión diferencial a fibronectina y células sin seleccionar del mismo paciente que se inmunomarcaron con anticuerpos hacia la molécula de señalización superficial celular Notch 1, el marcador de células madre STRO1 y el factor de transcripción MSX1. En las líneas celulares clonales, cada célula se marcó con anticuerpo hacia Notch 1 y Stro 1 y la mayoría de células se marcaron con anticuerpo hacia MSX1. En contraste, los cultivos en monocapa contuvieron menos células marcadas con anticuerpos hacia los marcadores de células madre STRO1, Notch 1 y MSX1 (Fig. 3A-C);

15 la Figura 4 muestra que mediante el uso de un ensayo *in ovo*, se demostró que las células madre de cartílago derivadas de manera clonal se injertaron en diversos tejidos de polluelo que incluyeron hueso, tendón y cartílago, y se demostró que dichas células madre injertadas sintetizaron una proteína estructuralmente relevante, concretamente colágeno tipo I humano (Figura 4); y

20 la Figura 5 muestra cortes en parafina de tejido humano envejecido marcados con un anticuerpo hacia el factor de transcripción MSX1 (N20, Santa Cruz Biotechnology; $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ en PBS durante 1 hora) y detectado con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a FITC (Sigma; 1:100 en PBS durante 1 hora). Las células positivas para MSX 1 estuvieron presentes en las zonas superficial y media del tejido, lo que sugiere que aquí es donde residen las células madre en el tejido. Las flechas indican el marcaje intracelular positivo.

Materiales y Métodos

Se revistieron placas de 12 pocillos con $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de fibronectina plasmática (Sigma, R.U.) en PBS que contenía MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM (PBS+) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con un 1% de BSA (Sigma) en PBS+ antes de añadir los condrocitos. Las placas de control se trataron con PBS+ durante la noche a 4 °C.

25 El tejido se obtuvo de pacientes que se sometieron a hemiartrótoma con una aprobación ética institucional completa. Se extrajo toda la profundidad del cartílago del cóndilo femoral macroscópicamente normal y se incubó en 1:1 de DMEM/F12 (Gibco) que contenía un 10% de FCS (Gibco) durante la noche. Los condrocitos se aislaron después mediante digestión secuencial con pronasa (Roche)/colagenasa (Sigma) como se describió previamente (Dowthwaite et al 2004). Brevemente, se incubaron fragmentos de cartílago con pronasa ($70 \text{ unidades ml}^{-1}$ en DMEM/F12 que contenía un 5% de FCS) durante 3 horas a 37 °C. La pronasa se eliminó y el cartílago se incubó con colagenasa ($300 \text{ unidades ml}^{-1}$ en DMEM/F12 que contenía un 5% de FCS) durante la noche a 37 °C. Los condrocitos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en DMEM exento de suero/F12 y se contaron. Tras el aislamiento, los condrocitos (1.000 ml^{-1}) se sembraron en pocillos individuales de placas de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos en 1:1 de DMEM/F12 que contenía un 0,1% de Gentamicina (DMEM/F12-). Después de 20 minutos, se eliminó el medio (y las células no adherentes) y se colocaron en una segunda placa durante 40 minutos a 37 °C antes de eliminar este medio (y las células no adherentes), y se colocaron en una tercera placa. Después de eliminar el medio a los 20 y 40 minutos, se añadió 1:1 de DMEM/F12 fresco que contenía un 0,1% de Gentamicina y un 10% de FCS (DMEM/F12+) a las células adherentes restantes, que se mantuvieron en cultivo hasta 17 días. Los controles comprendieron células sometidas a adhesión diferencial en placas revestidas con un 1 % de BSA en PBS+.

45 En 3 horas desde la colocación en las placas, se ensayó la adhesión inicial de los condrocitos contando el número total de células que se adherieron al fondo de la placa mediante el uso de un microscopio invertido equipado con una óptica de contraste de fases, y se expresó en forma de un porcentaje de la densidad de siembra inicial. Las colonias de condrocitos que consistieron en más de 32 células se contaron mediante el uso del mismo microscopio a los 8, 12, 14 y 17 días. La eficacia de formación de colonias (EFC) se calculó dividiendo el número de colonias por el número inicial de células adherentes.

