

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 757**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2008** **E 08831789 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014** **EP 2201099**

54 Título: **Método de expansión de condrocitos con conservación fenotípica**

30 Prioridad:

21.09.2007 US 859524

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

05.03.2015

73 Titular/es:

**ISTO TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
1155 OLIVETTE EXECUTIVE PARKWAY
ST. LOUIS, MO 63132, US**

72 Inventor/es:

**ADKISSON, IV, H. DAVIS;
MILLIMAN, CURT L. y
KIZER, NEIL**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 530 757 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de expansión de condrocitos con conservación fenotípica

Antecedentes de la invención

5 Millones de personas solo en los Estados Unidos padecen artritis degenerativa o dolor inflamatorio que limita la función normal de las articulaciones y produce la pérdida de calidad de vida. La principal causa de la artritis degenerativa es la degradación de la matriz cartilaginosa. El cartílago es un tejido conectivo blando, flexible, que cubre las terminaciones de una articulación que actúa como amortiguador de los huesos y permite que la articulación se mueva fácilmente sin dolor. La pérdida de cartílago articular en las articulaciones debido a lesión traumática o a enfermedad produce finalmente rigidez articular causada por "movimiento de hueso sobre hueso" y exposición al dolor de las terminaciones nerviosas en huesos subcondriales.

10 En mamífero, el cartílago contribuye a la estructura de diversos órganos y sistemas como la superficie articular de las articulaciones y otras estructuras asociadas con las articulaciones, incluyendo el oído, la nariz, la laringe, la tráquea, los bronquios, estructuras de las válvulas cardíacas, etc. Existen diferentes tipos de cartílago en mamíferos: fibrocartílago, cartílago elástico y cartílago hialino. El fibrocartílago contiene un colágeno de tipo I abundante y se encuentra en los discos intervertebrales y ligamentos. El cartílago elástico contiene fibrillas de elastina y se encuentra en los pabellones auriculares en la epiglotis. El cartílago hialino, un tejido cartilaginoso semitransparente y claro encontrado en las paredes cartilaginosas de la tráquea y bronquios, el cartílago costal y la placa de crecimiento, así como en el cartílago de la nariz, laringe y articulaciones diartrodiales, no contiene colágeno de tipo I ni elastina. El cartílago hialino, que tiene una combinación característica de colágenos específicos de cartílago (tipos II, VI, IX y XI) y proteoglucanos de agregación (agrecano) que le proporcionan la habilidad exclusiva de resistir fuerzas compresivas, se denomina cartílago articular.

15 Los daños producidos en el cartílago articular dan lugar a lesiones de la superficie articular y la degeneración progresiva de estas lesiones a menudo conducen a artralgia sintomática, minusvalía y funcionalidad reducida o alterada. Los defectos de la superficie articular pueden ser el resultado de diversas etiologías, incluyendo procesos inflamatorios, neoplasias, sucesos post-traumáticos y degenerativos, etc. El cartílago articular adulto tiene un inconveniente principal: a diferencia de la mayoría de los tejidos, no puede restaurarse por sí mismo. La ausencia de aporte sanguíneo limita en gran parte la capacidad de los tejidos para acumular células condroprogenitoras que pueden actuar restaurando los defectos del cartílago articular. En consecuencia, los defectos del cartílago articular que han progresado a enfermedad degenerativa avanzada requieren artroplasia articular total para eliminar el dolor y restablecer la función articular normal.

20 El crecimiento tisular diseñado de cartílago articular representa una solución biológica que puede retrasar o reducir la necesidad de materiales basados en metales y polímeros normalmente utilizados en la artroplasia articular total. Se han intentado diversas estrategias biológicas para restaurar o regenerar el cartílago articular que está lesionado por traumatismo o enfermedad (Hunziker, 2003). La mayoría de estas estrategias combinan terapia basada en células con polímeros biodegradables para crear una construcción tridimensional que puede trasplantarse en la rodilla. Sin embargo, estas terapias experimentales no han producido una restauración duradera del cartílago hialino (Buckwatter et al., 1990; Hunziker, 2002).

25 Una técnica que ha merecido la aprobación de la FDA para la restauración del cartílago es el Implante de Condrocitos Autólogos (Carticel, Genzyme Surgery). En este procedimiento, se obtiene una pequeña biopsia tisular del cartílago articular del paciente tomada en el laboratorio en la que los condrocitos (células cartilaginosas) se aíslan y expanden *ex vivo* para su reimplante posterior en el paciente en un segundo procedimiento quirúrgico. Una limitación clave de este método es el número relativamente pequeño de células donantes que puede obtenerse en la biopsia, y condrocitos derivados del cartílago articular adulto parecen tener una capacidad limitada para producir matriz cartilaginosa después de la expansión.

30 Una estrategia satisfactoria de tejido diseñado para restaurar el cartílago puede usar células que pueden expandirse en un proceso gradual que es tanto eficaz como reproducible y que conserva la capacidad de que los condrocitos expandidos sinteticen cartílago funcional para su uso en el trasplante. Actualmente, la técnica más ampliamente usada para la expansión de condrocitos es el cultivo monocapa (Patente de Estados Unidos N° 4.356.261). Sin embargo, los condrocitos que crecen en cultivo monocapa usan un medio que contiene suero sometido a un proceso de desdiferenciación en el cual los condrocitos pierden su forma esférica y adquieren una morfología fibroblástica alargada. Los cambios bioquímicos asociados con la pérdida de la forma original de los condrocitos incluyen la síntesis detenida de los colágenos y proteoglucanos específicos de cartílago, la posterior iniciación de la síntesis de colágeno de tipo I y III y el aumento de la síntesis de pequeños proteoglucanos no agregantes.

35 La pérdida de fenotipo condrocitario durante la expansión en serie *in vivo* posee una limitación clave para la comercialización de estrategias ortobiológicas para la restauración del cartílago articular. Para contrarrestar la desdiferenciación, los condrocitos tradicionalmente se han suspendido en entornos tridimensionales tales como hidrogeles, por ejemplo, agarosa (Benya y Shafer, 1982) o alginato (Hauselmann et al., 1994 y 1996), cultivo granular (Mackay et al., 1998; Jakob et al., 2001; Barbero et al., 2004), o armazones tridimensionales (Vacanti et al.,

1998). Se dice que los condrocitos conservan mejor su aspecto morfológico redondeado original y sintetizan macromoléculas características de cartílago hialino cuando se mantienen en cultivo de suspensión tridimensional después de la expansión. Sin embargo, muchos de dichos condrocitos cultivados aún producen colágeno de tipo I y pequeños proteoglicanos, indicando un fenotipo cartilaginoso "incompletamente" restaurado. Además, la posibilidad de transportar materiales residuales derivados de los hidrogeles tridimensionales puede complicar la ruta reguladora. Por ejemplo, el alginato, se dice que induce la inflamación y puede ser citotóxico cuando se usa *in vivo*. Una estrategia lógica para mantener el fenotipo condrocitario durante la expansión *in vitro* sería recapitular *in vivo* el microentorno en el cual los condrocitos se exponen naturalmente durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto, matrices tales como ácido hialurónico, colágeno de tipo II y VI o proteoglicanos de agregación pueden servir como excelentes sustratos para la expansión y crecimiento de condrocitos, particularmente en ausencia de factores derivados de suero. Durante el desarrollo embrionario, la condensación y la proliferación de células progenitoras mesenquimáticas forman el precursor cartilaginoso a través de un proceso conocido como condrogénesis. Además, la diferenciación del molde cartilaginoso produce la formación de cartílago articular en las articulaciones y huesos. Se piensa que muchos factores desempeñan un papel crítico en la condrogénesis, incluyendo la matriz extracelular, factores de crecimiento y diferenciación, sus antagonistas así como receptores de membrana específicos de la superficie celular, incluyendo, N-cadherina, receptor de proteína morfogenética ósea de tipo 1A (BMP-1A) y receptor de proteína morfogenética ósea de tipo 1 B (BMP-1 B). Un componente importante de la matriz extracelular, el ácido hialurónico (AH) desempeña un papel crítico en el desarrollo del cartílago y en el mantenimiento de la homeostasis tisular. El AH es un glucosaminoglucano lineal, no sulfatado, de la matriz extracelular que consta de unidades de repetición de ácido (β , 1-4) D-glucurónico-(β 1-3)-N-acetil-D-glucosamina (Laurent, 1970). El AH se distribuye en cualquier parte en los tejidos corporales y se ha observado que desempeña una función importante en diversos procesos biológicos incluyendo el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el crecimiento tumoral proporcionando una matriz provisional que da soporte a la migración, adherencia, proliferación y diferenciación celular (Laurent y Fraser, 1992). En su estado original, el AH existe como un polímero de alto peso molecular, normalmente mayor de 1×10^6 daltons. Sin embargo, durante la morfogénesis, la inflamación y la restauración tisular, se generan formas de peso molecular reducido mediante escisión proteolítica. Se dice que el ácido hialurónico de peso molecular intermedio (de 200.000 a 400.000) promueve la diferenciación de células progenitoras condrogénicas (Kujawa et al., 1986 A y 1986B), mientras que el AH de PM reducido promueve la angiogénesis (West et al., 1985). Dichos descubrimientos han conducido al desarrollo comercial de armazones basados en AH para el crecimiento de cartílago y hueso de diseño tisular, como medio para regenerar tejidos que se han destruido por traumatismo o enfermedad (Campoccia et al., 1998 Patente de Estados Unidos N° 6.251.876; 5.676.964; 5.658. 582).

El documento US2006/0073588 desvela un método de crecimiento de condrocitos sobre un sustrato modificado por unión covalente del ácido hialurónico, para conservar la morfología condrocitaria original y función.

35 **Compendio de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir tejido cartilaginoso *in vitro*, comprendiendo el método:

- a) aislar una población de condrocitos de tejido cartilaginoso donante;
- b) expandir la población de condrocitos cartilaginosos en un medio de expansión y en un sustrato en condiciones eficaces para impedir la unión de una mayoría de los condrocitos al sustrato, en el que las condiciones comprenden expandir la población de células usando condiciones que comprenden:
 - (i) un sustrato que tiene un recubrimiento de ácido hialurónico; o
 - (ii) un sustrato no modificado que usa un medio de expansión que comprende ácido hialurónico en solución;
- c) sembrar una pluralidad de condrocitos a partir de la población expandida de condrocitos cartilaginosos en un medio de producción tisular que comprenda TGF- β , en un sustrato de policarbonato que tenga una pluralidad de poros a través del mismo, teniendo los poros un diámetro interno de al menos 1 micra a aproximadamente 12 micras; y
- d) cultivar los condrocitos sembrados en el medio de producción tisular en el sustrato de policarbonato poroso durante un periodo de tiempo suficiente para que los condrocitos produzcan matriz extracelular, produciendo de este modo *in vivo* un tejido cartilaginoso cultivado caracterizado por una organización de células al azar.

En una realización, después de al menos 3,8 duplicaciones de la población de condrocitos, al menos el 50 % de los condrocitos conservan morfología redondeada y expresión génica de cartílago hialino. La expansión de la población de células en condiciones de baja adhesión incluye la expansión de la población de células usando condiciones establecidas usando uno de lo siguiente: un sustrato modificado o no modificado con AH usando un medio de expansión que comprenda un agente de baja adhesión en solución. El agente de baja adhesión es, por ejemplo, ácido hialurónico (AH). En una realización, el medio de expansión es medio asérico, que opcionalmente incluye una cantidad de TGF- β . En una realización ilustrativa el medio de expansión contiene TGF- β 10 ng/ml. En otra realización el medio de expansión incluye adicionalmente FGF, y en una realización ilustrativa se incluye FGF 100

ng/ml que opcionalmente incluye FGF hasta 200 ng/ml. En otra realización el medio de expansión comprende adicionalmente L-Glutamina y Vitamina C. En otra realización, el método incluye adicionalmente inyectar, a un sujeto que necesite restaurar el cartílago, la población expandida de condrocitos.

5 En una realización la expansión de la población de condrocitos incluye una expansión celular primaria y una expansión celular secundaria que están opcionalmente separadas por un periodo de crioconservación. En una realización, después de sembrar la población de condrocitos en un sustrato de policarbonato para producir matriz extracelular, el método incluye adicionalmente exponer la población de condrocitos a TGF- β en el medio de producción tisular durante un periodo de aproximadamente siete (7) días. En otra realización, el método incluye adicionalmente mantener la población de condrocitos durante un periodo de cultivo de aproximadamente cuarenta y cinco (45) a aproximadamente sesenta y cinco (65) días en el medio de producción tisular. El mantenimiento de la población de condrocitos en un medio de producción tisular incluye, por ejemplo, mantener la población de condrocitos a un nivel predeterminado de oxígeno y dióxido de carbono en el medio de producción tisular.

15 También se desvela un aparato de cultivo tisular que incluye un sustrato de policarbonato que tiene poros múltiples a través del mismo, caracterizándose los poros por un diámetro interno de al menos aproximadamente 1 micra a aproximadamente 12 micras. El aparato de cultivo tisular puede ser una membrana de policarbonato perforada. La membrana de policarbonato perforada puede tener un grosor de aproximadamente 10 micras. Los poros en la membrana de policarbonato perforada pueden caracterizarse por diámetros distribuidos alrededor de 3 micras. El aparato de cultivo tisular puede incluir adicionalmente paredes laterales que forman un perímetro alrededor del sustrato de policarbonato, seleccionándose el perímetro de una forma predeterminada como una forma para un tejido cultivado. Las paredes laterales se fabrican, por ejemplo, de un polímero biocompatible, que en una realización es semipermeable y en otra realización es impermeable. El polímero biocompatible puede ser por ejemplo, poliestireno.

20 También se describe un inserto de cultivo tisular que incluye un sustrato de policarbonato que tiene una pluralidad de poros a través del mismo, teniendo cada uno de los poros un diámetro interno de al menos aproximadamente 1 micra a aproximadamente 12 micras, y paredes laterales que forman un perímetro alrededor del sustrato de policarbonato, seleccionándose el perímetro de una forma predeterminada como una forma para el tejido cultivado.

Breve descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 es una representación gráfica que muestra la pérdida de potencial de diferenciación de condrocitos en función del número de pases en medio que contiene suero. Se expandieron condrocitos articulares de donantes jóvenes en tres pases en medio que contenía suero usando cuatro formulaciones diferentes de medio basal. S-GAG, glucosaminoglucano sulfatado; ADN, ácido desoxirribonucleico. DMEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco; LG, glucosa inferior; HL-1, Medio Asérico Completo HL-1 TM de Cambrex (actualmente disponible como Medio de Hibridoma Asérico HL-1 TM de Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, Md.)

35 La FIG. 2 es una representación de los métodos químicos usados para unir covalentemente AH a una superficie de poliestireno, originalmente descritos por Turley y Roth (Turley y Roth, 1979). HSO₃, ion de sulfito de hidrógeno; NH₄OH, amoniaco líquido; H₂O, agua; AH, ácido hialurónico; EDC, hidrocioruro de 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

40 La FIG. 3 es una representación gráfica del método actual de expansión de condrocitos mediada por citocinas en un sustrato de hialuronato sódico y posterior crecimiento de neocartílago. UnTx, plástico de cultivo tisular no modificado; HATx, plástico de cultivo tisular modificado con AH; ensayo NC, ensayo funcional de neocartílago.

La FIG. 4 muestra la composición bioquímica de injertos NC que se produjeron a partir de condrocitos que se expandieron en poliestireno modificado con AH en medio asérico definido que contenía factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y vitamina C en comparación con condrocitos recién aislados. Los condrocitos procedían de cartílago articular de donantes jóvenes.

45 La FIG. 5, en dos partes, FIGS. 5A y 5B, muestran el efecto de la unión covalente del hialuronato sódico sobre la morfología de condrocitos. La FIG. 5A muestra el aspecto morfológico de condrocitos después de un cultivo de expansión de 10 días en poliestireno modificado con AH usando un medio asérico definido que contiene la variante del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (vFGF2), TGF β y vitamina C. La FIG. 5B muestra el aspecto morfológico de los mismos condrocitos desarrollados sobre poliestireno no modificado usando las condiciones identificadas en A.

50 La FIG. 6 es una fotomicrografía de neocartílago producido a partir de dos pases (P2) de condrocitos que se expandieron en poliestireno modificado con AH en Medio Asérico Completo HL-1 TM que contenía una variante del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (vFGF-2), factor de crecimiento transformante beta-2 (2 ng/ml) [ProChon Ltd.] y TGF β -2 (10 ng/ml).

55 La FIG. 7 es una representación gráfica que muestra la composición bioquímica de matriz NC recién sintetizada de condrocitos que se expandieron en poliestireno modificado con AH frente a células control que se expandieron en poliestireno no modificado.

