

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 825**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2007 E 07846847 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2094310**

54 Título: **Genes marcadores para su uso en la identificación de estabilidad fenotípica de condrocitos y en el cribado de factores que influyen en la producción de cartílago**

30 Prioridad:

**24.11.2006 US 867152 P**

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

**02.04.2014**

73 Titular/es:

**TIGENIX N.V. (100.0%)  
Romeinse straat 12 bus 2  
3001 Leuven , BE**

72 Inventor/es:

**LUYTEN, FRANK;  
DE BARI, COSIMO y  
DELL'ACCIO, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 452 825 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

Genes marcadores para su uso en la identificación de estabilidad fenotípica de condrocitos y en el cribado de factores que influyen en la producción de cartílago.

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y herramientas para determinar la estabilidad fenotípica de condrocitos y cribar sistemas para identificar compuestos de uso en el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades relacionadas con el cartílago.

### Antecedentes

La reparación de defectos del cartílago se consigue principalmente por métodos quirúrgicos tales como técnicas de estimulación de la médula ósea o mediante la implantación de células formadoras de cartílago (condrocitos, (condro-) progenitores y precursores de los mismos o células madre que se desarrollan a cartílago). A la vista de esto, es de interés la identificación de factores capaces de afectar positivamente a la formación *in vivo* de cartílago. Es de hecho deseable identificar procedimientos quirúrgicos, o métodos terapéuticos o compuestos capaces de afectar positivamente a la formación de cartílago mediada por células locales presentes en o en las cercanías del defecto. Además, es de interés para terapias basadas en células identificar factores o tratamientos que puedan afectar positivamente a la capacidad de las poblaciones de células aisladas que se han expandido o pasado *in vitro* para producir *in vivo* cartílago estable.

Se han descrito diferentes ensayos en los que la expresión de genes implicados en la formación de cartílago se usa como un parámetro para cribar compuestos. El documento US2002061514 describe un método en el que un gen indicador es sensible al factor de transcripción SOX9. SOX9 es un factor de transcripción de dominio del grupo de alta movilidad (HMG) que se expresa en condrocitos, condroprogenitores y otros tejidos y se ha descubierto que es esencial para la diferenciación de condrocitos y formación de cartílago. Otros métodos se basan en los niveles de expresión de genes individuales que están implicados en el metabolismo del cartílago y defectos osteocondrales [por ejemplo genes relacionados con osteoporosis en el documento WO02081745].

También se han descrito métodos de cribado que se basan en la diferenciación *in vitro* de células en cartílago. Sin embargo, se ha descubierto que el valor predictivo de dichos modelos está limitado y estos ensayos requieren grandes cantidades de células y consumen tiempo.

El documento WO200466723 proporciona un modelo *in vivo* en el que el efecto de los compuestos en la formación de hueso y cartílago en el pez cebrá se evalúa *in vivo*.

Uno de los modelos más fiables para evaluar la capacidad de las células para formar cartílago estable es la implantación intramuscular de células en ratones desnudos seguido de la evaluación histológica de los implantes generados. El uso de este modelo de ratón desnudo, que en sí mismo consume tiempo y es poco práctico para cribado de alto rendimiento, se evitó con la tecnología desvelada en el documento WO0124833. Esta solicitud de patente describe el uso de marcadores moleculares, identificados basándose en el modelo de ratón desnudo para la formación de cartílago, para evaluar el potencial condrogénico de células expandidas o pasadas para fines de trasplante. De forma similar, se describe un conjunto de marcadores adecuados para estabilidad fenotípica de condrocitos en el documento US2003235813. Sin embargo, aunque la identificación de estos marcadores proporcionó una base para la identificación de poblaciones celulares capaces de producir *in vivo* cartílago hialino estable, sigue existiendo la necesidad de mejora adicional. Se conocen matrices para análisis de expresión por ejemplo del documento US 2002009730.

### Sumario de la invención

La presente invención se basa en el nuevo concepto de proporcionar un perfil de marcadores específico que es indicativo de formación de cartílago en cualquier circunstancia dada, es decir bien nativo de las células o inducido, que puede considerarse como el perfil diana en la identificación de factores capaces de afectar a la formación de cartílago.

En consecuencia, la presente invención proporciona un conjunto de marcadores que pueden usarse de forma fiable para predecir el potencial formador de cartílago de una población de células. El nivel de expresión de estos marcadores puede usarse para predecir si una población celular, por ejemplo *in vitro* o *in vivo*, es capaz de producir *in vivo* cartílago tras la implantación o tras la estimulación. Esto es de interés para determinar el potencial terapéutico de una población celular. El conjunto de marcadores también proporciona una herramienta fiable para determinar el impacto de un tratamiento dado en la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población de células antes de la implantación. Se desvelan además en el presente documento regímenes de tratamiento combinados que comprenden la administración de células madre o células osteocondrales en una articulación y la administración de un medicamento que afecta al potencial condrogénico de la población celular administrada.

La estabilidad fenotípica de una población celular *in vitro* puede usarse en ensayos de cribado para la identificación de factores capaces de afectar a la estabilidad fenotípica de condrocitos *in vitro* y/o *in vivo*. La invención proporciona un conjunto de marcadores indicativos de la estabilidad fenotípica de condrocitos, cuya expresión se usa para predecir el efecto *in vitro* o *in vivo* de compuestos y/o condiciones sobre la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago. El uso de estos marcadores en ensayos de cribado permite el cribado de un gran número de compuestos y/o condiciones en condrocitos, sin realizar experimentos animales laboriosos y que consumen tiempo.

En un aspecto de la invención se proporcionan métodos para determinar la capacidad de una población celular para producir cartílago hialino estable. Más particularmente, se proporcionan métodos para determinar *in vitro* la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago hialino estable. En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden determinar la expresión por la población celular de un conjunto de al menos tres genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA.

En realizaciones particulares de métodos proporcionados en el presente documento, la población celular se pone en contacto con un compuesto o condición.

En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden las etapas de poner en contacto una población de células con un compuesto o condición, y determinar el nivel de expresión en la población de células de un conjunto de al menos tres genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y uno o más genes marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA. En estos métodos, el nivel de expresión del conjunto de al menos tres marcadores es indicativo de la capacidad de las células para producir *in vivo* cartílago hialino estable, por ejemplo tras la implantación en un paciente.

Las realizaciones adicionales de métodos descritos en el presente documento comprenden las etapas de, antes de poner en contacto la población celular con un compuesto o condición, determinar en la población de células el nivel de expresión del conjunto de al menos tres genes marcadores y, después de la etapa de contacto, determinar si la presencia del compuesto o condición afecta a la expresión en la población celular de uno o más del conjunto de al menos tres genes marcadores. Más particularmente, se proporcionan métodos que comprenden determinar, basándose en el efecto de la presencia del compuesto o condición sobre la expresión del conjunto de al menos tres genes marcadores en la población celular, el efecto del compuesto o condición en la capacidad de la población celular para producir *in vivo* cartílago hialino estable. En realizaciones particulares de los métodos descritos en el presente documento, se identifica que compuestos o condiciones capaces de aumentar la expresión de uno o más genes marcadores positivos seleccionados del grupo que consiste en FRZB, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA afectan positivamente a la formación de cartílago y se identifica que compuestos capaces de aumentar la expresión de PEDF y/o ALK-1 afectan negativamente a la formación de cartílago, más particularmente a la capacidad de las células para producir *in vivo* cartílago hialino estable.

En realizaciones particulares adicionales de métodos descritos en el presente documento, el conjunto de marcadores son un conjunto de al menos 4, 5 o 6 genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y que comprenden respectivamente 2, 3 y 4 genes marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2 y FGFR3. Más realizaciones particulares de métodos descritos en el presente documento se refieren a métodos en los que el conjunto de genes marcadores es un conjunto de al menos seis genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 y FGFR3.

En realizaciones particulares de métodos descritos en el presente documento, la capacidad de un compuesto o condición para afectar a la formación de cartílago se determina basándose en el efecto acumulado del compuesto o condición sobre la expresión del conjunto de al menos tres genes marcadores. Más particularmente, el efecto acumulado del compuesto o condición sobre la expresión de los genes marcadores positivos seleccionados del grupo que consiste en FRZB, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA y el efecto acumulado del compuesto o condición sobre la expresión de genes marcadores negativos PEDF y/o ALK-1 es indicativo de la capacidad del compuesto o condición para afectar a la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular.

En realizaciones particulares de métodos descritos en el presente documento, la población de células se obtiene de una articulación. La población de células se obtiene de un donante sano o de un individuo con un defecto osteocondral. En ensayos particulares se prevé el efecto de un compuesto o condición en ambos tipos de células. En realizaciones particulares de métodos descritos en el presente documento el nivel de expresión de uno o más de los marcadores se determina con un método cuantitativo.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un conjunto de marcadores para identificar un compuesto que es capaz de afectar a la capacidad de las células, más particularmente condrocitos o células precursoras de condrocitos, para producir *in vivo* cartílago. En realizaciones particulares el uso se caracteriza porque el conjunto de marcadores comprende un conjunto de al menos tres genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y uno o más

marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA. En realizaciones específicas, el uso implica un conjunto de al menos seis genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 y FGFR3.

5 Un aspecto adicional de la invención proporciona kits que comprenden sondas para detectar la expresión de un conjunto de genes en células formadoras de cartílago en las que el conjunto de genes consiste en FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 y FGFR3.

10 Son realizaciones particulares de los kits proporcionados en el presente documento kits en los que las sondas son oligonucleótidos que hibridan con ARNm, en los que las sondas son anticuerpos y/o en los que las sondas son conjuntos de cebadores de PCR específicos para los marcadores para ensayar. Se prevén kits que comprendan diferentes tipos de sondas. En realizaciones particulares adicionales de los kits, se proporcionan sondas marcadas.

15 Un aspecto adicional más de la invención proporciona dispositivos para detectar la expresión de un conjunto de seis genes marcadores consistentes en FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 y FGFR3 en células, más particularmente células normalmente capaces de formación de cartílago. En realizaciones particulares de dichos dispositivos, se proporcionan los siguientes componentes: una unidad para detectar la expresión de genes marcadores, y sondas para el conjunto anterior de seis marcadores.

## 20 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

25 El término "condrogénico" cuando se aplica a una célula o una población se refiere a la capacidad inherente de esa célula o población para producir cartílago o para estimular en circunstancias apropiadas el crecimiento del cartílago.

Un "compuesto condrogénico" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que induce un fenotipo de condrocitos estable y/o promueve la formación de cartílago.

30 La expresión "estabilidad fenotípica de condrocitos" o "potencial condrogénico" cuando hace referencia a una población celular, se refiere a la capacidad de la población celular para producir *in vivo* cartílago. Esta capacidad puede ensayarse inyectando (por vía ectópica) una fracción de la población celular (al menos aproximadamente  $1 - 20 \times 10^6$  células) en un mamífero (*in vivo*), tal como ratones inmunodeficientes y determinar (en un marco temporal de aproximadamente 3 semanas), el desarrollo de un implante de cartílago sin señales de invasión vascular, mineralización o reemplazo por hueso o tejido fibroso. Como alternativa, una fracción de la población celular (al menos aproximadamente  $1 - 20 \times 10^6$  células por  $\text{cm}^2$ ) puede sembrarse, o encapsularse, en una matriz biocompatible e implantarse por vía subcutánea bajo la piel durante aproximadamente 6-8 semanas antes de determinar el desarrollo de un implante de cartílago estable sin señales de invasión vascular o formación de hueso endocondrial. Una población de células que es capaz de producir *in vivo* cartílago hialino estable, se caracteriza por la presencia de una combinación específica de marcadores de estabilidad fenotípica descritos en el presente documento. La estabilidad fenotípica de condrocitos se pierde gradualmente en condrocitos maduros tras su pase.

45 La expresión "células recién aisladas" (FI) como se usa en el presente documento se refiere a la población celular obtenida de una biopsia tras digestión tisular. La expresión "células de cartílago recién aisladas" como se usa en el presente documento se refiere por lo tanto a la población celular directamente obtenida de un tejido que contiene condrocitos, tal como cartílago, por digestión, sin pases.