Una vez que se formaron colonias que consistieron en más de 32 células, se identificaron en un microscopio óptico. Los clones se trataron con tripsina (0,25%; Gibco) y se subcultivaron de manera exhaustiva en DMEM/F12 + 10% de FCS. Se calculó el número de células en cada pase y se representó la dinámica de población.

50 Las líneas de células clonales se inmunomarcaron con anticuerpos hacia Notch 1 (C20, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$; Santa Cruz Biotechnology), STRO1 (sobrenadante TC claro, obsequio de R Oreffo, Universidad de Southampton) y MSX1 (N20, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$; Santa Cruz Biotechnology) después de fijarlas durante 5 minutos en un 95% de EtOH (Notch 1, STRO1) o un 10% de NBFS (MSX1). Los anticuerpos primarios se localizaron mediante el uso de anticuerpos relevantes conjugados de manera fluorescente y se observaron en un microscopio de fluorescencia.

55 Las líneas de células clonales se marcaron con Cell Tracker Green 10 μM (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se inyectaron en el brote del ala de embriones de polluelo de 3 días (HH St 12-14) en los que se habían practicado aberturas previamente. Los embriones se volvieron a sellar con cinta adhesiva y se incubaron durante

diversos períodos de tiempo hasta el día 10 (HH St 36-37), y las alas se fijaron en un 10% de NBFS y se procesaron para la incrustación en parafina. Las muestras se cortaron a 10 μm , se eliminó la parafina y se montaron en DPX antes de examinarlas con un microscopio fluorescente. Los cortes adicionales se inmunomarcaron con anticuerpo 5D8 (anti-colágeno tipo I humano; Abcam) y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

- 5 Tal como se muestra en la Figura 5, los cortes en parafina de tejido humano envejecido que se habían marcado con anticuerpo hacia el factor de transcripción MSX 1, un marcador de células madre, demostraron que las células madre estuvieron presentes en las zonas tanto superficial como media del tejido cartilaginoso. Esto va contra la sabiduría convencional, que suponía que las células madre estaban presentes solamente en la superficie del tejido cartilaginoso.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una célula madre humana que comprende:
 - (a) digerir el tejido cartilaginoso articular humano aislado obtenido a partir de toda la profundidad del tejido cartilaginoso para liberar los condrocitos, mediante el uso de enzimas;
- 5 (b) exponer a los condrocitos aislados a fibronectina y/o un fragmento de la misma que contiene la secuencia RGD; y
- (d) aislar las células que se unen a fibronectina o a dicho fragmento.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que en la parte (b) dichos condrocitos liberados se cultivan con fibronectina o una secuencia RGD, tal como un fragmento de fibronectina que contiene la misma.
- 10 3. Un método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que en la parte (a) de la reivindicación 1 dicho cartílago articular se digiere con una combinación de pronasa y colagenasa.
4. Un método según las reivindicaciones 1-3, en el que en la parte (a) de la reivindicación 1 dicho cartílago digerido se filtra o se centrifuga para aislar dichos condrocitos.
- 15 5. Un método según las reivindicaciones 1-4, en el que en la parte (a) de la reivindicación 1 el tejido cartilaginoso articular mencionado es el cartílago de un adulto.