S-GAG, glucosaminoglucanos sulfatado; ADN, ácido desoxirribonucleico; UnTx, plástico de cultivo tisular no modificado; HATx, plástico de cultivo tisular modificado con AH. Un * indica significado ($P < 0,05$) relativo a injertos que se produjeron con células que derivaban de la expansión en ausencia de sustrato modificado con HA.

5 La FIG. 8, en dos partes, FIGS. 8A y 8B, representa un análisis de perfil de expresión génica obtenidos para condrocitos de células disociadas en las que no se han realizado pases (P0) y células en las que se han realizado dos pases (P2) recogidos de un donante de 14 meses de edad. El análisis de expresión génica semicuantitativo se realizó usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). PM, marcadores de peso molecular; GAP, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; AGG, proteína núcleo agregcano; COL 1A1, colágeno de tipo 1; COL 2A1, colágeno de tipo IIA; COL 9A1, colágeno de tipo IX; COL 11A1, colágeno de tipo XI, SOX9, factor de transcripción específico de cartílago.

10 La FIG. 9, en dos partes, FIGS. 9A y 9B, representa un análisis de perfil de expresión génica obtenido para condrocitos articulares derivados de cartílago de donantes jóvenes que se expandieron usando los métodos de la invención descrita (Panel A) a través de 3,8 duplicaciones de población o en Medio Asérico Completo HL-1 que contenía suero al 10 % y ascorbato (50 $\mu\text{g/ml}$) (Panel B) a través de 4,2 duplicaciones de población, NCAD, N-cadherina.

15 La FIG. 10, en tres partes, FIGS. 10A, 10B y 10C, son fotomicrografías de condrocitos en cultivo de expansión usando uno de ellos una de las tres condiciones diferentes de adhesión baja, respectivamente: sustrato de poliestireno modificado con AH (FIG. 10A), medio de expansión químicamente definido complementado con AH sobre sustrato de poliestireno no modificado (FIG. 10B) y material de sustrato de poliestireno de adhesión Ultra-Baja fabricado por Corning (FIG. 10C).

20 La FIG. 11 es una representación gráfica de la tasa de síntesis de proteoglucano por condrocitos expandidos en cultivo después del crecimiento de neocartílago sobre insertos de policarbonato.

La FIG. 12 es una fotomicrografía de tejido neocartilaginoso producido usando condrocitos que se mantuvieron en una condición de adhesión baja durante la expansión.

25 La FIG. 13 es una representación gráfica que muestra la composición bioquímica de injertos tisulares neocartilaginosos que se produjeron de condrocitos adultos que se expandieron en poliestireno modificado con AH a través de dos pases en un medio asérico químicamente definido que contenía bFGF. TGF- β y vitamina C a través de un aumento acumulativo de 5,8 duplicaciones de población.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

30 Abreviaturas y Definiciones

El término "condrocitos" se refiere a células específicas de cartílago que producen tejido cartilaginoso normal cultivado *in vivo*; estas células sintetizan y depositan la matriz de apoyo (compuesta principalmente por colágeno y proteoglucano) de cartílago.

35 El término "fenotipo" se refiere a las características observables a cualquier nivel - físico, morfológico, bioquímico o molecular-de una célula o tejido.

40 El término "neocartílago" se refiere a cartílago cultivado *ex vivo* y caracterizado por uno o más de los siguientes atributos: contener fosfolípidos de membrana ricos en ácido Mead pero sustancialmente reducidos en ácido linoleico o araquidónico, carecer sustancialmente de células endoteliales, óseas y sinoviales, que tienen un contenido de glucosaminoglucano sulfatado (S-GAG) de al menos 40 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de ADN; carecer sustancialmente de colágeno de tipo I, III y X; contener una matriz que carece sustancialmente de biglucano; tener múltiples capas de células dispuestas al azar, en lugar de separadas, en zonas distintas de maduración de condrocitos; ser rico en agregcano de alto peso molecular, o caracterizarse por tener múltiples capas de células envueltas por una matriz extracelular hialina rica en glucosaminoglucano insoluble sustancialmente continuo y colágeno.

45 La expresión "sustrato de hialuronato" se refiere a un sustrato que contiene una mezcla de hialuronato que está comprendida en gran parte por un hialuronato altamente purificado, natural o sintético, tal como hialuronato sódico purificado bien de crestas de gallo o de fermentación bacteriana. El ácido hialurónico es un polisacárido compuesto por unidades de disacáridos de repetición de N-acetilglucosamina y ácido glucorónico. El AH comercial está normalmente en forma de sal sódica.

50 El término "citocina" se refiere a una inmensa serie de proteínas farmacológicamente activas, de peso molecular relativamente bajo, que secreta una célula con la finalidad de alterar su propia función (o funciones) (efecto autocrino) o aquellas de células adyacentes (efecto paracrino). Las citocinas individuales pueden tener múltiples actividades biológicas. Diferentes citocinas también pueden tener actividad redundante.

El término "FGF" indica la familia del factor de crecimiento de fibroblastos de proteínas relacionadas que actualmente cuenta con 22 miembros (en seres humanos, FGF-1-14 y FGF-16-23). "FGF-2" se refiere a la forma

básica del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los FGF generalmente tienen una alta afinidad por los proteoglicanos de sulfato de heparán; las interacciones entre el FGF y la heparina parecen ser necesarias para la activación de cada uno de los receptores de FGF (Ornitz e Itoh 2001). Hay cuatro FGFR (FGFR1-4), teniendo cada uno de ellos muchas variantes de corte y empalme. Una "forma activa" de un polipéptido FGF es un polipéptido que

5 tiene una homología significativa (mayor del 70 %) con al menos una parte de una región conservada de cualquier polipéptido FGF y posee la misma actividad que al menos uno de sus homólogos. El grado de actividad puede ser mayor o menor que al menos uno de los homólogos. En la mayoría de los casos, puede identificarse una región núcleo interna que contiene aproximadamente 28 restos de aminoácidos altamente conservados y seis idénticos, diez de los cuales habitualmente interactúan con los FGFR (Ornitz, 2000 y Plotnikov et al., 2000).

10 La expresión "actividad similar a FGF" se refiere a una actividad de una molécula, tal como un polipéptido, que actúa sobre al menos un tipo de célula de una manera similar a la de la molécula de FGF afín en al menos un aspecto. Por ejemplo, una molécula que tiene actividad similar a FGF puede sustituirse por FGF durante la expansión de condrocitos en los métodos de la invención.

15 El término "TGF- β " indica la familia del factor de crecimiento transformante de proteínas relacionadas. Las proteínas TGF- β pueden reconocerse por la homología polipeptídica del extremo C y por su vía de señalización de proteínas Similares a Madres contra Decapentaplégicas (SMAD) después de la unión de los receptores del TGF- β . Los ejemplos incluyen TGF- β 1-3, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), etc. Una "forma activa" de un polipéptido TGF- β es un polipéptido que presenta homología significativa (mayor del 70 %) con al menos una parte de una región conservada de un polipéptido TGF- β y que posee la misma actividad que la de al menos uno de sus homólogos. El

20 grado de actividad puede ser mayor o menor que el de al menos uno de los homólogos.

La expresión "actividad similar a TGF- β " se refiere a una actividad de una molécula (tal como un polipéptido) que actúa sobre al menos un tipo de célula de una manera similar a la de su molécula de TGF- β afín. Por ejemplo, una molécula que señala mediante las proteínas SMAD, independientemente de si la molécula se ha unido o no al receptor del TGF- β , tiene actividad similar a la del TGF- β . Las moléculas de TGF- β estimulan la síntesis de

25 colágenos, fibronectina proteoglicanos, tenascina, trombospondina, inhibidor del activador de plasminógeno 1 e inhibidor tisular de proteínas de metaloproteasa-1. Una molécula que tiene actividad similar a la del TGF- β , tal como una lactoferrina recombinante, puede sustituirse por TGF- β durante la expansión de condrocitos en los métodos de la invención.

30 La expresión "adhesión celular baja" se refiere a una característica de las condiciones del cultivo condrocitario en las que una mayoría de células sembradas sobre un sustrato tisular no se adhieren al sustrato tisular.

Las siguientes realizaciones se proporcionan como ejemplos no limitantes de diversos modos de llevar a la práctica la invención.

35 En todas las realizaciones, el principio subyacente es mantener el fenotipo condrocitario natural durante la expansión *ex vivo* mediante el crecimiento de condrocitos o células condroprogenitoras disociados en condiciones de adhesión baja que limitan la adhesión y la propagación celular. Se ha descubierto que, las condiciones de adhesión baja, como se describe en el presente documento, incluyendo pero sin limitación, el uso de determinadas superficies de sustrato, soportan el mantenimiento de la morfología, fenotipo y función condrocitaria durante el proceso de expansión. El tejido cartilaginoso producido a partir de los mismos es tanto compatible como inocuo para su uso en aplicaciones médicas. El uso de un sustrato de adhesión baja proporciona un microentorno que se parece mucho más al del cartílago articular natural, dando como resultado la conservación de la forma celular redondeada y la expresión génica del cartílago hialino una vez que las células expandidas salen del ciclo celular. Un ejemplo de una condición de adhesión baja adecuada es el uso de un sustrato modificado con AH, por ejemplo, el uso de una superficie de poliestireno modificada por la unión covalente de hialuronato sódico. Los condrocitos se adhieren a AH inmovilizado mediante un receptor de glucoproteína de la superficie de celular para el hialuronano (CD44) y pueden

45 utilizar el sustrato de AH para ensamblar los agregados de proteoglicano grandes típicamente encontrados en cartílago articular sano, normal.

Como sustrato puede usarse AH de alto peso molecular (>400.000 PM), o en solución, para el cultivo de expansión *in vitro* para aumentar el rendimiento total celular, impidiendo al mismo tiempo la pérdida de función celular diferenciada. Por ejemplo, la expansión de condrocitos que comienza a baja densidad sobre un sustrato modificado con AH en medios químicamente definidos aumenta significativamente el número de células condrocitarias. De manera similar, los condrocitos expandidos en otras condiciones de adhesión baja tales como el uso de AH en solución o el uso de un sustrato de poliestireno que tiene un recubrimiento de Adhesión Ultra Baja, tal como el fabricado por Corning, producen una población expandida que mantiene el fenotipo y la morfología como se determina y se describe en cualquier parte del presente documento. Además, los condrocitos expandidos de esta

55 manera conservan su potencial de diferenciación condrogénico natural para producir tejido neocartilaginoso, y estas células o el neocartilago producido a partir de las mismas pueden usarse para aplicaciones clínicas.

Por tanto, la presente divulgación, proporciona un método de producción de condrocitos en condiciones de adhesión baja de tal manera que los condrocitos permanecen redondeados y débilmente adheridos durante el proceso de expansión. Con el tiempo, se observa que los condrocitos experimentan condensación, formando agregados o

grupos tisulares. Este método exclusivo de expansión de condrocitos permite a las células conservar su actividad funcional después de la expansión. La invención también proporciona kits para la expansión de condrocitos. Por lo tanto, este método sirve para abordar los desafíos identificados en estrategias anteriores basadas en células para restaurar el cartílago articular.

5 Por consiguiente, una realización de la invención es un método en el que los condrocitos aislados se expanden en condiciones de adhesión celular baja sobre un sustrato modificado por unión covalente de AH como se describe en el presente documento, o un sustrato no modificado usando AH soluble en solución en el medio de expansión, o un sustrato recubierto con una composición de adhesión celular baja disponible en el comercio, tal como la disponible en el comercio de Corning, Nunc y CellSeed, Inc..

10 En otra realización adicional de la invención, se proporciona un nuevo método para expandir en serie condrocitos *in vitro* sobre un sustrato. El método incluye las etapas de: aislar condrocitos; hacer crecer los condrocitos en un medio de expansión asérico que contiene citocinas y en condiciones de adhesión baja, tal como sobre un sustrato modificado para reducir la adhesión celular; y después usar los condrocitos expandidos para producir tejido similar al cartílago hialino. La población de células expandida es también muy adecuada para el trasplante, y particularmente para el trasplante por inyección.

15 En un método preferido, los condrocitos se aíslan de cartílago derivado de donantes inmaduros, incluyendo donantes neonatales, niños o preadolescentes para su siembra en placa posterior. Los condrocitos pueden aislarse por métodos conocidos en la técnica tales como técnicas de digestión enzimática secuencial (Adkisson et al., 2001). Después, los condrocitos aislados se siembran sobre un sustrato en una de las múltiples posibles condiciones de adhesión baja. Las condiciones de adhesión baja adecuadas incluyen, por ejemplo, el uso de un sustrato de poliestireno al cual se une covalentemente el hialuronato sódico, el uso de placas de adhesión ultra baja tales como la disponibles en el comercio de Corning, Nunc y CellSeed, Inc. (placas Hydrocell), el uso de poliestireno tratado con cultivo tisular en presencia de medio de expansión asérico que contiene AH soluble y el uso de poliestireno tratado con cultivo tisular en presencia de medio de expansión asérico que contiene un agente de adherencia baja distinto del AH, tal como fosfatidil colina.

20 Los condrocitos pueden ser condrocitos de aves o de mamíferos, preferentemente condrocitos humanos. Los condrocitos pueden proceder de animales transgénicos que se han modificado por ingeniería genética para impedir el rechazo de xenoinjerto mediado por el sistema inmunitario (Sandrin et al., 1995; Sandrin et al., 1996 y Osman et al., 1997). El cartílago puede obtenerse de cualquier tejido que contenga cartílago hialino, elástico o fibrocartílago.

30 A diferencia de otros métodos de expansión de condrocitos conocidos en la técnica, tales como la siembra de células en estructuras tridimensionales, no se necesita material exógeno adicional además del hialuronato sódico para mantener la morfología de los condrocitos diferenciados durante la expansión. El método de expansión de la presente invención proporciona la siembra de condrocitos en contacto directo con una superficie de cultivo tisular apropiada. Aunque el material estructural es innecesario, este puede usarse, por ejemplo en el caso de perlas microtransportadoras de poliestireno.

35 En una realización ilustrativa, un cultivo de expansión se produce aislando condrocitos inmaduros, por ejemplo, cartílago articular de donantes neonatales, de niños o preadolescentes, y sembrando en placas las células disociadas sobre un sustrato de cultivo tisular que se modifica primero mediante adhesión covalente de hialuronato sódico, o usando un medio expansión asérico que contenga AH en solución. La reducción de la adhesión celular y posterior propagación es suficiente cuando se observa que una mayoría de células en la población de partida no se adhiere al sustrato.

40 Los condrocitos aislados se siembran después directamente en un recipiente de cultivo tisular en un medio adecuado. Típicamente, se usa un medio basal que contiene suero, pero como se ha observado que el suero estimula a las células a desdiferenciarse (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1, Figura 1), cualquier medio que contenga suero se cambia por un medio de expansión asérico químicamente definido. "Químicamente definido" se refiere a un medio asérico, cuyos componentes químicos se conocen. Como se usa en el presente documento, la expresión se refiere a esas características de los medios de expansión usados para la expansión y también de los medios de producción tisular usados.

45 Los sustratos adecuados para la expansión son cualquiera de los plásticos de cultivo tisular, tales como poliestireno virgen, poliestireno o policarbonato tratado con cultivo tisular que puede modificarse para la adhesión covalente con ácido hialurónico. Para realizaciones del método en las que se establecen condiciones de adhesión baja usando un sustrato modificado con AH, el único requisito para un sustrato adecuado es que sea tratable para la modificación con ácido hialurónico o N-acetilglucosamina, el bloque de construcción natural para la biosíntesis de AH. Preferentemente, el ácido hialurónico o la N-acetilglucosamina se adhieren covalentemente, aunque en la mayoría de los casos no es necesario una unión covalente, excepto para la adhesión directa a sustratos de poliestireno.

50 La modificación covalente de sustrato con AH proporciona un sustrato que ya no es soluble en medios acuosos y por lo tanto mantiene el fenotipo condrocitario natural durante la expansión de los condrocitos mediada por citocinas en medio de expansión asérico durante el cultivo bidimensional. El ácido hialurónico recapitula un microentorno

cartilaginoso, mientras que el plástico (poliestireno) de cultivo tisular no modificado no lo hace. Sin embargo, puede usarse cualquier otra molécula que promueva el ensamblaje del agregado, por ejemplo, una proteína de unión recombinante.

Reticulantes (Pierce, Rockford, III. "Cross-linkers"; [product literature 2004](#)).