50 El término "expandido", cuando hace referencia a una población celular obtenida de un tejido, tal como cartílago, indica que la población celular se ha situado en condiciones por las que el número de células ha aumentado por proliferación. En su versión más sencilla, se realiza expansión proporcionando la población celular en un recipiente de cultivo con medio de cultivo apropiado, opcionalmente hasta la confluencia. La población que se obtiene como resultado de expandir células recién aisladas se denomina P0.

55 El término "pasadas" se refiere a células que se han expandido, y que después de la expansión se han recogido del recipiente de cultivo usando métodos enzimáticos, químicos y/o físicos y se colocan a una densidad menor en otro recipiente de cultivo. Se hace referencia a las células pasadas por su número de pase (P1, P2, etc.) su tiempo en cultivo o, como alternativa, por el número de sus duplicaciones de población (PD1, PD2 etc.).

60 La expresión "defecto de cartílago" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier afección resultante de la pérdida o daño de cartílago o cualquier parte de cartílago enferma.

65 La expresión "puntuación de marcador" como tal se usa para hacer referencia a un valor numérico que puede atribuirse a la expresión de un marcador. La "puntuación de marcador acumulada" se refiere a una combinación de la puntuación de marcador de los diferentes marcadores de los conjuntos de marcadores. Esto puede ser el resultado de una suma de los marcadores individuales. Como alternativa, la puntuación de marcador acumulada

tiene en cuenta diferencias en la contribución de cada marcador en la capacidad para predecir la estabilidad fenotípica de condrocitos y en consecuencia se basa en una fórmula matemática más compleja.

5 La expresión "puntuación histológica" se refiere a un valor cualitativo o semicualitativo atribuido al cartílago basándose en un análisis histológico (por ejemplo sin cartílago, fibrocartílago, cartílago hialino).

Las abreviaturas usadas para genes en el contexto de la presente solicitud son:

<b>FRZB:</b>	Proteína Relacionada con Frizzled 1 [OMIM 605083, Genbank U91903]
<b>ALK1:</b>	Receptor de Activina A, Quinasa 1 de Tipo II [OMIM 601284, Genbank Z22533]
<b>PEDF:</b>	Factor Derivado del Epitelio Pigmentario [OMIM 172860, Genbank M76979]
<b>COL11:</b>	Colágeno, Tipo XI A1 [OMIM 120280, Genbank J04177]
<b>COL2:</b>	Colágeno, Tipo II, Alfa 1 [OMIM 120140, Genbank L10347]
<b>FGFR3:</b>	Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 3 [OMIM 134934, Genbank M58051]
<b>BMP-2:</b>	Proteína Morfogénica del Hueso 2 [OMIM 112261, Genbank M22489]
<b>RASF-PLA2:</b>	Fosfolipasa A2, Grupo IIA [OMIM 172411, Genbank M22430]
<b>OPN:</b>	Osteopontina [OMIM 166490, Genbank X13694]

10 La presente invención se basa en la identificación de un conjunto seleccionado de genes marcadores, cuya expresión se ha descubierto que es indicativa de la capacidad de formación *in vivo* de cartílago por parte de células. Más específicamente, se ha determinado que atribuyendo un valor a cada uno de estos marcadores, el valor acumulado, que puede expresarse como una puntuación de marcador acumulada, refleja la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago fenotípicamente estable.

15 Los genes marcadores identificados en la presente invención como útiles en la evaluación de la capacidad de una población celular para asegurar la formación de cartílago se seleccionan del grupo que incluye los genes marcadores positivos FRZB, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RASF-PLA2 y OPN y los genes marcadores negativos ALK1 y PEDF. Pueden incluirse en el conjunto marcadores adicionales, por ejemplo como controles.

20 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se ha identificado un conjunto de 9 marcadores, que comprenden marcadores tanto positivos como negativos. Se expresan fuertemente marcadores positivos por poblaciones capaces de producir cartílago hialino estable *in vivo*, mientras que se expresan marcadores negativos a niveles bajos o no se expresan por poblaciones capaces de producir cartílago hialino estable. De acuerdo con la presente invención, la ausencia de expresión de un marcador negativo, puede actuar como un marcador positivo. Sin embargo, en el contexto de la presente invención dichos marcadores cuya ausencia de expresión es indicativa de la capacidad de estabilidad fenotípica de los condrocitos, se denominan en el presente documento marcadores negativos.

30 La expresión de genes marcadores es una característica distintiva de una población celular, normalmente consistente en aproximadamente  $0,2 \times 10^5$  -  $1,0 \times 10^6$  células.

35 Se conocen en la técnica diferentes métodos para determinar la expresión de genes. Más normalmente, de acuerdo con la presente invención, se aísla ARN de una fracción de la población celular (normalmente entre  $0,2 \times 10^5$  -  $1,0 \times 10^6$  células y preferentemente entre  $0,2 \times 10^6$  -  $1 \times 10^6$ ) y se amplifica usando PCR inversa. Dicha amplificación puede realizarse de una manera semicuantitativa mediante la electroforesis de fragmentos amplificados y medición de su intensidad relativa en comparación con la de un gen constitutivo tal como beta actina. Sin embargo, pueden analizarse cantidades menores de células e incluso células individuales con respecto a la expresión de células usando técnicas de amplificación de nucleótidos. Adicionalmente o como alternativa, la cantidad de ADN se mide de una manera cuantitativa usando, por ejemplo, la tecnología Taqman. Pueden identificarse fácilmente cebadores que son adecuados para los marcadores mencionados en la presente solicitud por el experto en la materia basándose en las secuencias conocidas de los genes marcadores.

45 Como alternativa o adicionalmente, la expresión de marcadores se mide al nivel proteico. Los niveles proteicos pueden determinarse por métodos inmunológicos tales como transferencias de Western o ELISA.

50 En realizaciones específicas de la invención, la expresión de los marcadores se evalúa comparando la expresión de los marcadores en una población de control y una población experimental, tal como mediante tecnología de micromatrices o análisis después de electroforesis de proteínas unidimensional o bidimensional. En el presente documento, las proteínas marcadoras migran en un gel de acuerdo con su Mr (1D) y su punto isoeléctrico (IEP) (2D). Las diferencias en la expresión al nivel proteico pueden medirse detectando la cantidad de proteína presente en la posición correspondiente con su Mr y/o IEP. Pueden cuantificarse proteínas después de teñir con Azul Brillante de Coomassie o una tinción equivalente o pueden cuantificarse incorporando un marcador metabólico radiactivo (por ejemplo metionina <sup>35</sup>S).

55

Dependiendo de la tecnología usada, pueden marcarse anticuerpos, sondas oligonucleotídicas o sondas proteicas (tales como anticuerpos), por ejemplo con marcadores cromóforos, magnéticos o radiactivos, para permitir la detección de la expresión.

5 En realizaciones específicas, se prevé detectar diferentes marcadores por técnicas diferentes. Por ejemplo, se detectan varios marcadores por ELISA mientras que otros se detectan mediante PCR.

10 Un aspecto adicional de la invención proporciona un dispositivo adecuado para la detección de un conjunto de seis genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 y FGFR3, comprendiendo dicho dispositivo una unidad para detectar directa o indirectamente los marcadores de la presente invención (al nivel de ADN, ARN o proteínas). La unidad puede basarse en ARN, hibridación de ADN o basarse en detección inmunológica. Dicha unidad puede ser un aparato de PCR (cuantitativa), un dispositivo para realizar ensayos inmunológicos, o un dispositivo para determinar proteínas (por ejemplo, HPLC, espectrometría de masas, aparato de electroforesis), pero también puede ser un dispositivo de micromatrices (desechable) o microplaca. Dicha unidad, cuando sea aplicable, está equipada con sondas o anticuerpos para detectar genes marcadores o proteínas. Opcionalmente, dicho dispositivo puede comprender además una unidad de cultivo celular, en la que pueden cultivarse dos o más poblaciones celulares en condiciones idénticas o diferentes (por ejemplo densidad, número de pases, composición del medio). Además el dispositivo de la invención puede comprender una unidad para suministrar uno o más compuestos de ensayo a la unidad de cultivo celular (cuyo suministro puede variar individualmente en cantidad o en perfil temporal). Finalmente, el dispositivo puede comprender una unidad para recoger células y aislar material celular (ADN, ARN, proteínas).

25 Además, se prevén cartuchos desechables que comprenden sondas o reactivos específicos para los marcadores descritos en el presente documento que pueden usarse para determinar la expresión de estos marcadores para una determinación rápida y eficaz del estado de una población celular. En consecuencia, la presente invención prevé dispositivos automáticos, que se combinan opcionalmente con cartuchos desechables, que permiten el control de calidad eficaz de células para su uso en aplicaciones *in vivo* o *in vitro*.

30 Se proporcionan subconjuntos de los genes marcadores identificados que permiten una evaluación fiable de la estabilidad fenotípica de los condrocitos de una población celular o de la capacidad de un compuesto o condición para influir en la formación *in vivo* de cartílagos por una población celular. Más particularmente, los conjuntos adecuados de genes marcadores comprenden al menos 3, más particularmente al menos 4, aún más particularmente al menos 5, y más particularmente al menos 6 de los genes marcadores identificados.

35 En general, cuanto menor sea el número de genes marcadores tenidos en cuenta, mayor será el impacto tanto de errores de medición como de la expresión aberrante potencial de un marcador particular. Los marcadores diferentes también reflejan los diferentes procesos (por ejemplo procesos anabólicos, procesos catabólicos, etc.) y rutas implicadas en el metabolismo celular de condrocitos (rutas de señalización, receptores y ligandos, componentes de la matriz, enzimas de procesamiento, etc.) y cada uno de estos procesos puede tener un impacto individual en la estabilidad fenotípica de los condrocitos. Por lo tanto, cuantos más genes marcadores se tengan en cuenta, más representativo se vuelve el ensayo del ambiente completo lo que asegura la formación de cartílagos estable. Por otro lado, cuantos más genes marcadores vayan a determinarse, más técnicamente complicado se vuelve el ensayo, lo que comprende su facilidad de uso en cribado de alto rendimiento. Además, para mantener la relevancia de la contribución de cada uno de los genes marcadores a la evaluación global, el número de genes marcadores debería mantenerse por debajo de 10. De hecho, el cambio de la expresión de un único gen marcador dentro de un gran conjunto de genes marcadores influirá poco en la puntuación de expresión global de los genes marcadores. Basándose en estos argumentos y la contribución relativa observada de los diferentes marcadores identificados, se ha determinado que cualquier número de marcadores entre 3 y 9 es adecuado para determinar la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular o para evaluar la influencia de un compuesto o condición en la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular. De acuerdo con una realización de los métodos y usos de la presente invención, un conjunto de 5, 6 o 7 marcadores es un compromiso óptimo entre la precisión de la puntuación obtenida de dicho conjunto de marcadores y la viabilidad práctica del ensayo en cribado de alto rendimiento.

55 Se describe en el presente documento un conjunto de al menos tres marcadores representativos de la formación de cartílago seleccionado del grupo que consiste en los genes marcadores positivos FRZB, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RASF-PLA2 y OPN y los genes marcadores negativos ALK1 y PEDF.

60 El conjunto de al menos tres marcadores que componen los marcadores potenciales condrogénicos, es decir, representativos de la formación de cartílago pueden incluir FRZB, ALK1 y un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RASF-PLA2 y OPN. Más particularmente, el conjunto de al menos tres marcadores representativos de formación de cartílago incluyen FRZB, ALK1 y un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2 y FGFR3. Se desvelan en el presente documento conjuntos de al menos 4, 5 o 6 marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y respectivamente 2, 3 y 4 marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RASF-PLA2 y OPN. Más particularmente, los conjuntos de al menos 4, 5 o 6 genes marcadores comprenden FRZB, ALK1 y respectivamente

2, 3 y 4 marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL11, COL2 y FGFR3. De acuerdo con una realización particular, se usa un conjunto de seis genes marcadores para evaluar la capacidad para producir cartílago estable *in vivo*, consistiendo el conjunto en FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 y FGFR3. La puntuación acumulada de este conjunto de genes marcadores descritos en el Ejemplo 1 denominados en el presente documento "marcadores ChondroCelect™" (marcadores CC) también se denomina "puntuación ChondroCelect™". Como alternativa, el conjunto de marcadores comprende una variación de este conjunto de marcadores potenciales condrogénicos en la que uno de los marcadores PEDF, COL11, COL2 y FGFR3 se reemplaza por un marcador seleccionado del grupo de RASF-PLA2, OPN y BMP-2. Más particularmente, el conjunto de marcadores comprende una variación de los marcadores potenciales condrogénicos anteriormente descritos, en la que uno de los marcadores positivos COL11, COL2 se reemplaza por RASF-PLA, OPN o BMP-2. La sección de ejemplos del presente documento demuestra que las puntuaciones de marcadores basadas en la expresión de los conjuntos de marcadores desvelados en el presente documento por una población celular condrogénica predicen de forma fiable la naturaleza del cartílago producido por la población celular (como se determina por análisis histológico).