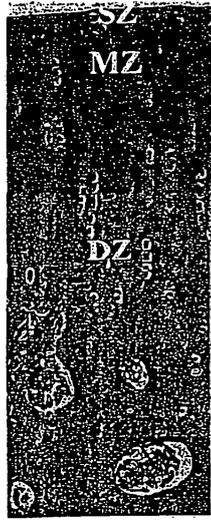


FIGURA 1

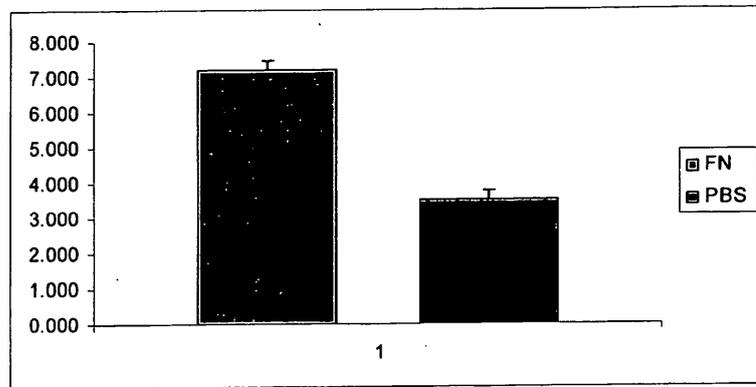


FIGURA 2A

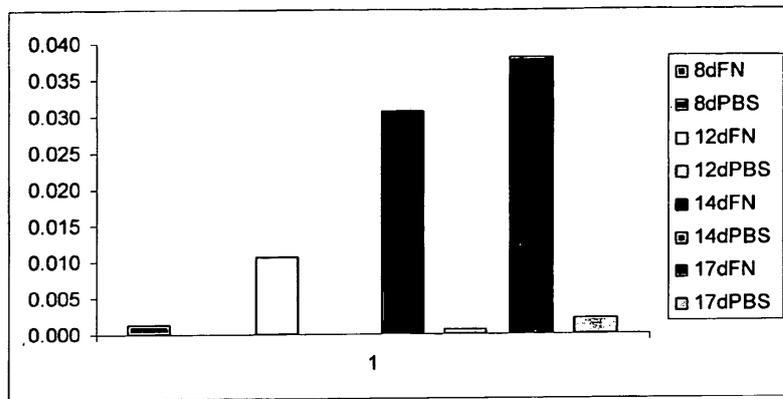


FIGURA 2B

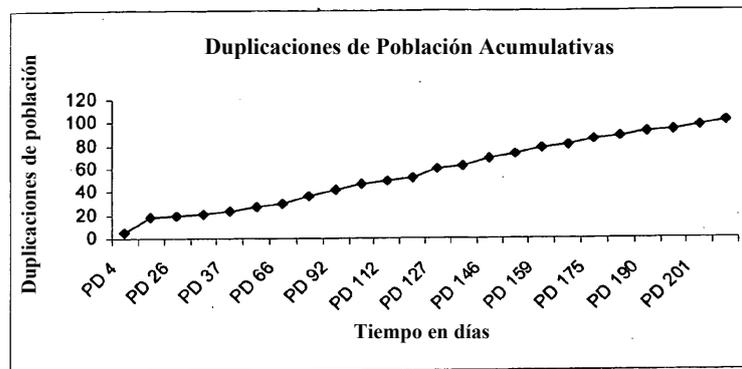


FIGURA 2C

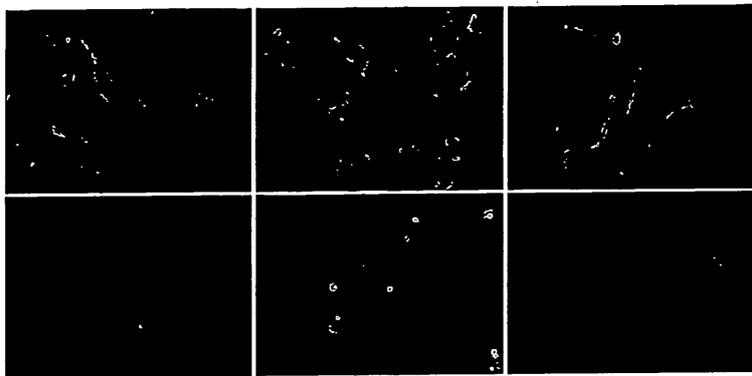


FIGURA 3A