- 5 La reticulación de dos o más moléculas es para unirlos de manera covalente. Los reticulantes, reactivos, reticulantes, etc., son partes que reaccionan con grupos funcionales específicos, tales como aminas primarias, sulfhidrilos, carboxilos, etc. Los reticulantes más comúnmente usados existen en dos formas: homobifuncional y heterobifuncional, aunque los reactivos reticulantes pueden tener más de dos grupos reactivos (por ejemplo, reticulantes trifuncionales). Los enlazadores homobifuncionales tienen dos grupos reactivos idénticos, mientras que los reticulantes heterobifuncionales tienen dos grupos reactivos diferentes. Los reticulantes homobifuncionales se usan en reticulaciones de "una sola fase". Para beneficiarse de los reticulantes heterobifuncionales, se usan procedimientos de reticulación de "fase secuencial". Los reticulantes más habitualmente usados tienen grupos químicamente reactivos; sin embargo, pueden usarse reticulantes con grupos fotorreactivos. Una ventaja de los grupos fotorreactivos es que pueden formar conjugados que, de otra manera, no podrían formarse, usando grupos químicamente reactivos, aunque la eficacia de los grupos reactivos puede ser baja, casi siempre de 10 %, algunas veces hasta de 70 %.

Los reticulantes heterobifuncionales comunes incluyen aquellos que, en un extremo, tienen succinimidil éster reactivo con amina, y en el otro, un grupo reactivo con sulfhidrilo. Otro ejemplo son las carbodiimidias, que son reticulantes de "longitud cero" y efectúan acoplamiento directo entre carboxilatos y aminas primarias.

- 20 La selección de un reticulante se basa en los grupos funcionales diana de las moléculas a reticular y en la compatibilidad de la reacción para la aplicación. También se consideran las siguientes características: especificidad química, longitud del brazo espaciador, solubilidad del reactivo (y en caso de células, permeabilidad de la membrana), si se desea o es apropiado un agente homo- o heterobifuncional, grupos químicamente reactivos o fotorreactivos, de la conveniencia de engarces enlazadores escindibles después de la reticulación, y si del reactivo puede conjugarse con un marcador (por ejemplo, un radiomarcador). Actualmente se dispone de más de 300 reticulantes; un experto en la técnica reconoce que pueden usarse estrategias múltiples para reticular químicamente AH con diversos sustratos sin alterar significativamente la capacidad del AH para interactuar con células, particularmente en el caso de reactivos de desarrollo con brazos espaciadores de longitud aumentada que permiten que el AH esté libremente accesible en el espacio tridimensional.

- 30 La cuestión más importante, tal vez, es saber qué los grupos funcionales están disponibles para el acoplamiento. Por ejemplo, si solo se dispone de restos de lisina o de aminoácidos N-terminales, una elección lógica es los reticulantes homobifuncionales de éster NHS. Si una molécula tiene restos de lisina y, la otra sulfhidrilos, es apropiado un reticulante de éster-NHS-maleimida. Si solo se dispone de restos de lisina en ambas moléculas, la modificación para introducir sulfhidrilos mediante los restos de lisina en una molécula permitiría el acoplamiento secuencial. Si ambas moléculas tienen sulfhidrilos libres, es apropiado un reticulante reactivo con sulfhidrilo homobifuncional. Si se dispone de grupos carboxilos y aminas, la carbodiimida funciona bien. Además, si no hay grupos reactivos disponibles, puede usarse un reticulante fotoactivable. Si los restos de lisina son importantes para funcionalidad de la molécula, entonces puede usarse un reticulante que afecte al acoplamiento a través de sulfhidrilos, carboxilos, o sea inespecífico. La TABLA I enumera algunas clases de grupos reticulantes reactivos y sus dianas de grupo funcionales.

TABLA I			
Grupos reticulantes reactivos y sus dianas de grupo funcionales			
Grupo reactivos (clases)	Grupo funcional (clases)	Grupo reactivos (clases)	Grupo funcional (clases)
aril azida	no selectivo (para amina primaria)	Maleimida	sulfhidrilo
carbodiimida	amina/carboxilo	NHS-éster ¹	amina
hidrazida	carbohidrato oxidado	PFP-éster ²	amina
Hidroximetil fosfina	amina	Psoraleno	timina (intercalador fotorreactivo)
Isocianato	hidroxilo no acuoso	vinil sulfona	sulfhidrilo, amina, hidroxilo
¹ NHS, aminosuccinimidilo			
² PFP, pentafluorofenilo			

Las longitudes de los brazos espaciadores pueden desempeñar una función importante en el acontecimiento de la reticulación y normalmente requiere determinación empírica. Normalmente, primero se usa un brazo espaciador

corto (4-8 A) y después se evalúa el acontecimiento de reticulación. Si la unión es mala, entonces pueden explorarse reticulantes con brazos espaciadores más largos. En algunos casos, es deseable un agente reticulante escindible; por ejemplo, si se quiere liberar un cultivo de condrocitos intacto con el sustrato AH. La TABLA II identifica una lista ampliada de reticulantes de doble agente aplicables. La TABLA III identifica una lista ampliada de reticulantes de agente sencillo aplicables.

5

TABLA II													
Reticulantes de agente doble													
Agente	Reactivo hacia (X)								Escindible por (O)				
	Aminas	Sulfhidros	Carbhidratos	Fotorreactivo	Carboxilos	Hidroxiolos	Tioles	Base	Peryodato	Hidroxil- amina	Yodable		
<i>p</i> -Azidobenzoi hidrazida (ABH)			X	X								N	
Ácido 3-[(2-aminoetil)ditio]proiónico • HCl (AEDP)	X				X		O					N	
<i>N</i> -[α -Maleimidoacetoxi]succinimida éster (AMAS)	X	X										N	
<i>N</i> -5-Azido-2-nitrobenzoiloisuccinimida (ANB-NOS)	X			X								N	
<i>N</i> -[4-(<i>p</i> -Azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridiltio) propionamida (APDP)		X		X			O				S		
<i>p</i> -Azidofenil glioxal monohidrato (APG)				X								N	
4-[<i>p</i> -Azidosalicilamido butilamina (ASBA)				X	X						S		
<i>Bis</i> -[β -(4-Azidosalicilamido)etil] disulfuro (BASED)				X			O				S		
1,4- <i>Bis</i> -maleimidobutano (BMB)		X										N	
<i>Bis</i> -Maleimidoetano (BMOE)		X										N	
Ácido <i>N</i> - β -maleimidopropiónico (BMPA)	X	X										N	

TABLA III												
Reticulantes de agente sencillo												
Agente	Reactivo hacia (X)						Escindible por (O)					Grupo funcional latente
	Aminas	Sulfhidrilos	Carbohidratos	Fotorreactivo	Carboxilo	Hidroxilo	Tiol	Base	Perydato	Hidroxil-amina	Yodable	
4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxihidrazida • 1/3 dioxano (M ₂ C ₃ H)	X	X	X								N	
Ácido 3-maleimidofenil borónico (MPBH)		X	X								N	
Metil N-succinimidil adipato (MSA)	X										N	CO-OH
Ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHS-ASA)	X		X							S		
3[2-Piridiliditio]propionil hidrazida (PDPH)		X	X				O				N	
N-[p-Maleimidofenil] isocianato (PMPI)		X				X					N	
N-succinimidil [4-azidofenil]-1,3-ditiopropionato (SADP)	X			X			O				N	
Sulfosuccinimidil 2-[7-azido-4-metilcumarin-3-acetamido]etil-1,3'-ditiopropionato (SAED)	X		X	X			O				N	

TABLA III												
Reticulantes de agente sencillo												
Agente	Reactivo hacia (X)						Escindible por (O)					
	Aminas	Sulfhidrios	Carbohidratos	Fotorreactivo	Carboxilo	Hidroxilo	Tiol	Base	Peryodato	Hidroxil-amina	Yodable	Grupo funcional latente
Sulfosuccinimidil 2-[<i>m</i> -azido- <i>o</i> -nitro-benzamido]etil-1,3'-ditiopropionato (SAND)	X			X			O				N	
<i>N</i> -succinimidil 6-[4'-azido-2'-nitro-fenilamino]hexanoato SANPAH	X			X							N	
Sulfosuccinimidil-2-[<i>p</i> -azido-salicilamido]etil-1,3'-ditiopropionato (SASD)	X			X			O			S		
<i>N</i> -Succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA)	X	X									N	-SH
<i>N</i> -Succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP)	X	X									N	-SH
Succinimidil 3-[bromoacetamido] propionato (SBAP)	X	X									N	
Sulfosuccinimidil-[perfluoroazido-benzamido]-etil-1,3'-ditiopropionato (SFAD)	X			X			O				N	

TABLA III

Reticulantes de agente sencillo

Agente	Reactivo hacia (X)						Escindible por (O)					
	Aminas	Sulfhidrilos	Carbohidratos	Fotorreactivo	Carboxilo	Hidroxilo	Tiol	Base	Peryodato	Hidroxil-amina	Yodable	Grupo cional latente
N-[ε-Maleimidocaproiloxi] sulfosuccinimida éster (Sulfo-EMCS)	X	X									N	
N-[γ-Maleimidobutiriloxi]sulfosuccinimida éster (Sulfo-GMBS)	X	X									N	
N-Hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato (Sulfo-HSAB)	X			X							N	
N-[κ-Maleimidoundecanoiloxi]-sulfosuccinimida éster (Sulfo-KMUS)	X	X									N	
Sulfosuccinimidil 6-[3'-(2-piridilditio)-propionamido]hexanoato Sulfo-LC-SPDP	X	X				O					N	
m-Maleimidobenzoil-N-hidroxisulfo-succinimida éster (Sulfo-MBS)	X	X									N	
Sulfosuccinimidil [4-azidosalicilamido]-hexanoato (Sulfo-NHS-LC-ASA)	X			X							S	
Sulfosuccinimidil [4-azidofenilditio] propionato (Sulfo-SADP)	X			X			O					
Sulfosuccinimidil 6-[4'-azido-2'-nitro-fenilamino] hexanoato (Sulfo SANPAH)	X			X							N	
Sulfosuccinimidil [4-yodoacetil]aminobenzoato (Sulfo-SIAB)	X	X									N	

TABLA III													
Reticulantes de agente sencillo													
Agente	Reactivo hacia (X)						Escindible por (O)						
	Aminas	Sulfhidrilo	Carbohidratos	Fotorreactivo	Carboxilo	Hidroxilo	Tiol	Base	Peryodato	Hidroxil-	amina	Yodable	Grupo funcional latente
Sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]-ciclohexano 1-carboxilato (Sulfo-SMCC)	X	X										N	
Sulfosuccinimidil 4-[p-maleimidofenil]-butirato (Sulfo-SMPB)	X	X										N	
Sulfosuccinimidil 6-[α-metil-α-(2-piridilditio)toluamido] hexanoato (Sulfo-LC-SMPT)	X	X					O					N	
Sulfosuccinimidil [2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]etil-1,3'-ditiopronato (Sulfo-SBED)	X			X			O					N	
N-succinimidil-[4-vinilsulfonil] benzoato (SVSB)	X	X										N	
N-[ε-trifluoroacetilcaproloxi] succinimida éster (TFCS)	X				X								NH ₂
Ácido β-[Tris (hidroximetil) fosfino]-propiónico (betaina) (THPP)	X											N	
Tris-[2-Maleimidoetil] amino (TMEA)		X										N	
Tris-Succinimidil aminotriacetato (TSAT)	X											N	

TABLA III		Reticulantes de agente sencillo										
Agente	Reactivo hacia (X)						Escindible por (O)				Grupo funcional latente	
	Aminas	Sulfhidrilos	Carbhidratos	Fotorreactivo	Carboxilo	Hidroxilo	Tiol	Base	Perydato	Hidroxil-amina	Yodable	Grupo funcional latente
N-Succinimidil yodoacetato (SIA)	X	X									N	
N-Succinimidil[4-yodoacetil] aminobenzoato (S AB)	X	X									N	
Succinimidil	X	X									N	
4-[N-maleimidometil]-ciclohexano-1-carboxilato] (SMCC)												
Succinimidil 4-[p-maleimidofenil] butirato (SMPB)	X	X									N	
Succinimidil-6-[(β-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH)	X	X									N	
4-Succinimidiloxi carbonil-metil-α[2-piridilitio] tolueno (SMPT)	X	X					O				N	
N-Succinimidil 3-[2-piridilitio]propionato (SPDP)	X	X					O				N	
Bis-[2-(Sulfosuccinimido oxicarboniloxi)-etil]sulfona (Sulfo-BSOCOES)	X							O			N	
Disulfosuccinimidil tartrato (Sulfo-DST)	X								O		N	
Bis [sulfosuccinimidil]succinato] de etilenglicol (Sulfo-EGS)	X									O	N	

5 El peryodato sódico puede usarse para crear grupos aldehído reactivos para la reticulación de glucosaminoglucanos con una variedad de estructuras que contienen aminas primarias disponibles a través de la formación de una base de Schiff estable. Los glucosaminoglucanos, tales como, sulfato de condroitina, dextrano e hialuronato sódico, se han modificado usando dichos procedimientos. Más recientemente, Liu et al, 2003, describen la preparación de polialdehídos de hialuronato, para formar un armazón tisular diseñado útil para la reparación ósea (Healos®) (Liu et al., 2003).

10 De esta manera, el polialdehído-hialuronato activado se prepara oxidando hialuronato sódico con peryodato sódico, seguido de diálisis exhaustiva. La densidad de los aldehídos reactivos (grupos formilo) en el polímero de hialuronato puede controlarse modificando el tiempo de reacción, y puede controlarse cuantitativamente usando una modificación del método del ácido bicinónico (Hermanson GT Bioconjugate Techniques, San Diego, Academic Press, Inc., 1996, pág. 622). Consecuentemente, un método alternativo para la reticulación del hialuronato sódico con superficies de poliestireno implica la formación de bases de Schiff entre la sulfonamida creada en la primera etapa con los aldehídos reactivos del AH oxidado con peryodato. El polialdehído-AH liofilizado es estable a 4 °C (almacenamiento en la oscuridad). A la superficie de poliestireno modificada se le añade una solución acuosa de polialdehído y se deja reaccionar a temperatura ambiente o a 37 °C, dependiendo del grado de reticulación deseado. Los materiales que no han reaccionado se retiran después por aspiración y las placas se lavan exhaustivamente en agua destilada y en medio de cultivo antes de sembrar con células.

20 En el aislamiento de las células de tejidos en los métodos de la invención, durante la digestión enzimática hay que procurar optimizar el rendimiento y la viabilidad celular total. Tradicionalmente, los condrocitos se han aislado de tejido cartilaginoso por digestión enzimática secuencial, usando una proteasa inespecífica seguido de una mezcla de colagenasa e hialuronidasa. Desgraciadamente, la mayoría de las preparaciones de enzimas proteolíticas usadas para propósitos de investigación contienen niveles significativos de endotoxina, así como una variedad de actividades proteolíticas indeseables que pueden dañar las proteínas de membrana celular, lo que conduce a la muerte celular apoptótica.

25 Se desarrollaron preparaciones de Blendzima Liberase™ en Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, Ind.) para abordar creciente demanda de proteasas con actividad y pureza enzimática caracterizada. Desde una perspectiva reguladora, estas enzimas son materiales preferidos para su uso en la fabricación de productos médicos tisulares diseñados. La Blendzima 2 contiene una combinación de actividad colagenasa y proteasa neutra que funciona bien para recoger condrocitos primarios de cartilago articular. Cuando los condrocitos se liberan de un sustrato de cultivo se prefieren niveles reducidos de la misma enzima.

30 Las blendzimas son combinaciones de colagenasas I y II y de una proteasa neutra purificadas. Las colagenasas se purifican de la fermentación de *Clostridium histolyticum*. Actualmente se dispone de cuatro formulaciones, la Blendzima 1 contiene la proteasa neutra dispasa, que se purifica de la fermentación de *Bacillus polymyxa*. Las Blendzimas 2, 3 y 4 contienen la proteasa neutra termolisina, purificada de la fermentación de *Bacillus thermoproteolyticus*. Los métodos para purificar y combinar estos componentes para la preparación de Blendzimas se han descrito en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.753.485 y 5.830.741. El uso de mezclas de Blendzima puede optimizarse usando los criterios presentados en la TABLA IV.

TABLA IV

Optimización del Uso de Blendzyme™

Observación 1	Observación 2	Posible causa	Recomendación
Viabilidad celular baja	Disociación muy rápida	Concentración enzimática demasiado alta	Reducir la concentración enzimática 50 %.
		Número de Blendzima demasiado alto	Disminuir un nivel de Blendzima, mantener la concentración inicial.
	Disociación muy baja	Concentración enzimática demasiada baja	Aumentar la concentración enzimática 50 %.
Función celular alterada	Viabilidad celular >80 %, el rendimiento celular es razonable	Número de Blendzima demasiado bajo	Disminuir un nivel de Blendzima, mantener la concentración inicial.
		Concentración enzimática demasiado alta	Reducir la concentración enzimática 25 %.
Rendimiento celular bajo	Viabilidad celular >80 %	Número de Blendzima demasiado alto	Disminuir un nivel de Blendzima, mantener la concentración inicial.
		Concentración enzimática demasiada baja	Aumentar la concentración enzimática 25 - 50 %.