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para determinar la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular. Más particularmente, la presente invención posibilita el uso de los conjuntos de genes marcadores desvelados en el presente documento como una herramienta en la evaluación de la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular. Esto es importante por ejemplo en el control de calidad de poblaciones celulares usadas en el trasplante de células en el contexto del tratamiento de efectos del cartílago. Estos métodos se caracterizan porque comprenden la etapa de determinar la expresión por la población celular de un conjunto de genes marcadores como se describe en el presente documento. Más particularmente, la expresión de un conjunto de genes marcadores de acuerdo con la presente invención, opcionalmente expresada como una puntuación de marcador acumulada, más particularmente la puntuación de potencial condrogénico, se usa como un indicio de la calidad de una población celular para fines de implantación. Normalmente, la evaluación de calidad de una población celular se realiza en un laboratorio usando técnicas convencionales tales como las descritas en el presente documento y el resultado de la evaluación se genera en un informe o se resume en una hoja de control de calidad. La población celular puede ser P0 o cualquier pase de una población celular obtenida de un tejido animal o humano. De acuerdo con una realización, la población celular es entre P2 y P6 de una población obtenida de una biopsia de cartílago humano. Como alternativa, puede considerarse el número de duplicaciones poblacionales. Para la mayoría de las poblaciones celulares consideradas en el contexto de la presente invención, cada pase implica 2-3 duplicaciones poblacionales. En consecuencia en el contexto de la presente invención, la población celular se evalúa después de una o dos duplicaciones poblacionales (P0). Opcionalmente, la población celular es una combinación de diferentes pases (opcionalmente incluyendo P0) de células de una o de diferentes biopsias. Cuando se pretende el trasplante autólogo de las células, las células obtenidas de una o más biopsias de un paciente específico se combinan opcionalmente y se comprueban con respecto a estabilidad fenotípica de condrocitos (antes y/o después de la combinación de las mismas). Normalmente, la evaluación de calidad se realiza en puntos temporales específicos, es decir antes de la implantación (como células o tejidos bidimensionales o tridimensionales en un armazón o una matriz), antes del almacenamiento (por ejemplo congelación) y/o recuperación de almacenamiento, antes de y/o después de someter la población celular a tratamientos y/o condiciones específicos.

De hecho, el objeto de un aspecto de la invención es determinar la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago hialino estable antes de la implantación directa, o siembra en, o encapsulación en una matriz biocompatible e implantación posterior. La puntuación de marcador es indicativa de la capacidad de la población celular o células para asegurar un implante de cartílago sin señales de invasión vascular o formación de hueso endocondrial.

Normalmente, la expresión de los marcadores para determinar la puntuación de marcador de acuerdo con la presente invención se realiza en una población celular en su conjunto, por lo que se toma una muestra representativa para determinar, por métodos tales como los descritos en el presente documento, si los marcadores se expresan o no por la población celular que se investiga. Como alternativa, pueden comprobarse células individuales con respecto a la expresión de genes específicos usando métodos específicos de células conocidos en la técnica.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona métodos para determinar el efecto de un compuesto o condición sobre la capacidad de las células condrogénicas para producir *in vivo* cartílago hialino estable, siendo dichos métodos útiles como herramientas de cribado. Estos métodos comprenden la etapa de poner en contacto una población de células condrogénicas con un compuesto o condición y determinar la expresión de un conjunto de genes marcadores de acuerdo con la presente invención, por esa población celular.

En consecuencia, se proporcionan métodos y ensayos para identificar compuestos o condiciones que afecten a la capacidad condrogénica de una población de células. De acuerdo con una realización, el método se usa para identificar condiciones adecuadas para cultivar, almacenar y/o administrar poblaciones celulares para trasplante en el contexto del tratamiento de defectos del cartílago. En dichos métodos, una población celular condrogénica se somete a condiciones específicas y se determina la expresión de los genes marcadores. Son condiciones típicas los medios de cultivo específicos, temperaturas de cultivo, tiempos de cultivo, densidad de cultivo etc., así como

combinaciones con otros tipos celulares. Adicionalmente o como alternativa, los métodos y ensayos se usan para la identificación de factores moleculares capaces de afectar a la estabilidad fenotípica de condrocitos de células condrogénicas. Dichos factores pueden incluir factores de crecimiento, mitógenos, aditivos, moléculas químicas pequeñas, etc. El objeto del cribado puede ser identificar factores útiles en el cultivo, almacenamiento o administración de poblaciones celulares para trasplante en el contexto del tratamiento de defectos del cartílago. Normalmente, son factores de interés los factores que son capaces de afectar de forma positiva a la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular y/o factores que afectan positivamente a otras características de las células (por ejemplo, número de células, estabilidad, etc.) y/o parámetros de las condiciones de cultivo (por ejemplo, tiempo de almacenamiento, número de pases que pueden usarse, etc.) sin afectar negativamente a la estabilidad fenotípica de condrocitos de la población celular.

Adicionalmente o como alternativa, los ensayos y métodos de la presente invención son útiles en el cribado e identificación de compuestos con un efecto potencial *in vivo* en la formación de cartílago por células condrogénicas. El uso de los métodos de cribado se prevé para la identificación de compuestos que afectan a la formación de cartílago por células locales en el cuerpo del paciente para tratar y/o formación de cartílago por células usadas en el contexto del trasplante de células. Los métodos de cribado pueden usarse para identificar y/o evaluar compuestos que pueden contrarrestar factores o condiciones que aparecen en situaciones patológicas. Por ejemplo, las células pueden estimularse por ejemplo con IL-1 (para estimular las condiciones inflamatorias, para potenciar rutas catabólicas y para regular negativamente procesos anabólicos) antes de la adición de compuestos que contrarresten potencialmente este efecto.

También se prevé el uso de los genes marcadores para evaluar los efectos secundarios potenciales de compuestos terapéuticos, incluyendo los usados fuera del contexto de la reparación de cartílago, sobre la capacidad de las células condrogénicas para producir *in vivo* cartílago. Los métodos de la presente invención potencialmente permiten la identificación directa de efectos de compuestos en la formación del hueso, que, cuando se ensayan directamente *in vivo*, solamente se notarían a más largo plazo.

Los métodos relacionados con el cribado de compuestos, normalmente comprenderán la etapa de poner en contacto una población de células condrogénicas con uno o más compuestos de interés y determinar la expresión de un conjunto de genes marcadores como se describe en el presente documento por la población de células condrogénicas. Estos métodos permiten el cribado de alto rendimiento de por ejemplo bibliotecas de compuestos químicos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de expresión, etc.

Se desvelan métodos que comprenden la etapa de comparar la expresión de un conjunto de genes marcadores en una población celular a la que se han añadido uno o más compuestos/que se ha sometido a una condición particular con la expresión del conjunto de genes marcadores en ausencia del compuesto o condición en la misma o una diferente población celular. En una realización típica, (a) una fracción o fracciones diferentes que se originan de las mismas poblaciones celulares se someten a condiciones y/o compuestos diferentes para comparación entre sí y/o con un control positivo y/o negativo. El control negativo puede ser un blanco o un compuesto que se sabe que no afecta a la estabilidad fenotípica de los condrocitos. El control positivo puede ser un compuesto o condición que se sabe que afecta (positiva o negativamente) a la estabilidad fenotípica de una población celular.

En métodos de cribado, pueden evaluarse diferentes parámetros. Pueden sembrarse células en recipientes individuales o placas multipocillo a diferentes densidades. Las células pueden incubarse durante periodos de tiempo diferentes antes de añadir un compuesto/factor o aplicar una condición o ambos. Pueden combinarse diferentes regímenes y combinaciones de compuestos y condiciones de cultivo. Pueden añadirse compuestos/factores a diferentes concentraciones y permanecen en contacto con las células durante diferentes periodos de tiempo. Lo mismo se aplica a las condiciones de cultivo.

La presente invención se basa en la observación de que la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago hialino después de la implantación puede predecirse basándose en la expresión de genes específicos (los genes marcadores) por esa población celular *in vitro*, antes de la implantación. Por lo tanto, la expresión de los genes marcadores se usa para controlar la "calidad" condrogénica de las células antes de la implantación y los efectos de compuestos y condiciones en los mismos. Como se detalla posteriormente, la expresión de los genes puede expresarse como una puntuación marcadora, por lo que el nivel de expresión (relativo) de los genes marcadores diferentes se suma para obtener un valor, que puede compararse con el valor óptimo (es decir alta expresión de todos los marcadores positivos, baja expresión de todos los marcadores negativos que se consideran). Adicionalmente o como alternativa, el cribado puede tener en cuenta la capacidad de los compuestos o condiciones para influir en un marcador cualquiera dentro de este conjunto de genes.

La expresión de genes marcadores puede evaluarse basándose en el valor absoluto o relativo. Normalmente, se usa la expresión de gen marcador en comparación con un gen constitutivo. Esto se ejemplifica con la actina en el presente documento. Ya que los niveles de expresión de los genes constitutivos diferentes puede ser diferente, el experto en la materia entenderá que la expresión relativa de los genes marcadores comparados con el gen constitutivo seleccionado debe establecerse de antemano en una población con estabilidad fenotípica de condrocitos para cada gen constitutivo usado. De acuerdo con la presente invención, la información combinada sobre la

expresión de los marcadores seleccionados es indicativa de si las células son capaces o no de la formación *in vivo* de cartílago.

La presente invención prevé el uso de las combinaciones de marcadores descritas en el presente documento tanto en el contexto de evaluar la calidad de una población celular dada como para la evaluación de la influencia de los factores/condiciones en la capacidad de células para producir cartílago después de implantación *in vivo*. Cuando se usa el conjunto de marcadores para determinar el efecto de un compuesto, célula o condición sobre la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago hialino, el efecto puede basarse en determinar la expresión "aumentada" o "reducida" de los genes marcadores de la invención en relación con un control o en relación con el nivel de expresión antes de poner en contacto la población celular con el compuesto o condición. A este respecto, los compuestos, células o condiciones que aumentan la expresión de uno o más genes marcadores positivos y/o reducen la expresión de uno o más genes marcadores negativos puede considerarse capaz de afectar positivamente a la formación de cartílago. Los compuestos, células o condiciones que reducen la expresión de uno o más genes marcadores positivos y/o aumentan la expresión de uno o más genes marcadores negativos pueden considerarse capaces de afectar negativamente a la formación de cartílago.

La expresión de los diferentes genes marcadores del conjunto de marcadores por una población celular se representa por una "puntuación de marcador acumulada", que se correlaciona con y es indicativa de la estabilidad fenotípica de condrocitos de la población celular. La puntuación de marcador acumulada se usa para la interpretación cualitativa y/o cuantitativa de los resultados en los métodos y ensayos de la presente invención.

Se prevén diferentes tipos de puntuaciones de marcador dentro del contexto de la presente invención. El nivel de expresión de un conjunto de marcadores puede representarse por un valor numérico que es/se corresponde con la suma del nivel de expresión absoluto de cada uno de los productos génicos en el conjunto de marcadores. Dicho método de cálculo puede usarse cuando se realiza una detección cuantitativa de la expresión de los agentes marcadores por ejemplo mediante PCR cuantitativa o ELISA.