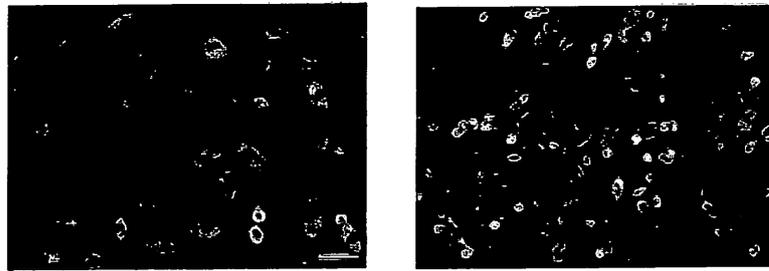


FIGURA 3B

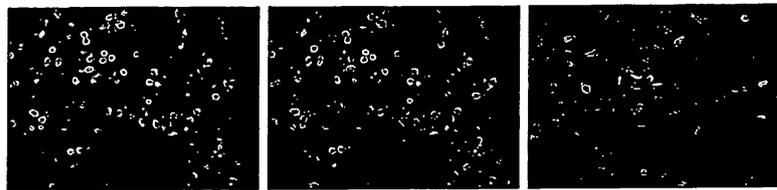


FIGURA 3C

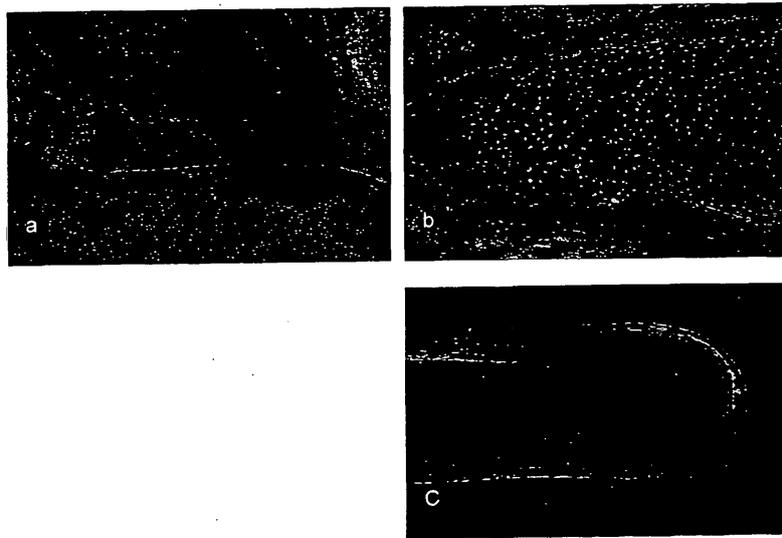
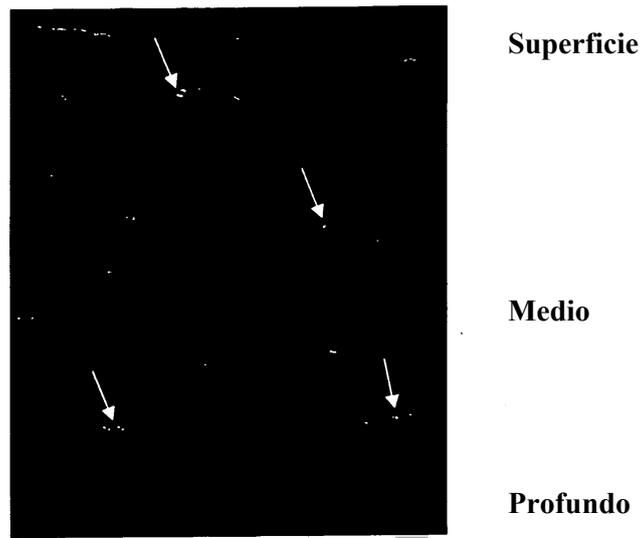


FIGURA 4



Las flechas indican el marcaje intracelular positivo.

FIGURA 5