Optimización del Uso de Blendzyme™

Observación 1	Observación 2	Posible causa	Recomendación
		Número de Blendzima demasiado bajo	Disminuir un nivel de Blendzima, mantener la concentración inicial.
	Viabilidad celular < 80 %	Concentración enzimática demasiado alta	Reducir la concentración enzimática 50 %.
		Número de Blendzima demasiado alto	Disminuir un nivel de Blendzima, mantener la concentración inicial.
		La fuerza mecánica (cizalla) es excesiva	Reducir la fuerza de cizalla en todos los aspectos de disociación. Tratar cuidadosamente el tejido.
Grupo de células liberado en forma fibrosa gelatinosa	El rendimiento y la viabilidad celular son aceptables	La liberación de ADN, posterior a la lisis celular, es la causa de la aglutinación.	Más frecuente en algunos tejidos. Si la viabilidad celular es aceptable, añadir DNasa a la mezcla de disociación.
	El rendimiento o la viabilidad celular se reduce	La fuerza mecánica (cizalla) es excesiva	Reducir la fuerza de cizalla en todos los aspectos de disociación. Tratar cuidadosamente el tejido.

5 Aunque se prefieren las Blendzimas, puede usarse cualquier método que libere de manera segura a las células, incluyendo aquellos que usan agentes quelantes, con y sin enzimas. El ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y el ácido etilen-bis (oxietilonenitrilo) tetraacético (EGTA) son dos de dichos reactivos comunes que pueden usarse en solitario, o en combinación.

10 En una realización ilustrativa de la invención, los condrocitos se aíslan de donantes inmaduros tales como neonatales, niños o preadolescentes, y se expanden sobre un material de superficie de sustrato, tal como poliestireno, que se modifica covalentemente mediante adhesión covalente de hialuronato sódico, o sobre un sustrato en otras condiciones de adhesión baja adecuadas como se describe en cualquier parte de este documento. Posteriormente las células expandidas se cultivan en un medio de producción tisular asérico químicamente definido para producir neocartílago para la restauración del cartílago. (Como se indica en cualquier parte del presente documento, un medio "químicamente definido", tanto para la expansión como la producción tisular, es un medio asérico cuyos componentes químicos están especificados.) Como alternativa, la población de células resultante expandida puede congelarse para trasplantes futuros, por ejemplo, por inyección, o puede congelarse en una etapa de criopreservación antes de una segunda fase de expansión. Una población de células que se ha sometido a dos fases de expansión también puede congelarse en una segunda etapa de criopreservación antes de sembrarse en condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento tisular y la producción de la matriz extracelular.

Células Madre Progenitoras Condrogénicas.

20 Otras células que son adecuadas para los métodos de la invención incluyen aquellas que se aíslan de la placenta (Kogler et al., 2004), células estromales mesenquimales de médula ósea (Mackay et al., 1998; Kavalkovick et al., 2002), células estromales adiposas (Huang et al., 2004), sinovio (DeBari et al., 2004) y periostio (DeBari et al., 2001).

25 El medio de producción tisular asérico también puede comprender vitamina C, ascorbato, factores de crecimiento autocrinos exógenos o medios de crecimiento acondicionados como se describe más adelante. Cuando se cultivan células de acuerdo con los métodos de la invención, se prefiere la presencia de vitamina C (ácido ascórbico). La vitamina C puede proporcionarse en cualquier forma activa, como un ácido libre o como una sal. Los ejemplos incluyen ascorbato cálcico, ascorbato magnésico, ascorbato sódico y ácido L-ascórbico 2-fosfato o un derivado esterificado de los mismos. La concentración a usar puede determinarse empíricamente, dependiendo de la fuente de las células, pero normalmente, las concentraciones varían de $5,6 \times 10^{-4}$ g/l a 0,1 g/l cuando se proporciona como ascorbato sódico. Del mismo modo, el medio de producción tisular asérico puede comprender dexametasona, o un derivado salino de la misma. La dexametasona potencia la expresión de SOX 9 y posiblemente aumentará la capacidad de producción de la matriz cartilaginosa de las células expandidas (Sekiya et al., 2001; Malpeli et al., 2004).

35 El cultivo celular puede crecer en condiciones de cultivo adecuadas, de tal manera que el crecimiento del cultivo celular sea a 37 °C en una atmósfera húmeda con la adición de CO₂, 2-10 % preferentemente 5 %.

Tiempo duplicación

Dependiendo de diversos factores, incluyendo la densidad de siembra en placa inicial, la calidad de los medios de expansión, los factores genéticos intrínsecos en las células, la temperatura, la calidad del HA y su aplicación al sustrato etc., el tiempo de duplicación para un grupo de células particular puede variar. El tiempo de duplicación observado para los condrocitos que se mantienen como se describe en la presente invención es generalmente de 3 a 4 días, cuando se siembran en placas una densidad de $3 \times 10^4/\text{cm}^2$. Cuando la duración del tiempo del cultivo de expansión aumenta hasta el día 14 y 17, como mucho pueden obtenerse 4-6 duplicaciones de la población de condrocitos. Por otro lado, las mismas células cultivadas en medios complementados con suero están limitadas mediante inhibición por contacto y producen no más de dos duplicaciones de población. Un medio de expansión definido preferido usado en la presente invención es HL-1, una formulación patentada que contiene un complejo de insulina-transferrina-selenio como su única fuente de proteína (HL-1™ de Lonzo Walkersville, Inc., (anteriormente Cambrex), Walkersville, Md.). El medio de expansión asérico que contiene citocinas se reemplaza completa o parcialmente cada tres a cuatro días después de la siembra inicial.

La selección óptima de los medios depende del tipo de célula: saber que medios usar para cultivar las células normalmente representa una opción preferida. Los ejemplos de medios de cultivo adecuados incluyen Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Eagle Esencial Mínimo (MEM), Medio Eagle Basal (BME), Medio de Click, Medio Leibovitz L-15, Medio McCoy 5A, Medio Esencial Mínimo Glasgow (GMEM), Medio NCTC 109, Medio E de Williams, RPMI-1640, Medio 199, F12 de Ham y SFM (Gibco).

Un medio específicamente desarrollo para un tipo/línea celular particular distinto de condrocitos puede no ser útil en la práctica de la presente invención, particularmente si contiene factor de crecimiento epidérmico que se dice que induce la desdiferenciación condrogénica (Yoon et al, 2002).

En algunos casos, puede añadirse una proteína para dar soporte a las células, tal como diversas albúminas, incluyendo albúmina de suero bovino. Si se desea, los medios puede complementarse adicionalmente con reactivos que limitan la acidosis de los cultivos, tales como adición de tampón al medio (tal como ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (BIS-Tris), ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-3-propanosulfónico (EPPS o HEPPS), glicilicina, ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propano sulfónico (MOPS), ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato sódico, ácido 3-(N-tris(hidroximetil)-metil-amino)-2-hidroxiopropanosulfónico) TAPSO, ácido (N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES), N-tris(hidroximetil)metil-glicina (Tricina), tris(hidroximetil)-amino-metano (Tris), etc.). Para controlar la acidosis también pueden usarse cambios frecuentes de medio y cambios en la concentración del CO₂ suministrado (a menudo de aproximadamente 5 %).

Las fuentes de diversos materiales usadas en los ejemplos de laboratorio específico son las siguientes:

Los materiales--Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con L-glutamina añadida, piruvato sódico y glucosa (1,0 g/litro [LG] o 4,5 g/litro [HG]), suero bovino fetal (FBS) y antibiótico (100 veces) (penicilina G, sodio (10.000 unidades) y sulfato de estreptomina (25 mg/ml en solución salina normal) se obtuvieron en Life Technologies, Inc. (Grand Island, N.Y.).

La pronasa-E (de Tipo XIV, de *Streptomyces griseus*), la hialuronidasa (de tipo VIII, testículos de bovino), el ácido N-tris [hidroximetil]metil-2-aminoetanosulfónico (TES) y los filtros de esterilización de jeringa MILLET-GS se obtuvieron en Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.).

La colagenasa (CLS 4) se adquirió en Worthington Biochemicals (Freehold, N.J.). Los discos de cultivo tisular (de 35 mm de diámetro, 100 mm de diámetro, grupo de 12 y 24 pocillos) y las unidades de filtro de esterilización de cuellos de frasco (de tipo CA) se obtuvieron en Coster Corporation (Cambridge, Mass.).

La albúmina de suero bovino (fracción V, sin ácidos grasos) era de Calbiochem (San Diego, Calif.). El Medio Asérico Completo HL-1™ se obtuvo en Cambrex (ahora Lonzo Walkersville, inc.).

En otra realización preferida, la expansión de condrocitos *ex vivo* es para la restauración de cartílago. En esta realización, el cartílago se extrae de una zona cartilaginosa no dañada alrededor de un sitio dañado y se digiere con colagenasa. Los condrocitos resultantes se expanden sobre el sustrato modificado de la invención, después se inyectan o se implantan en el sitio con defecto de cartílago. De manera similar, pueden aislarse fibroblastos estromales de médula ósea de una zona normal adyacente a un defecto óseo, expandirse *ex vivo* como se describe y administrarse en el sitio de un defecto óseo.

La expansión de condrocitos de la invención (Patente de Estados Unidos Nº 6.617.161) que contiene factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y proteínas morfogenéticas óseas da como resultado la pérdida de dos marcadores fenotípicos específicos de cartílago principales, el colágeno de tipo II y el proteoglicano agregano, que son componentes críticos para el ensamblaje y la restauración del cartílago. La expresión discontinua de estas moléculas indica que las células han experimentado desdiferenciación fenotípica. Recientemente Yoon et al., 2000 demostraron que el

EGF promueve la pérdida de fenotipo condrocitario natural.

Los condrocitos cultivados en poliestireno no modificado desarrollan un aspecto fibroblástico, que muestra una forma celular alargada con respecto a su morfología redondeada natural. La caracterización de marcadores fenotípicos en la población de condrocitos expandida es necesaria para establecer las posibles propiedades funcionales de las células manipuladas. La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA)/Centro de Evaluación e Investigación de Biología (CBER) requiere que los protocolos relacionados con la expansión *ex vivo* de condrocitos articulares para la restauración de superficies articulares demuestre que las poblaciones celulares expandidas son muy similares a las de los condrocitos naturales. Esto puede evaluarse midiendo los niveles de expresión de ARNm de la proteína núcleo agregcano y del colágeno de tipo II al final del protocolo de expansión o después de la producción de neocartilago mediante cualquier método apropiado, incluyendo métodos moleculares (por ejemplo, transferencia de Northern, RT-PCR) y métodos bioquímicos (por ejemplo inmunoprecipitación; cromatografía de afinidad) o métodos inmunocitoquímicos (por ejemplo, ELISA o separación celular activada por inmunofluorescencia (FACS)). Se prefieren los protocolos que detectan las proteínas diana.

De acuerdo con la presente invención puede usarse cualquier molécula bioactiva que mejore la proliferación, el potencial de diferenciación o la calidad del tejido resultante regenerado.

La expansión de células en condiciones de adhesión baja, tales como sobre un sustrato modificado con AH, también mejora la eficacia de la transfección de ácidos nucleicos en las células. Típicamente, la transferencia de ácido nucleico se realiza durante la expansión en monocapa, y las células en mitosis activa son más manejables para la transducción del ADN. Por lo tanto, de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, pueden utilizarse aplicaciones en las que se combinen técnicas de modificación tisular por ingeniería genética con terapia génica. Por ejemplo, las células pueden transfectarse con un vector que confiere resistencia a una variedad de compuestos biológicos y químicos, tales como antibióticos, citocinas y agentes inflamatorios, o con un vector que dé como resultado la sobreexpresión y síntesis de un factor de crecimiento particular o un componente de la matriz.

Implante

Las células disociadas aisladas de los procesos de expansión de la presente invención crecen típicamente sin soporte armazón para crear un tejido tridimensional para la restauración del cartilago (Patente de Estados Unidos N° 6.235.316). Sin embargo, las células expandidas mediante este método pueden implantarse en combinación con una matriz polimérica o hidrogel polimérico, biodegradable, adecuado, para formar nuevo tejido cartilaginoso. Existen dos formas de matrices que pueden usarse: un hidrogel polimérico formado de un material, tal como fibrina o alginato, que en su interior tiene células suspendidas, y una matriz fibrosa que tiene un espacio intersticial entre aproximadamente 40 y 200 micras. Las matrices poliméricas preferidas son aquellas que se degradan en aproximadamente de uno a dos meses después del implante; tal como copolímeros de ácido poliláctico-ácido glucólico (Patente de Estados Unidos N° 5.716.404). Las matrices pueden sembrarse antes del implante o implantarse, se dejan vascularizar, y después se siembran con células (véase, por ejemplo, Cima et al., 1991; Vacanti et al., 1988; y Vacanti et al., 1988).

Otros materiales, tales como moléculas bioactivas que potencian la vascularización del tejido implantado y/o inhiben la invasión tisular fibrótica, pueden implantarse con la matriz para potenciar el desarrollo de tejido más normal.

Ejemplo 1: Pérdida de Fenotipo Condrocitario por Expansión en Serie en Medio que Contiene Suero

Los condrocitos, independientemente de su origen tisular, pierden rápidamente la capacidad de sintetizar macromoléculas específicas de cartilago con expansión en serie *in vitro* (Homicz et al., 2002; Mandi et al., 2002). Aunque se piensa que los condrocitos juveniles conservan mejor la capacidad de sintetizar macromoléculas de la matriz en comparación con los condrocitos articulares adultos, se realizó el siguiente experimento para determinar el efecto de la expansión en serie sobre la síntesis de matriz de condrocitos usando condrocitos derivados de cartilago articular inmaduro. Se evaluó una variedad de medios que contenían suero para demostrar los efectos nocivos del suero sobre el potencial de diferenciación de los condrocitos.

Se aislaron dieciséis (16) poblaciones celulares donantes diferentes de cartilago articular cadavérico de edades comprendidas entre recién nacidos a tres años. Se usaron cuatro formulaciones diferentes de medio diferentes que contenían la cantidad indicada de suero bovino fetal: DMEM/LG 10 %, DMEM/LG a DMEM/LG 10 %, DMEM/HG 10 % y HL-1 a HL-1 5 %. Matrices T-75 que contenían 3×10^4 células/cm² se sembraron y se cultivaron durante veintiún días con cambio completo de medio de crecimiento dos veces a la semana. Los condrocitos se liberaron de los cultivos por disociación enzimática y se calculó el número celular total y la viabilidad con detección fluorescente usando un Sistema de Análisis Celular Personal de Guava (Guava Technologies, Inc, Hayward, Calif.). Las células disociadas (1×10^6 células viables) se sembraron posteriormente en placas de 48 pocillos usando medio asérico completo HL-1 (anteriormente disponible en Cambrex, ahora Medio de Hibridoma Asérico HL-1™ disponible en Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, Md) para producir neocartilago como describen Adkisson et al, 2001. Los cultivos se recogieron para analizar la composición bioquímica el día 45 del cultivo.

La FIG. 1 es una representación gráfica que muestra la pérdida de potencial de diferenciación de condrocitos en función de la expansión en serie en medio que contiene suero. Dos de los grupos se expandieron a través de dos

pases hasta un máximo de 2,8 duplicaciones de población (casi un aumento de ocho veces en el número celular total). Se observó una pérdida notable en cuanto a la capacidad de los condrocitos articulares juveniles para producir proteoglucano cartilaginoso. Se representó gráficamente una línea de regresión global a partir de los datos que demostró una reducción mayor de 70 % en la síntesis de la matriz de condrocitos después de casi tres duplicaciones de población, con respecto a condrocitos no expandidos derivados de los mismos individuos.

Similar a lo que se había indicado que ocurría en los condrocitos articulares adultos, estos datos ilustran que los condrocitos derivados de donantes de tejido joven pierden rápidamente la capacidad de ensamblar proteoglucanos de la matriz después de la expansión en serie en cultivo monocapa cuando se mantienen en diversos medios de crecimiento que contienen suero bovino fetal que varía de 5-10 % (v/v). Por tanto, parece que los factores derivados de suero, a diferencia de la edad del donante, determinan en gran parte el grado al cual los condrocitos se desdiferencian *in vitro* durante el cultivo en monocapa, dando como resultado una pérdida significativa del potencial de formación de la matriz de neocartílago.