Como alternativa, el nivel de expresión de cada uno de los genes en el conjunto de marcadores puede representarse por una relación, es decir, el nivel de expresión de un gen se compara con el de otro gen tal como un gen constitutivo que se considera que tiene un nivel de expresión igual independientemente del tratamiento de una célula o del que la expresión se considera relativamente estable, independientemente de la capacidad de la célula para producir cartílago hialino estable. Esto dará como resultado que los valores de niveles de expresión para los diferentes marcadores sean más comparables (y principalmente dentro de intervalo de 0,001 a 10). En consecuencia, la puntuación de marcador acumulada puede ser la suma de las relaciones para cada gen marcador.

En ciertas condiciones, sin embargo, la puntuación de marcador acumulada no se basa en los valores absolutos o relativos de la expresión para cada uno de los genes marcadores, sino en la evaluación cualitativa de esta expresión.

De acuerdo con un método específico, se asigna de forma arbitraria a la evaluación cualitativa de los genes marcadores un valor numérico, por ejemplo "1". Más particularmente, se asigna a la expresión aumentada/alta de los marcadores positivos el valor "1" y también se asigna a la ausencia de expresión de un marcador negativo el valor "1". Más particularmente, se definen intervalos de niveles de expresión (o relaciones de expresión) tanto para niveles de expresión de genes marcadores positivos como para niveles de expresión de marcadores negativos de la estabilidad fenotípica de los condrocitos, por lo que se atribuye un valor a los niveles de expresión que quedan dentro de los intervalos predeterminados. De acuerdo con una realización adicional, también se atribuye un valor a valores de expresión que quedan fuera de los intervalos predeterminados de expresión de los genes marcadores positivos y/o negativos (por ejemplo cuando se observa expresión muy baja de un gen marcador positivo o expresión muy alta de un gen marcador negativo).

Cuando se determina el impacto relativo de cada uno de los genes marcadores en la puntuación de marcador acumulada, la expresión de cada gen puede tener el mismo peso. Como alternativa, puede considerarse que el nivel de expresión de uno o más genes tiene un impacto más fuerte en la estabilidad fenotípica de los condrocitos que otros genes, que pueden incorporarse en el impacto relativo de los genes marcadores en el cálculo de la puntuación de marcador acumulada. En un método particular el impacto relativo de los diferentes marcadores es el mismo y se le atribuye el valor "1" cuando queda dentro de los intervalos predeterminados de expresión (o de las relaciones de expresión) a las que se atribuye el valor "-1", cuando quedan fuera de los intervalos (menores o mayores que los intervalos predeterminados para los marcadores positivos y negativos, respectivamente). Opcionalmente, puede considerarse que los niveles de expresión dentro de un cierto intervalo corresponden a un valor "0", que se corresponde con un nivel de expresión del gen marcador positivo o negativo que no afecta positiva o negativamente a la estabilidad fenotípica de condrocitos en la célula.

En la sección de ejemplos descrita en el presente documento, se describe una realización particular adicional de la invención. La puntuación de marcador acumulada representativa de un fenotipo de cartílago estable se determina por un conjunto de hasta seis marcadores, a cada uno de los cuales se atribuye igual importancia. La expresión de cada uno de los marcadores se cuantifica, y se aplica un enfoque de puntuación basado en la expresión relativa a un

gen marcador. En esta realización específica, la puntuación calculada a partir de estos marcadores se denomina "puntuación de potencial condrogénico" es decir una puntuación de marcador acumulada que refleja la expresión global de un conjunto definido de seis marcadores de la estabilidad fenotípica de cartílago. De acuerdo con esta realización de la invención, el nivel de expresión de cada gen se determina mediante un método semicuantitativo y los valores obtenidos se normalizan por comparación con un gen de referencia (por ejemplo, beta actina). Por lo tanto, un nivel de expresión de 1 se refiere a una expresión que es la misma que la de actina, un nivel de expresión por debajo de 1 se refiere a una expresión que es menor que la de actina (0,1 correspondiente a un nivel de expresión que es 10 veces menor que el de beta actina) y un nivel de expresión por encima de 1 se refiere a un nivel de expresión que es mayor que el de actina.

En esta realización específica de la presente invención, el nivel de expresión de cada uno de los genes marcadores corresponde a una de tres posibles puntuaciones. En el caso de marcador positivo (FRZ, COL11, COL2, FGFR3) un nivel de expresión muy bajo (0-0,1) se representa por una puntuación de -1, un nivel de expresión bajo (0,1-1) se representa por una puntuación de 0 y una expresión alta (>1) se representa por una puntuación de +1. De forma inversa, para un marcador negativo (ALK1, PEDF) un nivel de expresión muy bajo (0-0,1) se representa por una puntuación de +1, un nivel de expresión bajo (0,1-1) se representa por una puntuación de 0 y un nivel de expresión alto (>1) se representa por una puntuación de -1. La suma de todas estas puntuaciones individuales representa el nivel de expresión del conjunto completo de marcadores en total. Para un conjunto de 6 marcadores, la puntuación puede variar por lo tanto de -6 (todos los marcadores positivos expresados a un nivel que es menor que la referencia y todos los marcadores negativos expresados a un nivel que es mayor que el gen de referencia) a +6 (todos los marcadores positivos expresados a un nivel que es mayor que el gen de referencia y todos los marcadores negativos expresados a un nivel que es menor que el gen de referencia). Cuando esta puntuación se basa en la expresión de los marcadores FRZB, COL11, COL2, FGFR3, ALK1 y PEDF por una población celular, esta puntuación se denomina en el presente documento puntuación Chondroselect™.

Como se muestra en los ejemplos de la presente invención, es posible correlacionar los niveles de expresión de un conjunto de marcadores, así como la puntuación de marcador acumulada obtenida de los mismos, con la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular de condrocitos. En consecuencia, la evaluación de los niveles de expresión de un conjunto definido de marcadores, o de la puntuación de marcador (acumulada) de una población celular condrogénica tras la administración de ciertos compuestos a la misma, puede usarse para evaluar la capacidad del compuesto para afectar a la estabilidad fenotípica de condrocitos de células y/o la capacidad de las células para formar cartílago *in vivo*. Más particularmente se demuestra que la adición de compuestos particulares a una población celular de condrocitos expandida mejora la puntuación de potencial condrogénico y el fenotipo de esta población celular. Los controles negativos, por ejemplo, adición de compuestos que promueven la formación del hueso, reducen la puntuación de potencial condrogénico.

En consecuencia, se proporcionan puntuaciones de marcador acumuladas que pueden usarse en un ensayo de cribado basado en células para evaluar la influencia de cualquier factor o condición en la capacidad de una población condrogénica para producir cartílago estable. A la vista del hecho de que la estabilidad fenotípica del cartílago de una población celular como se identifica *in vitro*, es representativa de la actividad de las células *in vivo*, el ensayo puede usarse de forma fiable para identificar compuestos capaces de influir en la formación de cartílago por células condrogénicas locales tras la administración al defecto de cartílago. Resulta importante que el ensayo y análisis de marcadores como se desvela en el presente documento no requieren un ensayo de formación *in vitro* o *in vivo* de cartílago posterior o paralelo para validar los resultados, lo que acorta drásticamente y simplifica el cribado a gran escala de compuestos.

De acuerdo con la presente invención, el uso de una puntuación de marcador acumulada es una herramienta fiable y eficaz para evaluar la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular y/o para evaluar el efecto de las condiciones o compuestos en la estabilidad fenotípica de condrocitos de células condrogénicas. La fiabilidad de la puntuación se determina por un lado por la correlación entre puntuaciones positivas y la capacidad para generar *in vivo* cartílago fenotípicamente estable y la correlación entre puntuaciones negativas y el hecho de que las células no son capaces de generar *in vivo* cartílago fenotípicamente estable. Un requisito adicional deseable de una puntuación de marcador acumulada fiable en su eficacia, es decir su capacidad para distinguir eficazmente poblaciones que son y poblaciones que no son capaces de generar *in vivo* cartílago fenotípicamente estable. Por ejemplo, cuando el número de marcadores es seis, y el sistema de puntuación varía entre +6 y -6, como se ha descrito anteriormente, hay normalmente una "zona gris" (poblaciones caracterizadas por una puntuación de marcador acumulada de un intervalo localizado entre +6 y -6), para la que la puntuación de marcador acumulado no es inequívoca y que, cuando se ensaya se descubriría que comprende tanto poblaciones que son como poblaciones que no son capaces de formar cartílago hialino estable. Idealmente, la puntuación de marcador dará como resultado un número mínimo de poblaciones en esa zona gris, pero permitirá una clasificación de máxima eficacia de poblaciones como "positivas" o como "negativas".

Más particularmente, en el contexto de determinar la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular usada para trasplante, puede ser crítica tanto la fiabilidad como la eficacia de la puntuación de marcador acumulada, para permitir una determinación directa y correcta del destino de la población celular. De hecho, el uso de una puntuación de marcador acumulada de un valor predictivo relativamente bajo para caracterizar una población de

células que se pretende trasplantar tiene un valor limitado ya que no permite decidir si implantar o no. Para dichas aplicaciones, el uso de la puntuación de potencial condrogénico de la presente invención como una herramienta de puntuación se considera particularmente apropiada, a la vista de su alta fiabilidad y eficacia. Se prevé sin embargo que para su uso en cribado, la eficacia del valor predictivo puede ser menos crítica. Como se ha indicado anteriormente, un fin potencial para cribar ensayos es identificar compuestos farmacéuticos que afecten, más particularmente mejoren, la estabilidad fenotípica de condrocitos de una población celular. Por lo tanto, en dichos métodos de cribado, puede preverse que la mejora relativa de la estabilidad fenotípica de condrocitos sea el requisito crítico en lugar de la capacidad de los compuestos para inducir o mantener una estabilidad fenotípica de condrocitos perfecta. Por ejemplo, se prevé que tras realizar un ensayo de cribado, los compuestos capaces de convertir células de baja calidad (sin cartílago después de implantación) en cartílago de calidad intermedia (células que tienen una puntuación que no puede usarse para predecir de forma inequívoca el resultado después de la implantación), también se considerarán de interés.

Las poblaciones celulares que se usan en los métodos y ensayos de la presente invención incluyen cualquier célula que se crea que es capaz de producir cartílago o que pueden desarrollarse a células productoras de cartílago. Normalmente, las células son células osteocondrales, tales como condrocitos y sus células precursoras o progenitoras obtenidas de cartílago articular, menisco o líquido sinovial. De acuerdo con una realización, las células usadas en el contexto de la presente invención son las células precursoras descritas en el documento WO01/25402. En algunas realizaciones la población celular son células precursoras o células madre que derivan de otros tejidos tales como médula ósea sanguínea o grasa y que pueden inducirse al linaje celular osteocondral. Los ensayos de la presente invención pueden usarse para determinar si esas células se han comprometido al linaje celular osteocondral.

Las células usadas en los métodos de cribado y ensayos de la invención pueden estar recién aisladas, expandidas o pasadas para uno o más pases. Las células pueden estar presentes como cultivos celulares en matraces de cultivo o presentes en una matriz o armazón. La expresión del conjunto de marcadores por células en una matriz puede determinarse disolviendo en la matriz y determinando la expresión por las células. Las células pueden ser de origen humano o animal. Son ejemplos de animales que se han usado para el estudio de cartílago *Xenopus*, pez cebra, pollo, ratón, rata, conejo, oveja y cabra.

Los métodos y ensayos de la presente invención pueden realizarse con células, que tienen un fenotipo de condrocitos estable como resultado de su origen y/o las condiciones de cultivo. Dichas células son particularmente útiles para ensayar efectos perjudiciales de un compuesto, tratamiento o condición dado.

De acuerdo con una realización alternativa, los métodos y ensayos de la presente invención se realizan usando células que no tienen un fenotipo de condrocitos estable o que han perdido el fenotipo estable de condrocitos, como resultado de su origen y/o condiciones de cultivo. Son ejemplos de los mismos condrocitos que se han sometido a pases extensivos y células madre. También son adecuados condrocitos derivados de individuos con un defecto osteocondral tal como (resultante de) osteoartritis o artritis reumatoide o de individuos que están predispuestos a adquirir un trastorno osteocondral basándose en su composición genética. También son adecuadas células tumorales de cartílago o células de condrosarcoma.

Las células que no tienen estabilidad fenotípica de condrocitos son particularmente útiles en los métodos de la presente invención para cribar con respecto a compuestos o condiciones que mejoran o restauran el fenotipo de cartílago estable de las células, o que pueden convertir ciertas poblaciones celulares tales como células madre en células con fenotipo de cartílago estable.

La presente invención prevé el uso de los métodos y ensayos de la presente invención en diversas aplicaciones diferentes. Como se ha detallado anteriormente, los métodos y ensayos de la presente invención hacen posible ensayar condiciones de cultivo en células que se pretende usar en ACT tales como densidad celular, número de pases, composición del medio, crecimiento en o sobre sustratos bi o tridimensionales, concentración de oxígeno, presión, tensión de corte. En particular el ensayo permite probar la influencia de la composición del medio en la estabilidad fenotípica de condrocitos. Los factores en el mismo que potencialmente tienen un impacto en la estabilidad fenotípica de condrocitos incluyen, pero sin limitación, el tipo y lote de suero, diferentes formulaciones de medio sin suero sintético, y diversas hormonas, factores del crecimiento, vitaminas, proteínas y compuestos orgánicos con un supuesto efecto en la estabilidad fenotípica de condrocitos.

Una aplicación de los métodos y ensayos de la presente invención es el cribado de compuestos o condiciones que diferencian células precursoras o células madre en el linaje osteocondral y más particularmente en el condrogénico. Otra aplicación en el cribado de compuestos o condiciones que pueden restaurar o mantener la estabilidad fenotípica de condrocitos de células sanas que se han pasado o se están pasando muchas veces, respectivamente, para obtener un número suficiente de células. Otra aplicación más es el cribado de compuestos o condiciones que pueden inducir estabilidad fenotípica de condrocitos en células que se obtienen de individuos que tienen o están predispuestos a un defecto osteocondral.

En otra aplicación, el ensayo se usa para evaluar el impacto de las matrices, armazones, geles o sus constituyentes, que con frecuencia se usan en procedimientos de trasplante celular.

Los métodos y ensayos de la presente invención también son adecuados en cribados clásicos de bibliotecas peptídicas, bibliotecas antisentido o bibliotecas de compuestos. Los compuestos que componen estas bibliotecas incluyen, pero sin limitación productos biológicos y compuestos orgánicos o inorgánicos, que se producen de forma sintética o se obtienen de fuentes naturales. Son ejemplos de los mismos bibliotecas de compuestos que pueden usarse tales como bibliotecas de fragmentos de anticuerpo, bibliotecas de presentación de fagos peptídicos, bibliotecas de péptidos (por ejemplo LOPAP #, Sigma Aldrich), bibliotecas de lípidos (BioMol) bibliotecas de compuestos sintéticos (por ejemplo LOPAC@, Sigma Aldrich) o bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec).

Los métodos de cribado y ensayos descritos en el presente documento son particularmente útiles en la identificación de compuestos candidatos para medicamentos para el tratamiento de trastornos osteocondrales. El defecto osteocondral que se prevé que sea de interés en el contexto de los métodos de cribado incluye, pero sin limitación, defectos que aparecen en las articulaciones, tales como, pero sin limitación, codo, tobillo, denominados habitualmente defectos de cartílago articular. Los defectos de cartílago también se nombran por el hueso próximo tales como defectos de los cóndilos del fémur, del húmero, etc. Son trastornos de cartílago de aparición frecuente, para los que se prevé que sea de interés el cribado de compuestos capaces de afectar a la estabilidad fenotípica de condrocitos osteoartritis, artritis reumatoide, lesiones de cartílago articular, condromalacia, espondiloartropatías.

#### Breve descripción de las figuras

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención sin implicar ninguna limitación de la invención a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. Estos ejemplos se ilustran por las siguientes Figuras en las que

La **Figura 1** muestra una representación de dispersión de puntuación de histología frente a puntuación potencial condrogénica (cada punto se ha movido en una dirección y cantidad aleatoria pequeña para evitar que se superpongan puntos).

La **Figura 2** muestra el efecto del compuesto A en la puntuación de marcador acumulada (la puntuación CC como se ha determinado en el Ejemplo 1) como se determina por PCR cuantitativa en tiempo real en condrocitos humanos cultivados desde P0 hasta P3 en monocapa. Los resultados representan puntuación de marcador acumulada media en relación con un control (DMSO). \* $p < 0,05$  en comparación con control de DMSO (n=4).

La **Figura 3** muestra el efecto del compuesto A en la expresión de los marcadores moleculares COL2 (A), COL11 (B), FRZB (C) y FGFR3 (D) correlacionados positivamente con el potencial condrogénico de condrocitos P3 humanos cultivados en monocapa como se determina por PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados representan expresión génica diana relativa al control de DMSO como se determina por el  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . \* $p < 0,05$  en comparación con el control de DMSO (n=4).

La **Figura 4** muestra el efecto de un compuesto A en la expresión de los marcadores moleculares PEDF (A) y ALK1 (B) correlacionado negativamente con el potencial condrogénico de condrocitos P3 humanos cultivados en monocapa como se determina por PCR cuantitativa en Tiempo Real. Los resultados representan expresión génica diana relativa al control de DMSO como se determina por el  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . \* $p < 0,05$  en comparación con el control de DMSO (n=4).

Ejemplos

#### Metodología

##### **Cultivo de condrocitos**

Se aislaron condrocitos derivados de cartílago articular humano adulto y se expandieron *in vitro* usando condiciones convencionales como se describe en Dell'Accio *et al.* (2001). *Arthritis Rheum.* 44, 1608-1619.

##### **Ensayo *in vivo***

Los marcadores se validaron usando un conjunto de 48 muestras de condrocitos que se obtuvieron de diferentes personas y se aislaron de nuevo o se pasaron de 1 hasta 5 pases. Se usó una parte de los condrocitos para análisis de marcadores (véase ejemplo 3) mientras que otra parte se usó en un ensayo *in vivo* para verificar la capacidad de formación de cartílago de cada muestra. Se inyectó a ratones nu/nu NERI hembra por vía intramuscular (compartimento posterior del muslo) aproximadamente 5 millones de células humanas. Se recogieron los implantes después de 2 semanas. [Lipman *et al.* (1983) *Calcif. Tissue Int* 35, 767-772; Ostrowski *et al.* (1975) *Somatic Cell Genet.* 1, 391-395]. Los implantes de cartílago se diseccionaron del músculo y se realizó histología usando tinción con hematoxilina-eosina, azul de toluidina y Safranina O. Después de la tinción se atribuye al implante una puntuación de histología que varía de 1 a 3. Una puntuación de histología de 3 se refiere a cartílago de tipo hialino

5 con proteoglicanos altamente sulfatados, fuerte tinción con azul de toluidina y Safranina O. Una puntuación de histología de 2 se refiere a cartílago de tipo hialino bien diferenciado, fuerte tinción con azul de toluidina, tinción débil con Safranina O. Una puntuación de histología de 1 se refiere a "fibrocartílago", tejido fibroso no diferenciado, ninguna o débil tinción con azul de toluidina. Una puntuación de histología de 0 se refiere a experimentos en los que no se recuperó ningún implante. El cartílago con una puntuación de histología de 2 o 3 representa implantes exitosos. El cartílago con una puntuación de histología de 0 o 1 representa implantes fallidos.

Ejemplo 1: análisis de marcadores

10 Se usó una fracción de las células inyectadas para análisis de expresión génica. Se realizó aislamiento de ARN, transcripción inversa y PCR usando los métodos descritos en el documento WO0124832. Se muestran cebadores de PCR para estos marcadores en la Tabla 1.

**Tabla 1: Cebadores para la amplificación de genes marcadores**

	Cebador	Secuencia	SEC ID Nº:
beta actina	directo	5'-tgacggggcaccacactgtgccatcta-3'	1
	inverso	5'-ctagaagcatttgcggtggacgatggagg-3'	2
Colágeno 11	directo	5'-gaactccatctctccctgc-3'	3
	inverso	5'-gagactggattcaaggcaag-3'	4
Colágeno 2	directo	5'-ccctgagtggaagagtgag-3'	5
	inverso	5'-gaggcgtgaggtctctgtg-3'	6
PEDF	directo	5'-ttcaagggcagtgggtaac-3'	7
	inverso	5'-taaggtagatgccagcggg-3'	8
Frzb1	directo	5'-tgtaagtctgtgcgagcg-3'	9
	inverso	5'-gatttagttgctgtgcttgc-3'	10
ALK1	directo	5'-cgacggaggcaggagaagcag-3'	11
	inverso	5'-tgaagtgcggtgggcaatgg-3'	12
FGFR3	directo	5'-gctgaaagacgatgccactg-3'	13
	inverso	5'-aggaccccaaggaccagac-3'	14

15 Los niveles de expresión de los marcadores se determinan midiendo la intensidad de los productos de PCR después de electroforesis. Todos los valores se comparan después en relación con una banda de 600 pb de un marcador de ADN y se obtiene un valor. La concentración de los marcadores individuales se representa por un valor numérico. En el caso de un marcador positivo (COL11, COL2, FGFR3) una expresión muy baja (0-0,1) se representa por -1, una expresión baja (0,1-1) se representa por un 0 y una expresión alta se representa por +1. Por el contrario en el caso de un marcador negativo (ALK1, PEDF) una expresión muy baja (0-0,1) se representa por +1, una expresión baja (0,1-1) se representa por un 0 y una expresión alta se representa por -1. La suma de todos estos marcadores individuales (definida como puntuación de potencial condrogénico) representa el nivel de expresión del conjunto completo de marcadores. Este número puede variar de -6 a +6.

25 Los datos individuales para cada marcador, su puntuación de potencial condrogénico y puntuación de histología se recopilan en la Tabla 2.

30 **Tabla 2: Visión de conjunto de las puntuaciones de histología y puntuaciones de potencial condrogénico realizadas respectivamente en implantes de cartilago y condrocitos inyectados. Los códigos de muestras se refieren a un código del paciente, un número de pase y con el tiempo a la confluencia de las células.**

Muestra	Código de muestra	Puntuación de histología	Puntuación de ChondroSelect	Marcadores positivos				Marcadores negativos	
				COL11	COL2	FGFR3	FRZB	ALK1	PEDF
1	cs29p0	3	5	3,94	8,25	3,34	4,17	0,16	0
2	cs49p0 80 %	3	5	0,66	1,93	1,90	2,26	0	0

ES 2 452 825 T3

Muestra	Código de muestra	Puntuación de histología	Puntuación de ChondroSelect	Marcadores positivos				Marcadores negativos	
				COL11	COL2	FGFR3	FRZB	ALK1	PEDF
3	Cs141p3	3	4	1,44	6,10	3,22	2,85	0,61	0,41
4	cs22p0	3	4	5,45	10,89	6,38	5,06	0,66	0,58
7	Cs141p0	3	3	4,95	10,95	0,34	4,42	0,39	0,35
8	Cs145p0	3	3	5,51	8,46	4,18	8,28	0,79	2,56
9	Cs148p0	3	3	2,32	11,63	3,90	6,28	0,52	1,14
10	cs28p0	3	3	2,63	9,02	4,00	4,77	0,41	1,12
11	cs49p0 100 %	3	3	3,63	1,75	3,78	2,49	1,22	0,84
5	Cs126p1	3	2	2,99	3,28	2,29	1,68	1,39	1,39
12	Cs130p0	3	2	11,96	10,77	4,87	10,89	1,23	1,83
13	Cs134p1	3	3	10,8	7,82	1,81	1,291	0,960	1,54
14	Cs141p2	3	2	7,27	13,60	0,02	5,17	0,78	0,54
15	Cs145p3	3	2	0,10	2,53	2,35	1,10	0,22	0,31
16	Cs146p0	3	2	0,11	7,25	2,21	2,50	0,61	1,05
17	cs49p1 90 %	3	2	0,51	0,18	1,53	1,21	0,20	0,43
6	Cs136p1	3	1	0,81	1,14	0,44	0,48	0,42	0,37
18	Cs137p3	3	1	0,63	3,19	1,64	0,87	1,01	0,81
19	Cs145p2	3	1	3,19	5,08	0,29	3,97	1,73	1,60
20	Cs146p1fbs	3	1	1,47	2,00	0,79	1,61	1,57	3,82
21	Cs130p2	3	0	8,14	0,43	0,90	1,32	1,30	3,18
22	Cs142p1	3	0	0,12	3,50	1 0,94	1,30	1,03	1,38
23	Cs113p1	2	4	3,00	3,89	3,54	1,02	0,80	0,38
24	cs55p1	2	3	1,24	3,93	1,01	1,70	0,22	3,67
25	Cs134p2	2	2	8,18	14,54	1,99	2,45	3,09	1,33
26	Cs127p1	2	2	6,85	10,48	0,82	3,08	0,84	1,83
27	Cs137p4	2	2	0,34	1,73	0,87	1,04	0,57	0,84
28	Cs141p5	2	2	0,37	4,23	5,22	2,28	1,06	0,30
29	cs28p1	2	2	1,20	0,53	0,90	0,65	0,52	0
30	cs43p1	2	2	1,67	0	1,16	0,74	0,40	0
31	cs43p0	2	1	0,64	0	1,46	0,84	0,13	0
32	cs41p1	2	0	0,44	0,05	1,18	0,55	0,25	0,35
33	Cs148p3	2	-1	0,31	0,87	1,63	0,88	1,36	1,63
34	Cs139p1	2	-2	0,44	0,15	0,02	0,55	0,93	2,33
35	Cs110p3	1	1	1,21	1,08	2,89	0,31	2,37	2,42
36	Cs127p3	1	-1	4,22	1,05	0,01	0,89	1,42	7,72
37	cs22p1	1	-1	0,45	0,33	0,42	2,41	1,23	9,22