Ejemplo 2: Método de Inmovilización Covalente de Hialuronato Sódico sobre Superficies de Poliestireno

Para mejorar la eficacia con la cual los condrocitos pueden expandirse *in vitro* sin perder el fenotipo condrocitario natural, se cultivaron condrocitos juveniles en un sustrato modificado preparado mediante la adhesión covalente de hialuronato sódico de alto peso molecular con poliestireno. Se creó la hipótesis de que el hialuronato sódico inmovilizado, a diferencia del plástico de cultivo tisular no modificado, proporcionaría un microentorno que podría parecerse más al del cartílago articular natural. El siguiente método de modificación química de poliestireno con hialuronato sódico es una modificación del que describen originalmente Turley y Roth (Turley y Roth, 1979).

En la FIG. 2, se trataron placas de poliestireno virgen con ácido sulfúrico a 37 °C durante dos horas. Después de eliminar el ácido sulfúrico y lavar exhaustivamente las placas en agua destilada desionizada, se creó la sulfonamida reactiva añadiendo hidróxido de amonio acuoso (24 horas a temperatura ambiente). La base se retiró, y las placas se lavaron de nuevo exhaustivamente con agua. Finalmente, una solución de hialuronato sódico de alto peso molecular (HyluMed, Medical Grade, Genzyme Advanced Biomaterials, Cambridge, Mass.; 5 mg/ml en agua) se reticuló con la sulfonamida reactiva usando hidrocloreuro de 3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (48 horas a 37 °C). Este proceso se representa en la FIG. 2. Antes de iniciar los cultivos de expansión, la solución de hialuronato/EDC se retiró por aspiración, y las placas de cultivo tisular se lavaron exhaustivamente en agua destilada desionizada, seguido de dos lavados en Medio Asérico Completo HL-1 (Cambrex).

Ejemplo 3: Fenotipo Condrocitario Conservado por Expansión en Serie sobre Plástico Recubierto con AH en Medio Asérico

Los condrocitos procedentes de un sujeto de seis semanas se llevaron a través de dos pases usando placas que se modificaron mediante el método ilustrado en el Ejemplo 2. El potencial de diferenciación de los condrocitos expandidos se evaluó después de disociación enzimática y estimación del número celular total y viabilidad. Se usó medio de diferenciación asérico patentado, desarrollado en Isto Technologies, Inc. para estimular la diferenciación de los condrocitos. A diferencia de otros métodos, tal como el descrito por Martin et al. (Patente de Estados Unidos N° 6.582.960), este medio no contiene ni TGF β ni dexametasona para potenciar el potencial de diferenciación condrogénica, y el único componente proteico en esta formulación es la insulina humana recombinante (Serologicals Corporation, Milford, Mass.).

La FIG. 3 muestra una representación esquemática del proceso de expansión de condrocitos mediada por citocinas en el que la adhesión covalente del hialuronato sódico sirve como un sustrato para el mantenimiento del fenotipo condrocitario durante la expansión. Se aislaron condrocitos primarios, lavaron y se resuspendieron a una densidad final de 3×10^4 células/cm² en Medio Asérico Completo HL-1 que contenía FGF-2 100 ng/ml y TGF- β 20 ng/ml y vitamina C. Se recogieron placas de control y tratadas con AH después de 14-17 días de expansión usando Blendzima 2, como se describe en el Ejemplo 7. Una alícuota de las células disociadas se sembró en placas en medio de diferenciación para evaluar el potencial de formación de neocartílago, mientras que las restantes células se sometieron a expansión en serie. El neocartílago se recogió de los cultivos de diferenciación entre el día 28 y 45 para medir el contenido total de proteoglucano, ADN y colágeno en la matriz neocartilaginosa. Estos valores se compararon con los obtenidos del neocartílago preparado a partir de condrocitos no expandidos usando los mismos métodos. El aumento acumulativo total en el número de condrocitos fue de 85 veces o de 6,5 de duplicaciones de población.

La FIG. 4 ilustra los datos de la composición bioquímica recogidos en injertos producidos a partir de las células en las que no se realizaron pases (P0) recién disociadas y células en las que se realizaron dos pases (P2). Se iniciaron injertos de neocartílago a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en placas de 48 pocillos no tratadas usando células recién disociadas y células de cada pase sucesivo hasta el P2. Las tasas de síntesis de glucosaminoglucano (S-GAG/ADN/Día) y del colágeno (hidroxiprolina/ADN/Día) se representan gráficamente en el eje de la izquierda y de la derecha, respectivamente. Los datos representan la media de cuatro (4) a cinco (5) repeticiones +/- DES TIP. Las duplicaciones de población estimadas para cada expansión fueron de 2,25 y 4,25 en células de pase P1 y P2, respectivamente, el día 14 y 17 del cultivo.

Los condrocitos donantes jóvenes que se expandieron sobre poliestireno modificado con AH en medio asérico definido que contenía FGF y TGF β mostraron pérdida mínima de potencial de diferenciación con respecto a los condrocitos recién aislados. Como se muestra en la FIG. 4. el contenido de proteoglucano del neocartílago de P1 y P2 es entre 78-88 % del de los cultivos primarios, lo que indica que se produce un pequeño cambio en la tasa de la síntesis de matriz extracelular como resultado de las condiciones de expansión. A diferencia de la expansión de los condrocitos en suero bovino fetal 10 % (véanse los datos del Ejemplo 1), estos niveles reflejan un aumento de tres a cuatro veces en la producción de matriz total sobre las células que se expandieron en una diversidad de medios que contenían suero. De hecho, se descubrió que los injertos de neocartílago producidos a partir de condrocitos de donantes jóvenes que se expandieron sobre plástico modificado con AH en un medio de crecimiento definido químicamente constituían discos tisulares rígidos que se manipulaban fácilmente *ex vivo* con fórceps.

En un experimento distinto, el crecimiento de condrocitos expandidos (ensayo de diferenciación) sobre plástico modificado con AH dio como resultado un aumento de 25 % en la producción de matriz total (tanto glucosaminoglucono sulfatado como colágeno), con respecto al crecimiento sobre plástico de cultivo tisular no modificado. Estos datos sugieren que la inmovilización de AH en la superficie de cultivo antes de la diferenciación de condrocitos dirige la formación de neocartílago, dando como resultado una mayor producción de matriz extracelular cartilaginosa y confirma el trabajo anterior de Kujawa et al, (1986). A diferencia de Kujawa et al., el presente trabajo ilustra que no hay una dependencia del tamaño del polímero de AH.

Con el último objetivo de establecer condiciones *in vitro* para la expansión de condrocitos que fuesen eficaces, reproducibles y que diesen como resultado un mantenimiento del fenotipo condrocitario normal, este ejemplo ilustra que una superficie de plástico modificada por adhesión covalente de hialuronato sódico limita la propagación de los condrocitos durante la expansión y conserva las propiedades funcionales de los condrocitos expandidos.

Ejemplo 4: Los Condrocitos Expandidos sobre Hialuronato Sódico Unido Covalentemente Conservan la Morfología Redondeada y la Función Natural

Este ejemplo demuestra que los condrocitos cultivados sobre un sustrato recubierto con AH en medio definido da como resultado el mantenimiento del fenotipo condrocitario natural conservando la forma celular redondeada y la función.

En este experimento piloto se usaron condrocitos humanos P1, procedentes de un niño de cinco años, que primero se habían expandido sobre plástico no modificado en presencia de citocina, para determinar si el AH inmovilizado podría restablecer tanto la morfología redondeada de los condrocitos como las propiedades funcionales de las células después de disociación enzimática. Como se describe se modificaron discos de poliestireno de treinta y cinco mm de diámetro por adhesión covalente de AH sódico. Se recogieron 2×10^5 condrocitos de una expansión de células primarias y posteriormente se sembraron en superficies de poliestireno modificadas y no modificadas con AH para expansión adicional en Medio Asérico Completo HL-1 (Cambrex) que contenía TGF β -2 2 ng/ml y FGF-2 humano variante 10 ng/ml (ProChon, Ltd., Rehovot, Israel) y vitamina C. Los cultivos se recogieron el día 10 para la enumeración y estimación de viabilidad usando reactivos ViaCount® de Guava. El día 10 del cultivo se obtuvieron más de 2,5 duplicaciones de población.

La FIG. 5A ilustra que los condrocitos expandidos en presencia de citocinas en poliestireno modificado con AH forman islas o agregados de condrocitos en los que los condrocitos parece que conservan un aspecto morfológico redondeado. La formación de estos agregados cartilaginosos evoca la condensación de tejido mesenquimático que normalmente se produce *in vivo* durante el desarrollo del esqueleto (Singley y Solursh, 1981). La opacidad relativa de los agregados de condrocitos sugiere que los condrocitos continúan sintetizando activamente componentes de la matriz extracelular. Por lo tanto, los condrocitos que se desarrollan sobre la superficie modificada con AH forman grupos de células que conservan una morfología redondeada, característica del fenotipo condrocitario.

Por otro lado, las mismas células expandidas en idénticas condiciones en placas no modificadas presentaron un aspecto adoquinado, aplanado (FIG. 5B). En estos cultivos, el potencial de expansión condrocitaria pareció estar limitado mediante la inhibición por contacto.

Los condrocitos de cada uno de estos grupos se sometieron posteriormente a pases por disociación en colagenasa e hialuronidasa y se sembraron (1×10^6 por pocillo) en discos de cultivo de 48 pocillos (no modificados) para medir la capacidad a la cual las células P2 sintetizan matriz neocartilaginosa. Usando condiciones químicamente definidas para optimizar la producción de la matriz (véase el ejemplo 3) en ausencia de armazones tridimensionales o cultivo granular, los condrocitos se desarrollaron durante 45 días, tiempo en el cual se recogieron para el análisis de la composición bioquímica. La FIG. 6 muestra una fotomicrografía de neocartílago obtenido el Día 10 de cultivo, ilustrando el aspecto morfológico redondeado de células P2 que se recogieron del cultivo de expansión en poliestireno modificado con AH. Los condrocitos expandidos por este método y puestos en cultivo de diferenciación presentaron un aspecto morfológico redondeado característico de condrocitos recién disociados. La FIG. 7 compara la composición bioquímica de matrices NC recién sintetizadas obtenidas de condrocitos que se expandieron en plástico modificado con AH de manera con la de las mismas células que se expandieron en poliestireno no modificado.

El sustrato que contenía AH unido covalentemente parece conservar la morfología condrocitaria natural (fenotipo redondeado) durante la formación de tejido neocartilaginoso, y lo que es más importante, restablece la síntesis de la matriz extracelular condrocitaria en células expandidas a un nivel que se acercó al de la población del cultivo primario (aproximadamente de 1,75 a 2 μg de S-GAG/ μg ADN/Día).

5 **Ejemplo 5: Caracterización del Fenotipo Condrocitario a Nivel Molecular**

El mantenimiento del fenotipo condrocitario natural en células que se habían expandido en poliestireno modificado con AH se confirmó a nivel molecular por análisis de expresión génica. Los condrocitos recogidos en cada pase en experimentos con cambio de escala se usaron para el aislamiento del ARN, y los niveles de ARNm relativos correspondientes a un conjunto de macromoléculas de la matriz extracelular específicas de cartílago y el factor de transcripción de cartílago, SOX 9, se analizaron usando reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa semicuantitativa (RT-PCR).

Las FIGS. 8A y 8B muestran perfiles de expresión génica representativos obtenidos para condrocitos P0 y P2 que se recogieron de las células usadas en el Ejemplo 4 anterior. Obsérvese que las células P2 han pasado por un total de 6,5 duplicaciones de población. No se observaron diferencias tangibles en el modelo de expresión génica obtenido de condrocitos recién disociados (panel superior) y de las mismas células después de 6,5 duplicaciones de población (panel inferior). Los niveles de ARNm para SOX 9 y B7-H1 permanecieron inalterados después de la expansión en serie. B7-H1 es el supuesto regulador negativo de alorreactividad que se piensa que mantiene el estado de privilegio inmunitario de los condrocitos *in vitro* e *in vivo* (Adkisson et al., observaciones no publicadas).

Aunque las células P2 hayan pasado por 6,5 duplicaciones de población acumulativas, un punto en el cual estudios previos han descrito cambios significativos en la expresión génica específica de cartílago (Dell'Accio et al., 2001), estas células mantuvieron un patrón de expresión génica que fue sustancialmente igual al de las células P0. Con pocos cambios en el nivel de expresión génica de SOX9 en los condrocitos P2, se esperaba que la expresión de los genes que controlan la síntesis de colágeno y de la proteína núcleo agrecano mostraría un pequeño cambio en el nivel de expresión. Esta hipótesis se confirmó por análisis de perfil de expresión génica del ARNm que codifica la proteína núcleo agrecano y el colágeno de tipos II, IX y XI, así como colágeno de tipo I, que está asociado con la formación de fibrocartílago. Hay que destacar que se observó una pérdida significativa en el nivel de expresión génica de la proteína núcleo agrecano y del colágeno de tipo II en la misma población de condrocitos que la que se expandió en serie en medio HL-1 que contenía FBS 10 % y vitamina C (FIG. 9A y FIG. 9B). Como se muestra en el Ejemplo 1, los condrocitos expandidos en medio que contenía suero también pierden su capacidad funcional para sintetizar y ensamblar matriz neocartilaginosa.

Este experimento mostró que la expansión condrocitaria sobre un sustrato modificado con hialuronato representa un microentorno preferido que da como resultado el mantenimiento del fenotipo natural como se demuestra por análisis morfológico de la forma celular de los condrocitos y el perfil de expresión génica. Por otro lado, los condrocitos que se expandieron en medio que contenía suero mostraron cambios marcados en los niveles de ARNm para la proteína núcleo agrecano y el colágeno de tipo II, dos macromoléculas esenciales para la formación y restauración del cartílago.

Ejemplo 6: Expansión de Condrocitos Usando Condiciones de Adhesión Baja Alternativas que Dan Soporte al Mantenimiento del Fenotipo Condrocitario Natural

Los ejemplos 4 y 5 anteriores demuestran la capacidad exclusiva de una superficie de poliestireno modificada para dar soporte a la expansión condrocitaria durante el crecimiento independiente de anclaje, es decir, en una condición de adhesión baja. Los condrocitos mantenidos en condiciones de adhesión baja experimentan crecimiento extensivo conservando al mismo tiempo su aspecto morfológico redondeado natural y la capacidad de sintetizar tejidos diseñados *ex vivo*. La confirmación de la conservación del fenotipo se demostró a nivel tanto bioquímico como molecular.

En este ejemplo, el propósito fue demostrar que podían usarse diferentes métodos para conseguir los mismos resultados de adhesión y dispersión condrocitaria limitante durante la expansión *ex vivo*, permitiendo de este modo a las células mantener el fenotipo y la expresión génica de cartílago hialino durante el proceso de expansión. Para la comparación se usaron tres condiciones diferentes. Grupo A, AH unido covalentemente; Grupo B, AH soluble añadido al medio de expansión a 1 mg/ml usando artículos de plástico tratados con cultivo tisular y Grupo C, placas de adhesión Ultra Baja fabricadas por Corning. Se sembraron en placas condrocitos articulares juveniles a una densidad de 3×10^4 células/cm² en matraces de cultivo tisular T-75 que contenían medio complementado con HL-1 como se define en los ejemplos anteriores. Los cultivos de expansión se mantuvieron hasta el día 21, realizándose la complementación o el cambio de medio reciente cada 3 a 4 días. La población expandida de células se disoció después para recoger usando Blendzima 2 Liberase™, momento en el cual se estableció el número de células viables para cada condición antes de la crioconservación. Se descubrió que los condrocitos obtenidos de cada una de estas tres condiciones estudiadas experimentaban entre 3 y 4 duplicaciones de población. Estas células de un pase se usaron posteriormente para generar discos neocartilaginosos en placas de 48 pocillos. Los discos neocartilaginosos resultantes se recogieron entre los días 40 y 45 del cultivo para análisis bioquímico. El aspecto morfológico de las células desarrolladas en cada una de las condiciones de adhesión baja se controló

microscópicamente y la composición bioquímica del neocartílago resultante se evaluó usando ensayos convencionales.

La Figura 10 muestra una comparación del aspecto morfológico de imágenes de condrocitos expandidos en cultivo a 100x antes de su recogida. Las flechas indican grupos suspendidos observados en cada condición de expansión. Se observó que casi todas las células cultivadas en cada condición conservaban un aspecto morfológico redondeado y no se adherían ni se propagaban sobre el sustrato. A) Se modificó material plástico de poliestireno por adhesión covalente de AH; B) se añadió AH soluble al medio de expansión - plástico de cultivo tisular regular no modificado; C) se usaron placas de adhesión ultra baja para el sustrato de expansión (adquirido en Corning). En cada caso, se observó una morfología redondeada similar y agrupamiento de células.