Muestra	Código de muestra	Puntuación de histología	Puntuación de ChondroCelect	Marcadores positivos				Marcadores negativos	
				COL11	COL2	FGFR3	FRZB	ALK1	PEDF
38	cs41p2	1	-1	1,26	0	1,72	0,71	1,87	4,42
39	Cs145p5	1	-2	0,15	0,23	0,56	0,50	2,86	2,42
40	Cs41p3	1	-2	0,95	0	1,34	0,23	1,12	4,34
41	Cs125p5	1	-3	3,17	0	0	0,13	3,87	9,02
42	Cs134p5	1	-4	0,07	0,09	0,35	0,34	1,73	1,37
43	Cs146p3	1	-5	0,07	0,01	0,06	0,15	1,65	2,67
44	cs43p2	0	-1	2,56	0	0,13	0,2	1,29	0,41
45	Cs110p5	0	-4	0,54	0,0	0,2	0,0	1,7	7,9
46	Cs41p4	0	-3	0,14	0	0,38	0,11	1,17	1,74
47	Cs146p5	0	-4	0,07	0,14	0,08	0,14	2,13	3,46
48	Cs148p5	0	-4	0,05	0,02	0,16	0,14	1,57	2,34

Ejemplo 2: análisis de datos

- 5 La correlación entre la puntuación de potencial condrogénico como se ha determinado en el Ejemplo 1 y la puntuación de histología se representa en la Tabla 3 y en la Figura 1. El coeficiente de correlación entre la puntuación de potencial condrogénico y la puntuación de histología es de 0,78 y es estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).
- 10 Las muestras con una puntuación de potencial condrogénico de -3 o menos siempre dan como resultado fibrocartilago o nada de fibrocartilago en absoluto. Las muestras con una puntuación de potencial condrogénico de 2 o más siempre darán como resultado cartilago hialino. Las muestras con una puntuación de potencial condrogénico de 1 dan como resultado en 1 de cada 6 casos cartilago hialino.
- 15 Como criterio, se considera que una muestra con una puntuación de potencial condrogénico de 0 o más es adecuada para implantación. Basándose en el conjunto de datos presente es posible predecir en el 77 % (37/48) el resultado de un trasplante con alta certeza y en el 64 % sin errores. Basándose en este conjunto de datos, un cultivo de condrocitos se aprueba para su uso en un procedimiento de ACI cuando la puntuación de potencial condrogénico es de 0 o más.
- 20 En resumen, solamente puede obtenerse cartilago de tipo hialino estable con células que tengan una puntuación de potencial Condrogénico de 0 o más. Las células que no forman cartilago en absoluto tuvieron una puntuación negativa. El análisis adicional de genes individuales puede ayudar adicionalmente a refinar el modelo.
- 25 **a) relación entre la puntuación de potencial condrogénico y la puntuación de histología**
- La relación entre la puntuación de potencial Condrogénico y la puntuación de histología se representa en la Figura 1 y en la Tabla 3.

**Tabla 3: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología, con sumarios estadísticos.**

Puntuación de Chondro-Celect	puntuación de histología						Probabilidad de puntuación de $\geq 2$	
	0	1	2	3	Total	Media	Observada	Ajustada
-5	0	1	0	0	1	1,0	0/1 (0 %)	0,4 %
-4	2	1	0	0	3	0,3	0/3 (0 %)	1,4 %
-3	2	1	1	0	4	0,75	1/4 25 %	5,0 %
-2	0	2	0	0	2	1,0	0/2 (0 %)	16,2 %
-1	1	3	1	0	5	1,0	1/5 (20 %)	41,5 %

Puntuación de Chondro-Select	puntuación de histología						Probabilidad de puntuación de $\geq 2$	
	0	1	2	3	Total	Media	Observada	Ajustada
0	0	0	1	2	3	2,7	3/3 (100 %)	72,4 %
1	0	1	1	4	6	2,5	5/6 (83 %)	90,6 %
2	0	0	6	6	12	2,5	12/12 (100 %)	97,3 %
3	0	0	1	6	7	2,9	7/7 (100 %)	99,2 %
4	0	0	1	2	3	2,7	3/3 (100 %)	99,8 %
5	0	0	0	2	2	3,0	2/2 (100 %)	99,9 %
Total	5	9	12	22	48			

Además de la tabla de frecuencias, la Tabla 3 también muestra la puntuación de histología media para cada valor de la puntuación del potencial Condrogénico. Este valor medio aumenta significativamente (de 1,0 a 2,7) entre las puntuaciones de potencial condrogénico de -1 y 0. Esto sugiere considerar muestras con una puntuación de potencial condrogénico de 0 o más como adecuadas para ACI.

**b) Análisis de datos usando una escala categórica**

Una “escala categórica ordenada” es una escala en la que las categorías se numeran únicamente para mostrar su secuencia: los números reales asignados no proporcionan ninguna otra información. Por ejemplo, la escala de histología en el presente documento toma valores de 0, 1, 2, 3. Interpretar esto como una escala categórica ordenada implica que 1 es mejor que 0, pero no dice nada acerca de cuánto mejor. Para una escala de intervalos, sin embargo, los números reales se interpretan como significativos, en los que 1 es mejor que 0 en la misma cantidad que 2 es mejor que 1, etc. Al calcular los valores medios como en la Tabla 3, se realiza la suposición implícita de que la puntuación de histología puede tratarse de forma válida como una escala de intervalos.

Cuanto más puntos tenga una escala, más se acepta que dicha escala es una escala de intervalos. La puntuación de potencial condrogénico que se representa por 13 puntos de datos se trata en consecuencia como una puntuación de intervalos.

Se presenta un análisis adicional en la última columna de la Tabla 3, que trata la puntuación de histología como una escala categórica ordenada. En el presente documento las puntuaciones se fusionan en dos categorías, 0 o 1 (fibrocartilago ausente o bajo) y 2 o 3 (cartilago hialino), los datos representan la probabilidad de observar una puntuación de histología de 2 o 3.

En las últimas dos columnas de la Tabla 3, la columna con el encabezamiento “observada” muestra los números reales de muestras en esta categoría (y los porcentajes) para cada puntuación de potencial Condrogénico. Este valor también aumenta entre las puntuaciones de potencial condrogénico -1 y 0, lo que sugiere un punto de corte de valor umbral. Para este análisis la puntuación de potencial Condrogénico se considera una escala categórica ordenada.

**c) Análisis de datos usando una escala de intervalos**

Quando la puntuación de potencial Condrogénico se trata como una escala de intervalos, las respuestas observadas pueden suavizarse usando análisis logístico. Este método predice la probabilidad de estar en la categoría deseada (2 o 3). Los valores ajustados no quedan fuera del intervalo plausible (de 0 a 100 %). Estos valores ajustados se muestran en la columna final de la Tabla 3, y muestran el efecto del suavizado. Se supone que estas estimaciones ajustadas proporcionan una predicción más fiable de la probabilidad de obtener una puntuación de histología de 2 o 3 a cualquier puntuación de potencial Condrogénico que por otros métodos. Obsérvese que en particular para una puntuación de potencial condrogénico de -1, el modelo ajustado predice una probabilidad del 41,5 % de obtener un 2 o 3, y en consecuencia, esto plantea la cuestión de si debería aceptarse una puntuación de -1.

Ejemplo 3. Impacto de los marcadores individuales

El impacto de los marcadores individuales se evalúa recalculando el perfil de expresión de 5 marcadores en lugar de 6 marcadores del conjunto de marcadores que determinan la puntuación de potencial Condrogénico en el Ejemplo 1. Se aplicó el mismo sistema de puntuación, en el que las puntuaciones pueden variar ahora de -5 a +5.

Los datos se presentan en las Tablas 4 a 9.

**Tabla 4: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología sin marcador COL11**

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-5					0
-4	1	2			3
-3	3	1			4
-2	1	4	1		6
-1		1	1	1	3
0		1	1	3	5
1			5	5	10
2			3	8	11
3				3	4
4				1	1
5				1	1
total	5	9	12	22	48

**Tabla 5: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología sin marcador COL2**

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-5					
-4	1	1			2
-3	2	1			3
-2	1	3	1		5
-1		2	1	1	4
0	1	2		5	8
1			6	5	11
2			3	7	10
3			1	2	3
4				2	2
5					
	5	9	12	22	48

5

**Tabla 6: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología sin marcador PEDF**

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-5					
-4		1			1
-3	3	1			4
-2	1	1			2

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-1	1	2	1		4
0		3	2		5
1			2	4	6
2		1	3	5	9
3			2	5	7
4			2	8	10
5					
	5	9	12	22	48

**Tabla 7: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología sin marcador FRZB**

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-5		1			1
-4	2	1			3
-3	2	1			3
-2		3	1		4
-1	1	2	1	2	6
0			1	2	3
1		1	5	8	14
2			3	6	9
3			1	2	3
4				2	2
5					
	5	9	12	22	48

**Tabla 8: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología sin marcador ALK1**

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-5					
-4		1			1
-3	3	1			4
-2	1	1	1		3
-1		2			2
0	1	3	2		6
1			1	3	4
2		1	4	7	12
3			3	7	10
4			1	4	5

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				
	0	1	2	3	
5				1	1
	5	9	12	22	48

**Tabla 9: Tabla de frecuencias para la puntuación de histología sin marcador FGFR3**

Puntuación del marcador	Puntuación de histología				Total
	0	1	2	3	
-5					
-4	2	2			4
-3	2	1			3
-2		3	1		4
-1	1	1	2		4
0		2	1	3	6
1			3	8	11
2			4	5	9
3			1	4	5
4				2	
5					
	5	9	12	22	48

5 La parte A de la Tabla 10 a continuación indica para cada uno de los conjuntos de datos presentados en las Tabla 4 a 9 anteriores, para un umbral de una puntuación de marcador, cuántas de las muestras puede clasificarse de forma inequívoca que proporcionan baja calidad (puntuación de histología de 0 o 1 correspondiente a “-” en la Tabla 10) o que proporcionan cartilago de alta calidad (puntuación de histología de 2 o 3, indicado por “+” en la Tabla 10). Las muestras para las que no hay correlación entre la puntuación de marcador y la puntuación de histología se clasifican como muestras “?”. Estos datos indican que cuando se usa un conjunto de 5 marcadores en el que se omiten COL11, COL2 o COL11, se obtienen resultados similares o incluso mejores (es decir menos muestras designadas como “?”).

15 En la parte B de la Tabla 10 los valores de punto de corte están menos restringidos. Cuando para una puntuación de marcador dentro del intervalo indicado, al menos 5 de 6 muestras muestran una correlación entre la puntuación del marcador y la calidad del cartilago, se supone que el intervalo de la puntuación del marcador será predictivo. Usando este enfoque la omisión de COL11 da como resultado resultados mejorados mientras que la omisión de cualquier otro marcador da peores resultados, especialmente cuando se omite Col2 o FGFR3 del conjunto de marcadores del Ejemplo 1.

20 **Tabla 10: Valores predictivos de un conjunto de marcadores que contiene 5 marcadores.**

<b>A</b>	6 marcadores	-COL11	-COL2	-PEDF	-FRZB	-ALK1	-FGFR3
-	7	7	5	7	7	5	7
?	17	14	17	24	27	27	14
+	24	27	26	17	14	16	27
<b>B</b>							
	6 marcadores	-COL11	-COL2	-PEDF	-FRZB	-ALK1	-FGFR3
-	7	13	10	7	7	5	7
?	8	3	12	9	10	11	14

+	33	32	26	32	27	32	27
---	----	----	----	----	----	----	----

Basándose en el presente conjunto de datos y su interpretación, parece que la capacidad predictiva del perfil de expresión de un conjunto de marcadores para la generación *in vivo* de cartílago puede obtenerse también opcionalmente sin COL11 independientemente de la interpretación. Por otro lado la omisión de ALK1 o FRZB da como resultado una capacidad predictiva reducida de los marcadores, independientemente de la interpretación del conjunto de datos presente.

#### Ejemplo 4. Uso de la puntuación de marcador en ensayos de cribado

La evaluación de la estabilidad fenotípica de condrocitos usando una puntuación del marcador acumulada se ensayó en ensayos de cribado para identificar compuestos capaces de afectar a la capacidad de las células para producir *in vivo* cartílago estable y para determinar la naturaleza del efecto de dichos compuestos en las células.

Se realizaron ensayos de cribado en placas de 96 pocillos en las que se sembraron entre 10 000 y 100 000 condrocitos obtenidos de una biopsia de cartílago (recién aislada de pase 0 a P5). Se añadieron compuestos de ensayo en diversas concentraciones y durante diversos periodos de tiempo. Después de la incubación, se recogieron condrocitos, se aisló ARN y se trató con transcriptasa inversa. Se realizó PCR cuantitativa de acuerdo con las instrucciones del procedimiento TaqMan y se determinó la puntuación de potencial Condrogénico de las células como se ha descrito en el Ejemplo 1 (puntuación CC).

#### 1. Ensayo con respecto a moléculas que contrarrestan la desdiferenciación de condrocitos en cultivo en monocapa

El compuesto A era un compuesto candidato que se predijo que tenía un efecto condroprotector y que tenía efectos estabilizadores potenciales en el fenotipo de condrocitos. La determinación de una puntuación de marcador acumulada, más particularmente la puntuación de potencial condrogénico del Ejemplo 1, se usó para determinar el efecto de este compuesto en la estabilidad fenotípica de condrocitos de un cultivo en monocapa de condrocitos.

##### a) Cultivos en monocapa de condrocitos

Se cultivaron condrocitos en un cultivo en monocapa a  $4 \times 10^4$  células/ml en matraces T25. Se añadió compuesto A a las células directamente después de sembrar en placas. Se añadió un volumen final total de 5 ml de medio completo (DMEM + FBS 10 %). Se usaron tres matraces para cada condición (compuesto A 1 o 10  $\mu$ M, control de DMSO). Se reemplazaron medios y compuestos una vez a la semana. A la confluencia, se tripsinizaron condrocitos en el pase 0 (P0), se contaron y se volvieron a sembrar en placas  $2 \times 10^5$  células para cultivo de P1. Las células restantes se pusieron en medio de lisis para extracción de ARN. Se realizó el mismo procedimiento para cultivos de condrocitos P1, P2 y P3. Se usó RT-PCR TaqMan para determinar la expresión de marcadores condrogénicos.

##### b) Aislamiento de ARN, generación de ADNc

Se lavaron condrocitos obtenidos de cultivo en monocapa con PBS y se lisaron usando tampón de RLT que contenía mercaptoetanol 1 % (Qiagen). Las células lisadas se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se purificó ARNm usando el microkit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc usando hexámeros aleatorios siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

##### c) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real TaqMan (RT-PCR)

Se realizó PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-PCR) usando el sistema detector de secuencias ABI prism 7700. Se usó el kit de qPCR Mastermix (Eurogentec) para RT-PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores y sondas usados para el análisis de TaqMan se pidieron a Applied Biosystems o Eurogentec. Se calcularon los datos de PCR en Tiempo Real usando el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (2DDCT) que se define como la cantidad de gen diana normalizada para una referencia endógena ( $\beta$ -actina) y en relación con un calibrador, que en este caso es los niveles de expresión de genes seleccionados en condiciones de control (DMSO).

##### d) Resultados

El compuesto A tuvo un efecto en la expresión de varios marcadores moleculares indicativo de la capacidad condrogénica, estabilidad fenotípica y homeostasis de los condrocitos y fue capaz de contrarrestar la reducción de la puntuación de potencial condrogénico durante la expansión de los condrocitos en cultivo en monocapa (véase Figura 2). Por lo tanto a concentración tanto de 1  $\mu$ M como de 10  $\mu$ M, las puntuaciones de potencial condrogénico para condrocitos a P0 y P3 fueron comparables o incluso aumentaron en comparación con los condrocitos cultivados en ausencia del compuesto. En este último caso se observó una caída de la puntuación de marcador acumulada para condrocitos P3 frente a P0.

El compuesto A tuvo un efecto positivo en la expresión génica de varios de los componentes de la matriz extracelular de los condrocitos. A concentraciones menores (1  $\mu\text{M}$ ) pero no mayores (10  $\mu\text{M}$ ), el compuesto A indujo la expresión de transcritos génicos tanto Col2 como Col11 (Figura 3). El compuesto también aumenta la expresión del marcador FGFR-3 aunque el aumento no fue estadísticamente significativo. Además, el compuesto A inhibe fuertemente la expresión de PDEF a ambas concentraciones ensayadas (Figura 4). A 10  $\mu\text{M}$ , la adición del compuesto también dio como resultado una expresión reducida de ALK1 (Figura 4). Ambos marcadores, cuando se regulan positivamente, se correlacionan de forma negativa con la capacidad condrogénica de las células lo que indica que el compuesto A tiene un efecto positivo y estimulador en el potencial condrogénico de las células de condrocitos y por lo tanto en la condrogénesis.

## 2. Cribado de moléculas con respecto a su capacidad para mediar en la rediferenciación de condrocitos desdiferenciados en cultivo tridimensional.

Se cribaron catorce compuestos con respecto a su capacidad para potenciar la rediferenciación de condrocitos desdiferenciados en cultivos de alginato. Se determinó el efecto de las moléculas en la expresión de los diferentes marcadores moleculares y en la puntuación de marcador acumulada (puntuación de potencial condrogénico como se ha determinado en el Ejemplo 1), para evaluar la capacidad de los compuestos para afectar a la recuperación del fenotipo condrogénico de las células en los cultivos tridimensionales.

### a) Rediferenciación de condrocitos en cultivo de alginato

Después de la expansión en cultivo en monocapa en medio completo, se liberaron condrocitos humanos en el pase 3 (P3) tomados de la rodilla de 5 pacientes de OA (edad 50-65) por tratamiento con tripsina, se contaron y se ensayaron con respecto a viabilidad por el ensayo de exclusión de tripano. Los condrocitos se suspendieron en alginato al 2 % y se añadió cantidad igual de HBSS. La suspensión celular se extrajo en una aguja de jeringa de 10 ml y se transfirió en gotas por un calibre 24 a una solución de cloruro cálcico (5 perlas por pocillo, número de células totales 250000/pocillo). Las perlas se lavaron con NaCl y se añadió nuevo medio completo (DMEM + FBS 10 %). Después de 4 días de cultivo el sobrenadante se retiró y se añadió medio nuevo con los compuestos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Cuatro días después de la adición de los compuestos, se retiró el sobrenadante y las células se liberaron de sus perlas para lisis. Se generaron ARNm y ADNc y se usó RT-PCR TaqMan para medir la expresión de COL2, COL11, FGR3, FRZB, ALK1, PEDF como se ha descrito en el Ejemplo 1.

### b) Resultados

Los efectos relativos de los compuestos en la regulación positiva o negativa de la expresión de genes marcadores en condrocitos cultivados en alginato se resumen en la Tabla 11. Los efectos son relativos a los condrocitos cultivados en ausencia de moléculas (pero en presencia de vehículo DMSO). Los resultados representan la expresión media (media de 5 pacientes con OA) relativa a controles (condrocitos más DMSO). NS = no significativo; - = inhibe; + = potencia; # =  $p < 0,05$  significativo cuando se compara con DMSO de control. Los compuestos se usaron a 10  $\mu\text{M}$ .

Varias moléculas fueron capaces de afectar a la expresión de diversos genes marcadores de una manera positiva o negativa. Solamente dos compuestos (Cpd 8 y Cpd 14) tuvieron un efecto positivo en la puntuación de marcador acumulada (puntuación CC) lo que indica que estos compuestos podrían potenciar/mediar en la rediferenciación de los condrocitos. Sin embargo, solamente Cpd 14 tuvo el efecto deseado en cada uno de los marcadores individuales, sin ningún efecto en la expresión génica de BMP2 o ALK1. Este compuesto podría ser útil en la estimulación de la desdiferenciación de condrocitos *ex vivo* antes de la reimplantación y podría por lo tanto desviar el equilibrio hacia la formación *in vivo* de cartílago hialino articular.

**Tabla 11. Efecto de los compuestos de ensayo en la expresión de la modulación fenotípica de condrocitos desdiferenciados cultivados en cultivos de alginato.**

compuestos	COL2	FGR3	BMP2	COL11	ALK1	PEDF	puntuación CC
Cpd 1	NS	-#	NS	NS	NS	-#	NS
Cpd 2	-#	NS	-#	NS	NS	-#	NS
Cpd 3	-#	-#	NS	-#	NS	-#	NS
Cpd 4	-#	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cpd 5	-#	-#	-#	NS	NS	-#	-#
Cpd 6	-#	-#	-#	NS	NS	-#	-#
Cpd 7	NS	-#	NS	NS	NS	NS	NS

<i>compuestos</i>	COL2	FGR3	BMP2	COL11	ALK1	PEDF	<i>puntuación CC</i>
Cpd 8	NS	NS	NS	-#	-#	NS	+#
Cpd 9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cpd 10	-#	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cpd 11	-#	-#	+#	NS	NS	-#	-#
Cpd 12	-#	NS	+#	NS	-#	-#	NS
Cpd 13	-#	NS	NS	NS	NS	-#	-#
Cpd 14	+#	+#	NS	+#	NS	-#	+#

Ejemplo 5. Ensayo del efecto de los compuestos condroprotectores *in vivo*

5 Para los compuestos del Ejemplo 4 que afectan significativamente a la puntuación de potencial condrogénico, el efecto de los compuestos en la estabilidad fenotípica de condrocitos de las células también se ensaya *in vivo*. Para este fin, se ponen en contacto poblaciones celulares con el compuesto de ensayo o tampón y, después de incubación, se inyectan en el modelo de ratones desnudos (véase anteriormente). Se evalúa la capacidad de cada una de las poblaciones celulares para producir cartílago hialino estable. Se establece que el efecto del compuesto en la puntuación de potencial condrogénico se correlaciona con el efecto en el potencial condrogénico de la población celular.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Tigenix N.V.  
Luyten, Frank  
De Bari, Cosimo  
Dell'Accio, Francesco

20 <120> Genes marcadores para uso en la identificación de estabilidad genotípica de condrocitos y el cribado de factores que influyen en la producción de cartílago

<130> T4503-PCT

25 <150> US 60/867.152  
<151> 24-11-2006

<160> 14

30 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador de PCR

40 <400> 1  
tgacggggtc acccacactg tgcccatcta 30

45 <210> 2  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador de PCR

50 <400> 2  
ctagaagcat ttgcggtgga cgatggaggg 30

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 3  
 gaactccatc ttcctcgc 19  
 10  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 4  
 gagactggat ttcaaggcaa g 21  
 20  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 5  
 ccctgagtgg aagagtggag 20  
 30  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 6  
 gaggcgtgag gtcttctgtg 20  
 40  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 7  
 ttcaaggggc agtgggtaac 20  
 50  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 8  
 taaggtgata gtccagcggg 20  
 60  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 8  
 taaggtgata gtccagcggg 20  
 65