La FIG. 11 muestra una comparación de la tasa de síntesis de proteoglicano medida para muestras por triplicado de neocartílago producido usando células obtenidas por cada condición de expansión. Los datos se normalizaron con el contenido de ADN y el número de días en cultivo. Se observaron tasas equivalentes de producción de proteoglicano de matriz para cada una de las poblaciones de condrocitos expandidas, con medias que variaban entre 1,24 y 1,37 microgramos de S-GAG por microgramo de ADN por día de cultivo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de síntesis de proteoglicano entre las poblaciones de condrocitos posteriormente usados para producir neocartílago.

Estos datos ilustran que pueden usarse varios métodos para limitar suficientemente la adhesión y propagación de condrocitos durante la expansión *ex vivo*, de tal manera que en cada método, la población de células expandida mantiene el aspecto morfológico natural de los condrocitos durante la expansión *ex vivo*. La conservación de la forma celular durante la expansión es importante porque, como se ha observado en cualquier parte del presente documento, estos condrocitos conservan la capacidad de sintetizar una matriz extracelular extensiva después de la retirada de mitógeno.

Para demostrar adicionalmente la equivalencia de cada uno de los métodos usados anteriormente para generar condrocitos expandidos con capacidad funcional conservada, se usó PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar el nivel de expresión génica para un grupo selecto de genes normalmente expresados por condrocitos articulares. El colágeno de Tipo I, que se indicó que mostraba aumentos notables en la expresión génica por condrocitos desdiferenciados, también se midió para confirmar la naturaleza hialina del neocartílago producido por células que crecieron usando las condiciones identificadas anteriormente para los Grupos B y C, por ejemplo, AH soluble combinado con plástico de cultivo tisular regular y placas de adhesión ultra baja (ULA), respectivamente. El ARN se aisló del neocartílago que se había generado *ex vivo* de células que se habían experimentado > 6 duplicaciones de población en el Pase 2 (P2). La tabla V muestra el nivel relativo de expresión génica de condrocitos articulares recogidos de un donante de dos meses de edad. La expresión génica relativa para Col2A1, la proteína núcleo agrecano, SOX9 y Col1A1 se normaliza con respecto a la expresión del gen constitutivo, GAPDH (GAP).

Tabla V - Expresión Génica Relativa de Condrocitos y Fibroblastos

Fuente celular	Expresión Génica Relativa			
	Col2A1/GAP	Agrecano/GAP	SOX9/GAP	Col1a1/GAP
Condrocitos recién disociados	87,52	4,450	0,326	1,304
Neocartílago-AH soluble (P2)	131,8	7,635	0,232	0,205
Neocartílago-ULA (P2)	111,4	6,545	0,281	0,154
Células fibroblásticas	0,133	0,0012	0,0012	20,68

El análisis del perfil génico, medido por PCR cuantitativa en tiempo real, confirma la naturaleza hialina de una población de condrocitos que se había expandido *ex vivo* usando condiciones de adhesión baja que mantienen a los condrocitos en suspensión antes del crecimiento de neocartílago *ex vivo*. Las condiciones descritas usadas para mantener la adherencia baja o ultra baja de los condrocitos en el recipiente de cultivo generaron satisfactoriamente descendencia que conserva la capacidad de producir neocartílago tisular diseñado (Figura 12). Cada uno de los genes expresados característicamente por condrocitos articulares (Col21A y proteína núcleo agrecano) se expresó casi al mismo nivel al de la población celular de partida, y de hecho era algo mayor que el de la población celular de partida. Cabe destacar que el nivel de factor de transcripción específico de condrocitos (SOX9) medido para cada uno de los productos de neocartílago mostró pequeños cambios de condrocitos recién disociados recogidos del mismo donante. La expresión del gen Col1A1, típicamente un marcador de células fibroblásticas, medida para neocartílago generado a partir de cada una de las poblaciones de células P2 mostró pequeños cambios a partir de niveles medidos para condrocitos recién aislados. Además, la expresión del gen Col1A1 por condrocitos contenidos

en el neocartílago se midió que era de 12 % a 16 % de la medida para condrocitos recién aislados y es claramente diferenciable de la de los fibroblastos. Estos datos proporcionan pruebas que confirman la conclusión de que los condrocitos que se someten a expansión *ex vivo* en condiciones que mantienen la adherencia baja o ultra baja de las células en el recipiente de cultivo conservan su fenotipo natural, lo que se traducen en la conservación de la morfología condrocitaria y la expresión génica del cartílago hialino.

Ejemplo 7

Aislamiento de condrocitos

A menos que se indique de otro modo, los condrocitos se aislaron de las fuentes indicadas por digestión enzimática secuencial como se ha descrito previamente (Patente de Estados Unidos N° 6.235.316). En resumen, cartílago particular triturado se expuso a proteasas de *Streptomyces griseus* a 37 °C durante 20 minutos, seguido por digestión durante una noche (16-18 horas) en medio HL-1 (15 ml) que contenía 2000 unidades de colagenasa CLS4 (Worthington, Lakewood, N.J.) y 1200 unidades de hialuronidasa de Tipo VIII (Sigma), Gentamicina (50 µg/ml) y ácido ascórbico (50 µg/ml). Al día siguiente, la suspensión de condrocitos se tituló cuidadosamente y se sedimentó a 500 µg durante 8 minutos en una centrifugadora clínica.

La recogida de condrocitos del cultivo de expansión utilizó una concentración reducida de colagenasa/hialuronidasa (60/50 unidades/ml), respectivamente. La proteasa de *Streptomyces griseus* no fue necesaria para este procedimiento de aislamiento. La viabilidad y número total de células se estimó usando un Sistema de Análisis Celular Personal de Guava (Guava Technologies, Inc, Hayward, Calif.) y detección fluorescente antes de usar las células en cultivo de diferenciación o expansión posterior. Los experimentos presentados en el Ejemplo 6 utilizaron enzimas Liberase fabricadas por Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, Ind.). La concentración de Blendzima 2 usada para aislar condrocitos de cartílago de donantes jóvenes se estableció empíricamente a 6,38 unidades Wunsch por gramo de tejido (volumen de 5 ml). La actividad proteasa neutra de esta preparación es de 1,4 unidades de termolisina por gramo de tejido. Para la disociación de los cultivos en expansión, la concentración final de Blendzima 2 fue de 0,2 unidades Wunsch por ml. La digestión tisular requirió 8-10 horas para alcanzar la finalización, mientras que la digestión del cultivo de expansión finalizó al cabo de 3-4 horas.

Cultivo celular

Los cultivos de condrocitos se mantuvieron a 37 °C en un entorno húmedo complementado con CO₂ a 5 %. Los medios, como se indica en los ejemplos, incluían DMEM, formulaciones de alto contenido en glucosa (HG) y de bajo contenido en glucosa (LG), complementadas con L-glutamina 2 mM (Sigma) y Gentamicina 50 µg/ml, el Medio Asérico Completo HL-1 se adquirió en Cambrex Bio Science (ahora Lonzo Walkersville Inc., Walkersville, Md.). El medio HL-1 es un medio asérico completo químicamente definido que contiene menos de 30 µg de proteína/ml. Los componentes de HL-1 incluyen una base DMEM/F12 modificada, tampón HEPES, cantidades conocidas de insulina, transferrina, selenita sódica y niveles exclusivos de dihidrotestosterona, etanolamina, una diversidad de ácidos grasos saturados e insaturados y proteínas estabilizantes. No contiene albúmina de suero bovino u otras mezclas de proteínas indefinidas. El HL-1 se formuló para dar soporte al crecimiento asérico de diversos hibridomas y determinadas otras células diferenciadas de origen linfoide.

Los cultivos de expansión de condrocitos se establecieron en medio HL-1 que contenía gentamicina (50 µg/ml), ácido ascórbico (50 µg/ml) y la concentración indicada de TGF-β1 o TGF-β3 humano recombinante (10-20 ng/ml) y FGF-2 humano recombinante (100 ng/ml). Estas citocinas se adquirieron en R&D Systems (Minneapolis, Minn.). Se usó una forma variante de FGF-2, adquirida en ProChon, Ltd (Rehovot, Israel), como se describe en el Ejemplo 4.

La producción *in vitro* de neocartílago para análisis bioquímico y perfil de expresión génica se optimizó usando una formulación exclusiva desarrollada en Isto Technologies, Inc. (Media A). Este medio también se definió clínicamente, no contenía fuente de proteína adicional distinta de mezcla de 1 x insulina, transferrina, selenita disponible de Sigma (Cat N° I-3146) o solo insulina humana recombinante (Serologicals Corporation). Las células se sembraron en placas a 1 x 10⁶ por pocillo en placas de cultivo tisular de 48 pocillos fabricadas por Corning (tratadas o no tratadas con AH según se indique). El cambio de los medios se produjo dos veces a la semana, y el neocartílago recién sintetizado se recogió el día 45, a menos que se indique de otra manera. La tasa de síntesis de proteoglicano de condrocitos recién disociados procedente de cartílago de donantes jóvenes era típicamente S-GAG 2 µg/ADN µg día o mayor.

Expansión de Condrocitos en Medio que Contiene Suero

Condrocitos recién disociados se sembraron en el medio indicado que contenía ascorbato y Gentamicina a una densidad final de 0,5 a 3 x 10⁴/cm² usando matraces T-75 adquiridos en Corning. Los cultivos se mantuvieron durante 21 días, con cambio completo de medio dos veces a la semana. El día 21 del cultivo, los condrocitos se disociaron enzimáticamente (5-8 horas) usando la mezcla de colagenasa/hialuronidasa descrita anteriormente. El número total de células y la viabilidad se calculó usando solución de recuento celular fluorescente ViaCount® de Guava y un Sistema de Análisis Celular Personal de Guava. La solución Viacount® de Guava diferencia células viables y no viables basándose en la permeabilidad diferencial de una combinación de colorantes de unión al ADN en el reactivo.

Derivatización de Poliestireno de Cultivo Tisular

El ácido hialurónico glucosaminoglucano se unió covalentemente a discos de cultivo de poliestireno (placas de 6 pocillos y discos de 100 mm de diámetro, Corning) o a matraces T75 y T150, también adquiridos en Corning, usando el procedimiento definido en el Ejemplo 2. Resumiendo, cada disco se trató durante 2 h con ácido sulfúrico concentrado a 37 °C, se lavó exhaustivamente con agua desionizada destilada y después se trató con hidróxido de amonio acuoso (30 %, v/v) a temperatura ambiente durante 24 horas. La polisulfonamida reactiva (sobre la superficie de plástico) se reticuló con hialuronato sódico (5 mg/ml; Hylumed Medical, Genzyme; Cambridge, Mass.) usando una solución acuosa de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (25 mg/ml, Sigma). Las placas se pusieron en una atmósfera húmeda a 37 °C durante 48 horas. El AH no derivatizado se retiró por aspiración, y las placas se lavaron exhaustivamente con agua desionizada destilada, seguido de dos lavados con HL-1.

Evaluación de Análisis Bioquímico-Fenotipo Condrocitario

El potencial de diferenciación de los condrocitos expandidos se evaluó midiendo el contenido total de proteoglicano y colágeno de la matriz neocartilaginosa recién sintetizada. El contenido de los glucosaminoglucanos sulfatados, hidroxiprolina y ácido desoxirribonucleico se midió usando métodos electrofotométricos establecidos después de digestión con papaína como se ha descrito anteriormente, (Farndate y Murray, 1986; Stegemann y Stalder, 1967).

Evaluación de Análisis Morfológico-Fenotipo Condrocitario

Condrocitos recién aislados se expandieron primero en plástico de cultivo tisular no modificado (Ejemplo 4 solamente) en Medio Asérico Completo HL-1 que contenía las citocinas, el ascorbato y la gentamicina indicados. El día 3 se añadió el mismo volumen de medio totalmente complementado, con cambio de medio a 50 % cada 3 a 4 días hasta la recogida. Los condrocitos se disociaron usando la mezcla de colagenasa/hialuronidasa descrita anteriormente, y posteriormente se transfirieron a discos de poliestireno de 35 mm que se habían modificado por adhesión covalente de AH sódico como se ha descrito anteriormente en la Derivatización. Estas células se expandieron hasta el día 10 tiempo en el cual se disociaron y se caracterizó la viabilidad usando reactivos ViaCount® de Guava como se ha descrito anteriormente. La caracterización morfológica se realizó usando un microscopio óptico Nikon TMS provisto de una cámara Nikon CoolPix995.

Evaluación de Análisis de Expresión Génica-Fenotipo Condrocitario

Se recogieron condrocitos procedentes de neocartilago como se indica para la extracción de ARN total de sedimentos celulares alterados usando Solución Qbiogene RNApro (Qbiogene Inc, Carlsbad, Calif.), seguido por purificación en columna con el kit RNeasy Mini (Qiagen Inc, Valencia, Calif.). Se realizó RT-PCR semicuantitativa usando 0,5 µg de ARN en una mezcla de reacción de 25 µl con cebadores específicos de ARN y el kit de PCR para ARN EZ rTth (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Todos los experimentos se realizaron tres veces en donantes individuales.

Los conjuntos de cebadores usados para la PCR se seleccionaron usando el programa informático LaserGene PrimerSelect, (DNASStar Inc., Madison, Wis.). Todos los cebadores de la PCR se diseñaron de tal manera que los productos PCR amplificados por un cebador determinado eran específicos para el gen de interés. Se sintetizaron los siguientes pares de cebadores oligonucleotídicos para el colágeno humano 1A1, 2A1, 9A1, 11A1, proteína núcleo de agregano, N-cadherina, SOX-9, B7-H1 y GAPOH en Sigma Genosys (Woodlands, Tex.). En la tabla VI se enumeran los pares de cebadores.

TABLA VI

Pares de Cebadores Usados para el Análisis de Perfil de Expresión Génica

Gen	Número ID GenBank	Número de cebador	Secuencia del cebador
Núcleo de agregano	NM_001135	AGC1-2S	GAAACTTCAGACCATGACAACCTC
		AGC1-2AS	ACCAGCAGCACTACCTCCTTC [SEC ID N° 1]
B7-H1	NM_014143	B7-H1-1S	GCTCTTGGTGCTGGCTGGTC
		B7-H1-1AS	TCAGATATACTAGGTGTAGGGAA [SEC ID N° 2]
B7-1 (CD80)	NM_005191	B7-1-6S	GCCATCAACACAACAGTTTCCCAA
		B7-1-6AS	CAGGGCGTACACTTTCCCTTCTCAA [SEC ID N° 3]
B7-2 (CD86)	NM_006889	B7-2-6S	CTCTCTGGTGCTGCTCCTCTGAA
		B7-2-6AS	CTGTGGGCTTTTTGTGATGGATGATAC [SEC ID N°4]
Col1A1	NM_000088	Col1A1-3S	CGAGGGCCAAGACGAAGACA

<u>Gen</u>	<u>Número ID GenBank</u>	<u>Número de cebador</u>	<u>Secuencia del cebador</u>
		Col1A1-3AS	CTTGGTCCGGTGGGTGACTCTGA [SEC ID N° 5]
Col2A1	NM_033150	Col2A1-8S	CACCCTGAGTGGAAGAGTGGAGCTAC
		Col2A1-8AS	CAGTGTGGGAGCCAGATTGTCA [SEC ID N° 6]
Col9A1	X54412	Col9A1-5S	AAGCACAACCTCAGTGCCCCAACAAAAC
		Col9A1-6AS	ATCCCATCACGGCCATCACA [SEC ID N° 7]
Col11A1	J04177	Col11A1-2S	AAGCACAACCTCAGTGCCCCAACAAAAC
		Col11A1-2AS	CTACCCGATGCCACTTCCCGTCAG [SEC ID N° 8]
GAPDH	NM_002046	GAPDH-1S	GCAAATTCATGGCACCGTCA
		GAPDH-1AS	CAGGGGTGCTAAGCAGTTGG [SEC ID N° 9]
N-cadherina	BC036470	NCAD-1S	GGAAAAGTGGCAAGTGGCAGTAAAAT [SEC ID N° 10]
		NCAD-1AS	CCGAGATGGGGTTGATAATGAAGATA [SEC ID N° 11]
SOX-9	Z46629	SOX9-1S	GTCAACGGCTCCAGCAAGAACAA [SEC ID N° 12]
		SOX9-1AS	GCTCCGCCTCCTCCACCAA [SEC ID N° 13]

Se realizó RT-PCR semicuantitativa usando 0,5 µg de ARN total con Polimerasa de *Thermus thermophilus* 1 µl (2,5 U/µl), 0,75 µl de cada dNTP 10 mM, 5 µl de Tampón 5 x EZ RT-PCR, 2,5 µl de Mn(OAc)₂ 25 mM y 2 µl de reservas 5 µM (conc. final 0,4, µM) de cebadores cadena arriba y cadena abajo en un volumen total de 25 µl. La concentración final de Mn(OAc)₂ en el tampón fue de 2,5 mM. Las soluciones se desnaturalizaron a 94° C durante 1 minuto antes de la amplificación RT-PCR usando un termociclador programable (1-cycler, Bio-Rad Labs Inc., Hercules, Calif.) en las siguientes condiciones: Desnaturalización, 94° C durante 1 minuto, reacción con transcriptasa inversa a 58° C durante 30 minutos, seguido de desnaturalización a 94° C, durante 1 minuto, después ciclado de PCR con desnaturalización a 94° C durante 45 segundos e hibridación y extensión a 58° C durante 1 minuto, 10 segundos durante un total de 42 ciclos. Se realizó una extensión final a 58° C durante 8 minutos y los productos de reacción se conservaron a -80° C. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa a 2,5 % que contenían bromuro de etidio. Los geles se procesaron a 80 V durante aproximadamente 90 minutos y se fotografiaron con luz UV. Cada experimento se realizó un mínimo de tres veces para confirmar la reproducibilidad.

15 Estadísticas

Para crear datos gráficos se usó el programa informático Prism (versión 3.0), fabricado por Graph Pad Software (San Diego, Calif.). Los datos se presentan como la media +/- DT con tres (3) a cinco (5) repeticiones. Se determinó el significado entre grupos usando el paquete estadístico dentro de la serie Prism.

20 Ejemplo 8: Los Condrocitos Adultos Expandidos en Sustratos Modificados con Hialuronato Muestran Potencial de Formación de Matriz Potenciado

Este ejemplo demuestra que los condrocitos adultos expandidos en un sustrato modificado con AH en medio asérico químicamente definido aumentan significativamente más de cuatro veces la formación de matriz de las células expandidas.

25 Condrocitos procedentes de cartílago articular de un varón de 47 años se expandieron en Medio Asérico Completo HL-1 que contenía FGF-2 100 ng/ml y TGF-β1 20 ng/ml, gentamicina 50 µg/ml y ácido ascórbico 50 µg/ml. Se sembraron dos millones de células en placas de 100 mm de diámetro que se habían modificado por adhesión covalente de hialuronato sódico. Los cultivos de expansión se mantuvieron durante un total de 17 días como se ha descrito anteriormente (en cada pase). Posteriormente los condrocitos se liberaron de la superficie de cultivo usando una combinación de colagenasa/hialuronidasa, se lavaron en medio HL-1 y usando reactivos Viacount® de Guava se midió el número total de células y la viabilidad.

35 Una parte de las células del primer pase se colocó en cultivo de diferenciación (producción de tejido) como se ha descrito anteriormente para medir el potencial de formación de matriz para la comparación con neocartílago producido a partir de células primarias (FIG. 11). Dos placas adicionales de un diámetro de 100 mm se configuraron (2 millones de células por placa) para la expansión en serie hasta dos pases, y el potencial de la formación de matriz de estas células expandidas se ensayó usando el mismo el método. En estas condiciones, las células de pase uno y dos demostraron duplicaciones de población de 3 y 2,7, respectivamente, dando como resultado un aumento acumulativo de casi 64 veces el día 34 del cultivo. La composición bioquímica de la matriz neocartilaginosa recién sintetizada producida (el día 45) tanto de células expandidas como de células recién aisladas se muestra en la FIG.

13. Se aislaron condrocitos de un varón de 47 años que presentaba osteoartritis de Grado 1. El medio de diferenciación (producción de tejido) que contenía Vitamina C (Medio A) contenía adicionalmente dexametasona (10^{-6} M; Sigma) o una combinación de dexametasona y FGF-2 (10 ng/ml) como se indica para inducir posteriormente la síntesis de proteoglicano con respecto a las células primarias mantenidas en Medio A que contenía solo Vitamina C. El ensayo estándar comparó la formación de matriz en Medio A que contenía vitamina C, con los dos grupos de células adicionales (solo cultivo primario) que se desarrolló en Medio A posteriormente complementado con dexametasona 21-fosfato (10^{-6} M; Sigma) o la combinación de dexametasona y FGF-2 (10 ng/ml). (Dexa, dexametasona 21-fosfato; bFGF, factor de crecimiento básico fibroblástico humano recombinante 2; el * indica significado ($P < 0,05$)).

10 Cada población de células expandida produjo neocartílago que contenía niveles mayores de cuatro veces de glucosaminoglucanos sulfatados en comparación con las células recién aisladas procedentes del mismo donante (FIG. 13). El nivel de síntesis de proteoglicano en las células expandidas fue indistinguible del de las células primarias que se habían mantenido en Medio A que solo contenía dexametasona o la combinación de FGF básico y dexametasona. Estos datos muestran que la expansión de condrocitos adultos sobre sustratos modificados con AH mantiene el potencial de diferenciación completa de condrocitos adultos.

Realizaciones alternativas del método incluyen determinadas modificaciones en los procesos de cultivo tisular durante la expansión y producción de la matriz extracelular, que se ha descubierto que facilitan la conservación de fenotipo por la población expandida de condrocitos. Todas las realizaciones alternativas descritas en el presente documento comparten al menos una fase de expansión inicial seguida de un periodo de producción de matriz extracelular y recogida del producto tisular final. Están implicados uno o más periodos de expansión, y también pueden incorporarse etapas de crioconservación. Por ejemplo, una primera fase de expansión se realiza opcionalmente después de un periodo de crioconservación después del cual la población de células que se han sometido a la primera expansión se descongela y regresa a condiciones de expansión para una segunda fase de expansión. Una población de células expandida que se ha sometido a dos fases de expansión opcionalmente experimenta un segundo periodo de crioconservación, o se siembra sobre un sustrato de cultivo tisular en condiciones apropiadas para el crecimiento tisular y la producción de la matriz extracelular para producir neocartílago. En otra realización, la población de células expandida está lista para el trasplante en un sujeto para la restauración tisular. En una realización ilustrativa, la población de células expandida se conserva en crioconservación durante un periodo de tiempo y después se recupera para el trasplante. La población expandida es muy adecuada para el trasplante por inyección, por ejemplo inyectando directamente la población de células expandida en una articulación de un sujeto que necesite restaurar el cartílago. En otras palabras, la población de células expandida es adecuada para el trasplante en un sujeto sin necesidad de un periodo posterior de cultivo celular para la producción de ECM.

Al igual que con el método descrito en cualquier parte de este documento, los condrocitos se seleccionan de tejido cartilaginoso que se aísla de personas jóvenes o adultas, tal como, sin limitación cartílago articular. Otras fuentes adecuadas de células condroprogenitoras incluyen, sin limitación, células madre mesenquimales, células cartilaginosas, células madre de cordón umbilical, células estromales de médula ósea, células estromales adiposas o células progenitoras condrogénicas procedentes de periostio o sinovio, y también condrocitos transgénicos resistentes a rechazo de xenoinjerto mediado por el sistema inmunitario.

Como se describe en el presente documento, una fase de expansión de condrocitos inicial que dura al menos aproximadamente de catorce (14) a veintiún (21) días se realiza en condiciones de adhesión baja que limitan o impiden la adhesión de condrocitos al sustrato de cultivo tisular. Esto se realiza, por ejemplo usando un sustrato modificado con AH como se describe en cualquier parte del presente documento, usando un sustrato no modificado en presencia de un medio de expansión que contiene AH en solución, o usando otros sustratos a los que se ha aplicado un recubrimiento de un material de adhesión baja disponible en el comercio. En otra realización, el método contempla el uso de un sustrato no modificado en presencia de un medio de expansión que contiene otro aditivo de adhesión baja distinto del AH en solución, tal como la fosfatidilcolina lecitina de semilla de soja. Con respecto a los sustratos, un sustrato de adhesión baja es cualquier sustrato que comprenda un material adecuado, o al cual se le ha aplicado un recubrimiento superficial, de tal manera que una mayoría de las células aisladas sembradas sobre el sustrato no se adhieren al mismo. Dichos sustratos de adhesión baja, al igual que otras condiciones de adhesión baja descritas en el presente documento, se ha demostrado que producen formación de colonias (grupos) por condrocitos que experimentan expansión, así como a conservación de fenotipo. Para sustratos recubiertos, los recubrimientos adecuados de adhesión baja incluyen cualquier material de recubrimiento tales como los descritos en el presente documento y en cualquier parte del mismo, que limitan la adhesión de los condrocitos durante la expansión de la población inicial de condrocitos, y por lo tanto limita o impide la desdiferenciación y así produce la conservación del fenotipo de los condrocitos. Las condiciones de adhesión celular baja incluyen condiciones establecidas usando productos disponibles en el comercio y materiales algunas veces denominados en la bibliografía y en cualquier parte como "adhesión celular ultra baja" y "ULA", tal como, por ejemplo, productos que tienen la superficie de "Adhesión Ultra-Baja" de Corning, Inc. (Acton, Massachusetts, USA), productos comparables también con recubrimientos de superficie de Nalge Nunc International (Rochester, NY) y productos disponibles de CellSeed (Japón).

Además, se usa un medio de expansión asérico (SFM, Gibco) para el baño de las células. El TGF- β , FGF, L-glutamina y Vitamina C se añaden al SFM a concentraciones en solución de 10 ng/ml, 100 ng/ml, 4 mM y 50 μ g/ml respectivamente. El SFM complementado se repone o complementa adicionalmente con TGF- β , FGF, L-glutamina y Vitamina C a intervalos regulares de tres a cuatro días para conservar las concentraciones finales en solución de cada uno de ellos como se ha indicado anteriormente.

A aproximadamente el día 21 del cultivo, las células expandidas se recogen por disociación enzimática usando una colagenasa purificada, por ejemplo, Blendzima 2 Liberase™ disponible en Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science (Indianapolis, IN, EEUU), y se ponen en criopreservación. Con esta estrategia de expansión, al igual que con los métodos descritos en cualquier parte del presente documento, la conservación del fenotipo se demuestra por observación de una morfología redondeada, no propagada, y una expresión baja de colágeno de Tipo I determinada midiendo los niveles de ARNm. Específicamente, después de al menos 3,8 duplicaciones de la población de condrocitos, al menos 50 % de los condrocitos conserva la morfología redondeada y expresión génica de cartílago hialino. Con los métodos actualmente disponibles la expansión puede mantenerse como mucho a través de 8 a 10 duplicaciones antes de que una parte sustancial de las células demuestre pérdida de fenotipo. Sin embargo, se reconocerá que con el descubrimiento y desarrollo en curso de otros factores de crecimiento y disponibilidad de materiales y métodos mejorados, las células pueden expandirse a través de más de 8 a 10 duplicaciones mientras que al menos 50 % de las células conserva el fenotipo determinado por la morfología celular y la expresión génica del cartílago hialino como se describe en cualquier parte del presente documento.

Para la criopreservación, la población de condrocitos expandida recogida se suspende en un crioprotector adecuado disponible en el comercio tal como Cryostor™ para producir una suspensión celular que tiene una densidad de no más de aproximadamente 17×10^8 células por mililitro de suspensión. Después de un tiempo de incubación adecuado, alícuotas de un mililitro de la suspensión celular se suministran a los crioviales de tal manera que cada criovial contiene como mucho $1,7 \times 10^8$. Los crioviales se congelan y se colocan en un criopreservador a -150 °C para su recuperación posterior, se descongelan y se trasplantan por inyección, o producción de matriz extracelular o durante una segunda ronda de expansión repitiendo las mismas etapas de expansión usando condiciones de adhesión baja y SFM complementado como ha indicado anteriormente con TGF- β , FGF, L-glutamina y Vitamina C a concentraciones como se ha expuesto anteriormente. Por ejemplo, una realización ejemplar del método incluye una expansión celular primaria seguida de un primer periodo de criopreservación, después se inicia una expansión celular secundaria y finalmente un segundo periodo de criopreservación antes del proceso de producción de matriz extracelular. Sin embargo, se reconoce que durante la fabricación a escala comercial, la etapa de conservación intermedia (criopreservación) en el pase 1 se elimina opcionalmente.

En una realización ilustrativa, la expansión inicial y las fases de criopreservación, tanto de una ronda como de dos cada una de ellas, se realizan después de la producción de la matriz extracelular en un dispositivo transpocillo como se describe en el presente documento. El dispositivo transpocillo se desarrolló para resolver el problema presentado por las barreras de difusión creadas cuando se usa un sustrato de cultivo tisular típico. En particular, la propia matriz extracelular crea una barrera de difusión a medida que el tejido crece a partir de una población inicial de condrocitos y la matriz extracelular se deposita alrededor de las células. La matriz extracelular es una barrera de difusión para moléculas que se mueven hacia el interior y hacia el exterior de las células que son críticas para la supervivencia y el crecimiento de las células. Además, el sustrato de cultivo tisular impermeable típicamente usado magnifica el problema de difusión creando una barrera para la difusión sobre aproximadamente la mitad del área de la superficie celular, es decir, las superficies celulares que están en contacto con el sustrato. En el presente documento se describe una nueva estrategia para cultivar condrocitos que minimiza el problema de la barrera de difusión. Los inventores han logrado cultivar condrocitos en una solución de baño de medio de producción de tejido adecuado sobre una membrana de policarbonato permeable, no recubierta, que tiene múltiples poros a través de la misma. Para la producción de la matriz, se ha descubierto que cualquier sustrato de policarbonato habitualmente disponible en el comercio sin ninguna modificación en la superficie se comporta extraordinariamente bien como un sustrato condroconductor.

En una realización, el sustrato de policarbonato es una membrana que tiene un grosor de 10 micras. Los poros del sustrato de cultivo tisular de policarbonato se caracteriza por un diámetro interno de al menos aproximadamente 1 micra a aproximadamente 12 micras. En una realización ejemplar, la población de poros se caracteriza por diámetros internos que tienen una distribución normal centrada en aproximadamente 3 micras, con apenas ningún poro o sin poros que tengan diámetros internos menores de 1 micra. La densidad de los poros a través de la superficie de sustrato es de aproximadamente 2×10^6 / cm². Inesperadamente, y a diferencia de las enseñanzas en cualquier parte (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.326.357), se ha observado que el uso de un sustrato con poros de un diámetro interno menor de aproximadamente 1 micra es insuficiente para superar el problema de la barrera de difusión presentado por un sustrato de otro modo impermeable y puede dar como resultado la muerte celular. La diferencia en cuanto a los resultados entre los investigadores puede relacionarse con diferencias de procedimiento en el tipo (el material y la densidad de poro o área de poro total) y tratamiento de los sustratos porosos usados. Como alternativa, y sin querer ligarse a una teoría particular, puede requerirse un tamaño de poro mayor de 1 micra para satisfacer los requisitos de difusión de los condrocitos juveniles. Se ha observado que los condrocitos juveniles producen matriz extracelular a una tasa significativamente mayor que la de los condrocitos adultos. En cualquier caso, los inventores han conseguido demostrar que una población de condrocitos expandida de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento y después mantenida en un medio de producción

5 tisular en un sustrato de policarbonato perforado con poros que tienen un diámetro interno de al menos aproximadamente 1 micra, a densidades de poro actualmente disponibles en el comercio, conserva el fenotipo y demuestra organización celular al azar con examen microscópico, como se describe en detalle adicional, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.235.316. La organización celular al azar va en contra de otros métodos que producen tejido estratificado que tiene distintas regiones superficiales, centrales y profundas determinadas con examen microscópico (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.326.357).

10 En una realización ejemplar, el sustrato de policarbonato permeable se usa en una configuración transpocillo para la producción de matriz extracelular. Un sustrato se coloca dentro de un pocillo de una placa multipocillo, por ejemplo, una placa de seis pocillos, y las células de la población de condrocitos expandida se siembran sobre el sustrato dentro del pocillo. Las células se siembran, por ejemplo, a una densidad de aproximadamente 1×10^8 células / cm^2 . La producción de la matriz extracelular se realiza durante un periodo de cultivo asérico predeterminado de al menos aproximadamente 45 días, típicamente con una duración de 60 - 65 días, después de los cuales el tejido cultivado ya está listo para recoger, envasar y finalmente implantar. Durante los siete primeros días del periodo de producción de matriz extracelular, las células se mantienen en las placas transpocillo en condiciones apropiadas para minimizar la exposición a contaminantes. Un medio de producción tisular químicamente definido adecuado se suministra a los pocillos y se repone regularmente por suministro manual o usando un método equivalente automatizado. Durante este periodo inicial de siete días, el medio de producción tisular incluye opcionalmente una cantidad de TGF- β en solución, preferentemente una concentración de aproximadamente 10 ng/ml de solución.

20 Después de los siete días iniciales de producción de matriz extracelular, las células en cultivo sobre el sustrato de policarbonato permeable, y en proceso de producir matriz extracelular, se transfieren en su conjunto con el sustrato a un pocillo de cultivo de poliestireno o similar de una forma predeterminada y de dimensiones seleccionadas. Cada uno de los pocillos de cultivo múltiples que contienen las células sembradas sobre el sustrato de policarbonato permeable, se conserva después en un medio de producción tisular asérico sin TGF- β añadido, a una temperatura (37 °C) y atmósfera (CO₂ 10 % en aire) controladas durante el resto del periodo de cultivo predeterminado de al menos 45 días.