5 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 10 <400> 9  
 tgtaagtctg tgtgcgagcg 20  
  
 15 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 20 <400> 10  
 gatttagtg cgtgcttgcc 20  
  
 25 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 35 <400> 11  
 cgacggaggc aggagaagca g 21  
  
 40 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 45 <400> 12  
 tgaagtcgcg gtgggcaatg g 21  
  
 50 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 55 <400> 13  
 gctgaaagac gatgccactg 20  
  
 60 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
  
 65 <400> 14

aggaccccaa aggaccagac 20

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar la capacidad de una población celular para producir *in vivo* cartílago hialino estable, que comprende determinar la expresión por dicha población de un conjunto de al menos tres genes marcadores que comprenden FRZB (Proteína Relacionada con Frizzled 1), ALK1 (Receptor de Activina A, Quinasa 1 de Tipo II) y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF (Factor Derivado de Epitelio Pigmentario), COL 11 (Colágeno, Tipo XI A1), COL2 (Colágeno, Tipo II, Alfa 1), FGFR3 (Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 3), OPN (Osteopontina), BMP-2 (Proteína Morfogenética del Hueso 2) y RASF-PLA (Fosfolipasa A2, Grupo IIA).
2. El método de la reivindicación 1, en el que la población celular se pone en contacto con un compuesto o una condición.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en factores del crecimiento, mitógenos, aditivos y moléculas químicas pequeñas, o en el que dicha condición se selecciona del grupo que consiste en un medio de cultivo específico, temperatura de cultivo, tiempo de cultivo, densidad de cultivo y la combinación de una población celular de la reivindicación 1 con otro tipo celular.
4. El método de las reivindicaciones 2 o 3, que comprende las etapas de:
- poner en contacto la población de células con dicho compuesto o condición, y
  - determinar el nivel de expresión por dicha población de células de un conjunto de al menos tres genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y uno o más genes marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL 11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA.
5. El método de la reivindicación 4, que comprende además las etapas de:
- antes de dicha etapa de contacto, determinar el nivel de expresión por dicha población de células de dicho conjunto de al menos tres genes marcadores, y
  - después de dicha etapa de contacto, determinar si el compuesto o la condición es capaz de afectar a la expresión de uno o más de dicho conjunto de al menos tres genes marcadores.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el conjunto de al menos tres marcadores es un conjunto de al menos 4, 5 o 6 genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y que comprenden respectivamente 2, 3 y 4 genes marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL 11, COL2 y FGFR3.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el conjunto de al menos tres genes marcadores es un conjunto de al menos seis genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1, PEDF, COL 11, COL2 y FGFR3.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que comprende además determinar, basándose en el efecto de la presencia del compuesto en la expresión del conjunto de al menos tres genes marcadores, la capacidad del compuesto para afectar a la capacidad de la población celular para producir *in vivo* cartílago hialino estable.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que un compuesto capaz de aumentar la expresión de uno o más genes marcadores positivos seleccionados del grupo que consiste en FRZB, COL 11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA se identifica como que afecta positivamente a la formación de cartílago y compuestos capaces de aumentar la expresión de PEDF y/o ALK-1 se identifican como que afectan negativamente a la formación de cartílago.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la capacidad de un compuesto o condición para afectar a la formación de cartílago se determina basándose en el efecto acumulado del compuesto o de la condición en la expresión de los genes marcadores positivos seleccionados del grupo que consiste en FRZB, COL 11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2, RASF-PLA y los genes marcadores negativos PEDF y/o ALK- 1.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la población de células se obtiene de una articulación.
12. Uso de un conjunto de marcadores para identificar un compuesto que es capaz de afectar a la capacidad de las células para producir *in vitro* formación de cartílago, **caracterizado porque** el conjunto de marcadores comprende un conjunto de al menos tres genes marcadores que comprenden FRZB, ALK1 y uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en PEDF, COL 11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 y RASF-PLA.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el conjunto de marcadores comprende al menos seis marcadores que comprenden FRZB, ALK 1, PEDF, COL 11, COL2 y FGFR3.

14. Un kit que comprende sondas para detectar la expresión de un conjunto de genes en células formadoras de cartílago en el que el conjunto de genes consiste en FRZB, ALK1, PEDF, COL 11, COL2 y FGFR3.
- 5 15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que las sondas para detección de al menos uno de los genes marcadores se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótidos que hibridan con ARNm, conjuntos de cebadores de PCR y anticuerpos.
- 10 16. Un dispositivo para detectar la expresión de un conjunto de genes en células formadoras de cartílago, comprendiendo dicho dispositivo lo siguiente:
- una unidad para detectar la expresión de los genes marcadores,
  - y sondas para un conjunto de genes marcadores que consisten en FRZB, ALK1, PEDF, COL 11, COL2 y FGFR3.

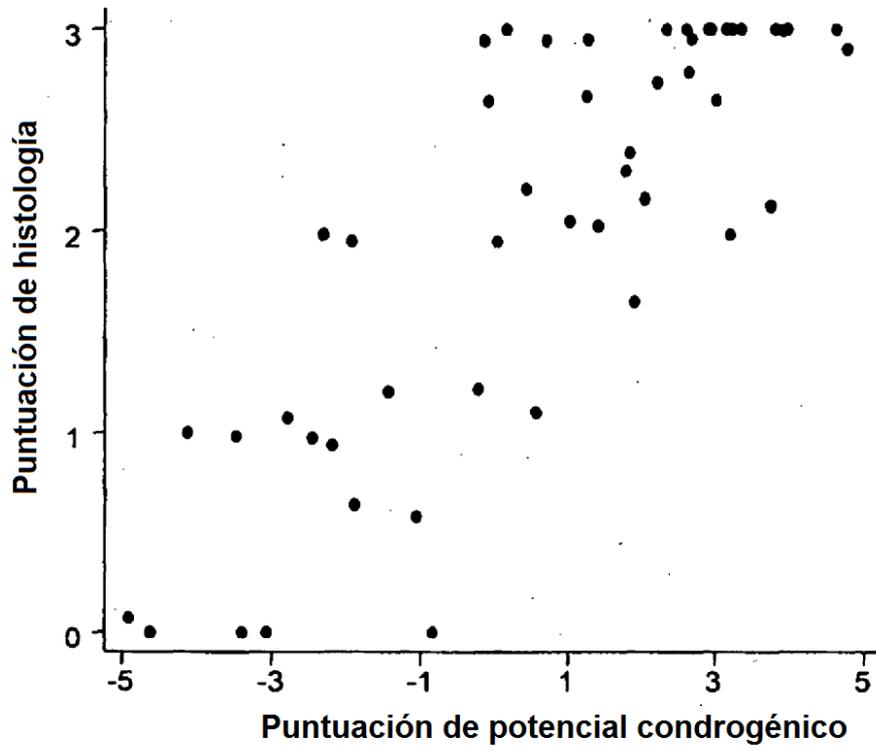


Figura 1

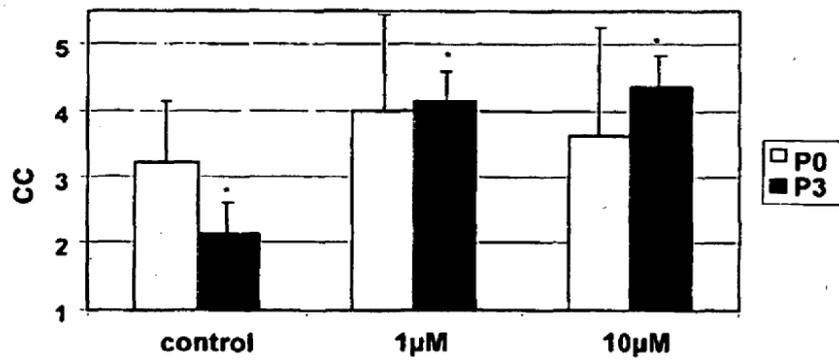


Figura 2

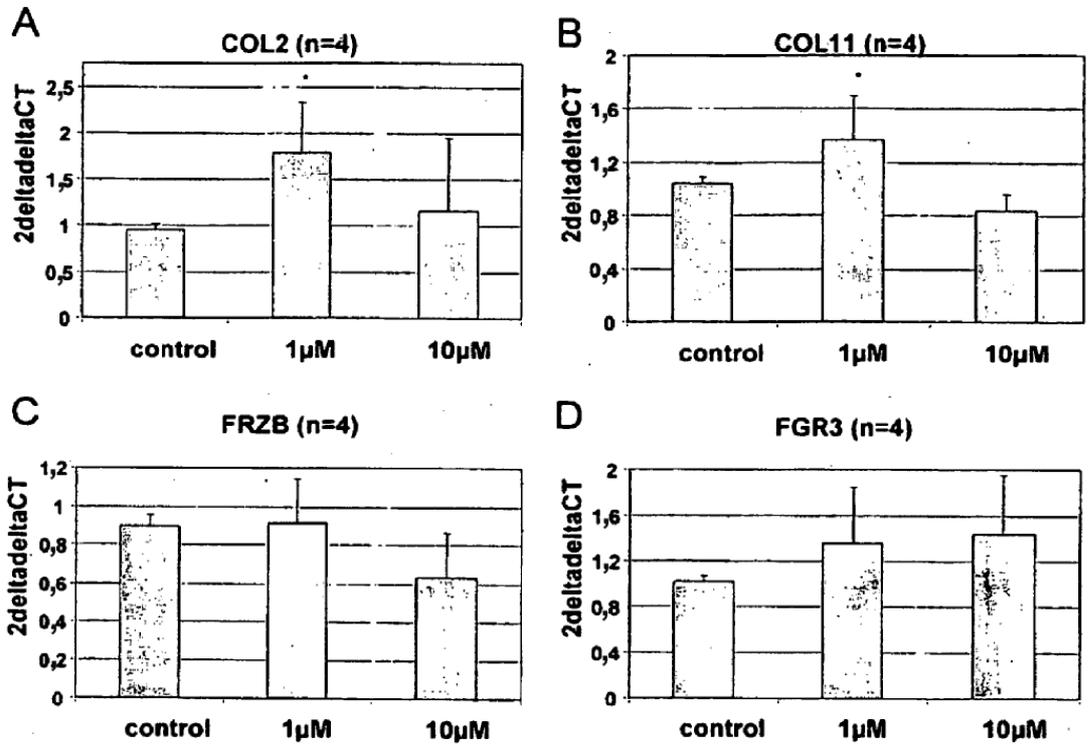


Figura 3

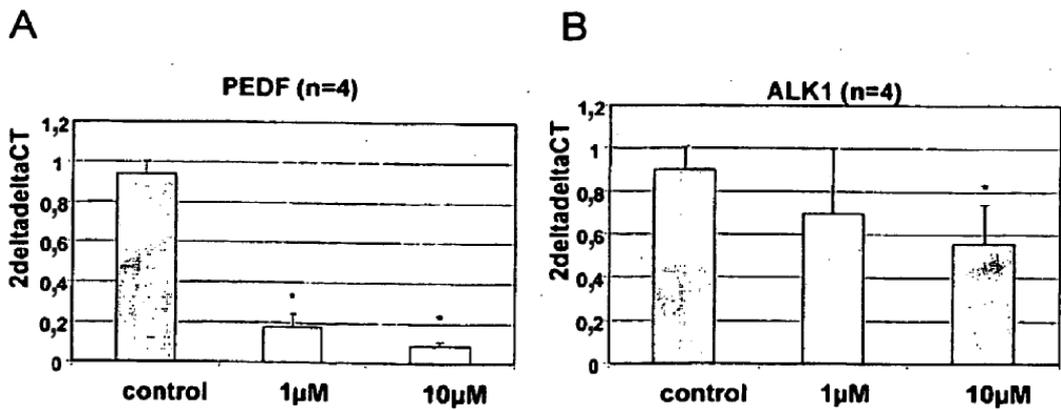


Figura 4