30 La forma y el tamaño resultante de los implantes tisulares cartilaginosos (neocartilago) después del periodo de producción de la matriz extracelular se determina por la forma y tamaño del pocillo de cultivo puesto que las paredes laterales del pocillo limitan el crecimiento del tejido formando una barrera a la migración celular. El pocillo de cultivo puede fabricarse de un material adecuado tal como poliestireno, o puede fabricarse de otros materiales que formen una barrera de migración a las células al mismo tiempo que permitan que determinados nutrientes, tales como gases y complementos celulares en solución, pasen a través de la barrera. El material que forma las paredes laterales del pocillo puede seleccionarse por su capacidad para permitir que determinados nutrientes celulares pasen a través impidiendo al mismo tiempo que otras moléculas inútiles o quizás nocivas pasen a través del mismo. Además, el pocillo de cultivo puede configurarse en una variedad de tamaños y formas diferentes, según se determine por las características geométricas deseadas del producto tisular cultivado y las necesidades del implante.

40 En referencia a la Figura 10, cada uno de los tres paneles de las FIGS. 10A, 10B y 10C son, respectivamente, una fotomicrografía de células expandidas en una de las tres condiciones de adhesión baja: usando un sustrato de poliestireno modificado con AH (FIG. 10A), usando un sustrato de poliestireno no modificado en combinación con AH en solución en el medio de expansión (FIG. 10B), y usando un sustrato de Adhesión Ultra-Baja disponible en el comercio (FIG. 10C). Se observó un aspecto redondeado de los condrocitos y formación en grupos (flechas) en cada una de las tres condiciones de expansión de adhesión baja usadas, cada una de las cuales controló la adhesión celular y la expansión durante la propagación.

45 La FIG. 12 es una fotomicrografía que ilustra el aspecto histológico de neocartilago producido a partir de condrocitos que se expandieron a través de tres (3) a cuatro (4) duplicaciones de población en una condición de adhesión baja. La población expandida se transfirió después a una membrana de policarbonato perforada caracterizada por poros que tenían un diámetro interno de 3 micras. La fotomicrografía muestra que los condrocitos habían producido una matriz extracelular extensiva y adicionalmente que las células se organizaban al azar dentro de la matriz recién sintetizada.

REFERENCIAS CITADAS

50 **Documentos de Patente de Estados Unidos**

6235316B1	22 de mayo, 2001	Adkisson	424/548
6582960	24 de junio, 2003	Martin et al.	435/377
6617161	9 de septiembre, 2003	Luyten et al.	435/375
6645764B1	11 de noviembre, 2003	Adkisson	435/375
5830741	3 de noviembre, 1998	Dwulet et al.	435/220
5716404	10 de febrero, 1998	Vacanti et al.	623/8

5753485	19 de mayo, 1998	Dwulet et al.	435/220
4356261	26 de octubre, 1982	Kuettner	435/68
2003/0215426A1	20 de noviembre, 2003	French et al.	424/93,7

Otras referencias

- Adkisson et al., "In vitro generation of scaffold independent neocartilage". *Clin. Orthop.*, vol. 391S, págs. S280-S294 (2001).
- 5 Benya y Shaffer, "Dedifferentiated Chondrocytes Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype when Cultured in Agarose Gels", *Cell*, vol. 30, págs. 215-224 (1982).
- Dell'Accio et al., "Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo", *Arthritis & Rheumatism*, vol. 44, págs. 1608-1619 (2001).
- 10 Famdale y Murray, "Improved quantization and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue" *Biochem. Biophys. Acta.*, vol. 883, págs. 173-177 (1986).
- Hauselmann et al., "Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads", *J. Cell Science*. vol. 107, págs. 17-27 (1994).
- Hauselmann et al., "Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage", *Am. J. Physiol.*, vol. 271, págs. C742-C752 (1996).
- 15 Homicz et al., "Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue engineered neocartilage production". *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 127, págs. 398-408 (2002).
- Huang et al., "Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue", *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 113, págs. 585-594 (2004).
- 20 Hunziker, "Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects", *OsteoArthritis and Cartilage*, vol. 10, págs. 432-463 (2002).
- Jakob et al., "Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro", *J. Cell. Biol.*, vol. 81, págs. 368-377 (2001).
- Kavalkovick et al, "Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system", *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, vol. 38, págs. 457-466 (2002).
- 25 Kogler et al., "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential". *J Exp. Med.*, vol. 200, págs. 123-135 (2004).
- Kujawa et al, "Hyaluronic acid bonded to cell-culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cell cultures". *Dev. Bio.*, vol. 114, págs. 504-18 (1986).
- 30 Kujawa et al., "Substrate-bonded hyaluronic acid exhibits a size-dependent stimulation of chondrogenic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture", *Dev. Bio.*, vol. 114, págs. 519-28 (1986).
- Kujawa et al., "Hyaluronic acid bonded to cell culture surfaces inhibits the program of myogenesis", *Dev. Bio.*, vol. 113, págs. 10-16 (1986).
- Laurent, "Structure of hyaluronic acid. En: the chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, (Balazs ed.), vol. 2, págs. 703-732, Academic Press, Nueva York (1970).
- 35 Laurent y Fraser, "Hyaluronan", *FASEB J.*, vol. 6, págs. 2397-2404 (1992).
- Liu et al., "An osteoconductive, collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration", *Biomaterials*, vol. 20, págs. 1097-1108.
- Mackay et al., "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow" *Tissue Eng.*, vol. 4, págs. 415-428 (1998).
- 40 Malpeli et al., "Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression", *Tiss. Eng.*, vol 10, págs. 145-155 (2004).
- Mandl et al., "Serum-free medium supplemented with high concentrations of FGF-2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity" *Tiss. Eng.*, vol. 4, págs. 573-580 (2002).

- Mandl et al., "Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity", *Tiss. Eng.*, vol. 10, págs. 109-118 (2004).
- Omitz y Itoh, "Fibroblast growth factors", *Genome Biol.*, vol. 2(3), págs. 3005.1-3005.12(2001).
- 5 Ornitz, "FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development", *BioEssays*, vol. 22, págs. 108-112 (2000).
- Osman et al., "Combined transgenic expression of (acute over(.alpha.))-galactosidase and 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal{acute over (.alpha.)}/(1,3) Gal", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, págs. 14677-14682 (1997).
- 10 Plotnikov et al., "Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity", *Cell*, vol. 101, págs. 413-424 (2000).
- Reginato et al., "Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate", *Arthritis & Rheumatism*, vol. 37, págs. 1338-1349 (1994).
- 15 Sandrin et al., "Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity", *Nature Med.*, vol. 1, págs. 1261-1267 (1995).
- Sekiya et al., "Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes", *J. Endocrinol.*, vol. 169, págs. 573-579 (2001).
- Singley y Solursh, "The spatial distribution of hyaluronic acid and mesenchymal condensation in the embryonic chick wing", *Dev. Biol.*, vol. 84, págs. 102-120 (1981).
- 20 Stegmann y Stalder, "Determination of hydroxyproline", *Clin. Chim. Acta*, vol. 18, págs. 267-273 (1967).
- Turley y Roth, "Spontaneous glycosylation of glycosaminoglycan substrates by adherent fibroblasts", *Cell*, vol. 17, págs. 109-115 (1979).
- Vacanti, "Beyond Transplantation", *Arch. Surg.*, vol. 123, págs. 545-549 (1998).
- 25 Vacanti et al., "Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices", *J. Pediatr. Surg.*, vol. 23, págs. 3-9 (1998).
- West et al., "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid", *Science* vol. 228, págs. 1324-1326 (1985).
- Yoon et al., "Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase", *Biochem. J.*, vol. 277, págs. 8412-8420 (2002).
- 30 Secuencia CWU 1
- 22 1 23 ADN Artificial cebador AGC1-2S, núcleo de Agrecano, GenBank ID No. NM_01135 1 gaaactctag accatgacaa
ctc 23 2 21 ADN artificial cebador AGC1-2AS, núcleo de Agrecano, GenBank ID No. NM_01135 2 accagcagca
ctacctctc c 21 3 20 ADN Artificial cebador B7-H1-1S. B7-H1, GenBank ID No. NM_014143 3 gctctgtgtg ctgctgtgtc 20
4 23 ADN Artificial B7-H1-1AS primer, B7-H1, GenBank ID No. NM_014143 4 tcagatatac taggtgtagg gaa 23 5 24
35 ADN Artificial cebador B7-1-6S, B7-1, GenBank ID No. NM_005191 5 gccatcaaca caacagtttc ccaa 24 6 25 ADN
Artificial cebador B7-1-6AS, B7-1 (CD80), GenBank ID No. NM_005191 6 cagggcgtac acttccctt ctcaa 25 7 23 ADN
Artificial cebador B7-2-6S, B7-2, GenBank ID No. NM_006889 7 ctctctgtgtg ctgctctct gaa 23 8 27 ADN Artificial
cebador B7-1-6AS, B7-2 (CD86), GenBank ID No. NM_006889 8 ctgtggcctt tttgtatgg atgatac 27 9 20 ADN Artificial
cebador Col1A1-3S, Col1A1, GenBank ID No. NM_000088 9 cgagggccaa gacgaagaca 20 10 22 ADN Artificial
40 cebador Col1A1-3AS, Col1A1, GenBank ID No. NM_000088 10 ctgtgtcgtt ggtgtactct ga 22 11 26 ADN Artificial
cebador Col2A1-8S, Col2A1, GenBank ID No. NM_033150 11 caccctgagt ggaagagtgg agctac 26 12 23 ADN Artificial
cebador Col2A1-8AS, Col2A1, GenBank ID No. NM_033150 12 cagtgttgg agccagattg tca 23 13 27 ADN Artificial
cebador Col9A1-5S, Col9A1, GenBank ID No. X54412 13 aagcacaact cagtgcccca acaaac 27 14 20 ADN Artificial
cebador Col9A1-6AS, Col9A1, GenBank ID No. X54412 14 atcccatcac ggccatcaca 20 15 27 ADN Artificial cebador
45 Col11A1-2S, Col11A1, GenBank ID No. J04177 15 aagcacaact cagtgcccca acaaac 27 16 24 ADN Artificial cebador
Col11A1-2AS, Col11A1, GenBank ID No. J04177 16 ctaccgatg ccacttccc tcag 24 17 21 ADN Artificial cebador
GAPDH-1S, GAPDH, GenBank ID No. NM_002046 17 gcaaattcca tggcaccgtc a 21 18 20 ADN Artificial cebador
GAPDH-1AS, GAPDH, GenBank ID No. NM_002045 18 caggggtgct aagcagttg 20 19 26 ADN Artificial cebador
50 NCAD-1S, N-cadherina, GenBank ID No. BC036470 19 ggaaaagtgg caagtggcag taaaat 26 20 26 ADN Artificial
cebador NCAD-1AS, N-cadherina, GenBank ID No. BC036470 20 ccgagatggg gttgataatg aagata 26 21 23 ADN
Artificial cebador SOX9-1S, SOX-9, GenBank ID No. Z46629 21 gtcaacggct ccagcaagaa caa 23 22 19 ADN Artificial
cebador SOX9-1AS. SOX-9, GenBank ID No. Z46629 22 gctccgctc ctccacgaa 19

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ISTO Technologies, Inc.
 Adkisson, H. Davis IV
 Milliman, Curt L.
 Kizer, Neil

5

<120> MÉTODO DE EXPANSIÓN DE CONDRÓCITOS CON CONSERVACIÓN FENOTÍPICA

10 <130> 56067-129431

<150> US 11/859.524
 <151> 21-09-2007

15 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> cebador AGC1-S2, núcleo de agrecano

<400> 1

30 gaaacttcag accatgaaa ctc 23

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador AGC1-S2, núcleo de agrecano

<400> 2

40 accagcagca ctacctcctt c 21

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador B7-H1-1S, B7-H1

50 <400> 3

gctcttggtg ctggctggtc 20

55 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador B7-H1-1AS, B7-H1

<400> 4

65 tcagatatac taggtgtagg gaa 23

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador B7-1-6S, B7-1
 <400> 5
 10 gcatcaaca caacagttc cca 24
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador B7-1-6AS, B7-1 (CD80)
 20
 <400> 6
 cagggcgtac actttcctt ctcaa 25
 25 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador B7-2-6S, B7-2
 <400> 7
 35 ctctctggtg ctgctcctt gaa 23
 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador B-7-2-6AS, B7-2 (CD86)
 <400> 8
 45 ctgtggcctt tttgtgatgg atgatac 27
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador Col1A1-3S, Col1A1
 55 <400> 9
 cgagggccaa gacgaagaca 20
 60 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> cebador Col1A1-3AS, Col1A1

<400> 10
 ctgtgtcggg ggtgactct ga 22

5 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador Col2A1-8S, Col2A1

<400> 11

15 caccctgagt ggaagatgg agctac 26

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador Col2A1-8AS, Col2A1

<400> 12

25 cagtgtggg agccagattg tca 23

<210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador Col9A1-5S, Col9A1

35 <400> 13

aagcacaact cagtgcccca acaaaac 27

40 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador Col9A1-6AS, Col9A1

<400> 14

50 atcccatcac ggccatcaca 20

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador Col11A1-2S, Col11A1

60 <400> 15

aagcacaact cagtgcccca acaaaac 27

65 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador Col11A1-2AS, Col11A1
 5 <400> 16
 ctaccgcatg ccacttcccg tcag 24
 10 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador GAPDH-1S, GAPDH
 <400> 17
 20 gcaaattcca tggcaccgtc a 21
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador GAPDH-1AS, GAPDH
 <400> 18
 30 caggggtgct aagcagttgg 20
 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador NCAD-1S, N-cadherina
 40 <400> 19
 ggaaaagtgg caagtgccag taaaat 26
 <210> 20
 <211> 26
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador NCAD-1AS, N-cadherina
 50 <400> 20
 ccgagatggg gttgataatg aagata 26
 <210> 21
 55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> cebador SOX9-1S, SOX-9
 <400> 21
 gtcaacggct ccagcaagaa caa 23
 65 <210> 22
 <211> 19

ES 2 530 757 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador SOX9-1AS, SOX-9

<400> 22

gctccgcctc ctccacgaa 19

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir tejido cartilaginoso *in vitro*, comprendiendo el método:
- a) aislar una población de condrocitos de tejido cartilaginoso donante aislado;
- 5 b) expandir la población de condrocitos cartilaginosos en un medio de expansión y en un sustrato en condiciones eficaces para impedir la adhesión al sustrato de una mayoría de los condrocitos, en el que las condiciones comprenden expandir la población de células usando condiciones que comprenden:
- (i) un sustrato que tiene un recubrimiento de ácido hialurónico; o
- (ii) un sustrato no modificado que usa un medio de expansión que comprende ácido hialurónico en solución;
- 10 c) sembrar una pluralidad de condrocitos de la población expandida de condrocitos cartilaginosos en un medio de producción tisular que comprenda TGF- β , en un sustrato de policarbonato que tenga una pluralidad de poros a través del mismo, teniendo los poros un diámetro interno de al menos 1 micra a aproximadamente 12 micras; y
- d) cultivar los condrocitos sembrados en el medio de producción tisular en el sustrato de policarbonato poroso durante un periodo de tiempo suficiente para que los condrocitos produzcan matriz extracelular, produciendo de este modo *in vivo* un tejido cartilaginoso cultivado caracterizado por una organización de células al azar.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que después de al menos 3,8 duplicaciones de la población de condrocitos, al menos 50 % de los condrocitos conservan la morfología redondeada y la expresión génica de cartílago hialino.
3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el tejido cartilaginoso donante comprende tejido cartilaginoso hialino inmaduro y los condrocitos comprenden condrocitos cartilaginosos hialinos inmaduros.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la expansión de la población de células en condiciones de adhesión baja comprenden expandir la población de células usando un sustrato que tiene un recubrimiento de ácido hialurónico.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la expansión de la población de células en condiciones de adhesión baja comprende expandir la población de células usando un
- 25 sustrato no modificado y un medio de expansión que comprende ácido hialurónico en solución.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el medio de expansión comprende medio asérico y adicionalmente de modo opcional comprende TGF- β , FGF, L-Glutamina y Vitamina C.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la población de condrocitos comprende condrocitos de sinovio capsular, condrocitos de periostio, condrocitos articulares juveniles o condrocitos
- 30 articulares adultos.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la expansión de la población de condrocitos comprende:
- una primera expansión celular; y
- una segunda expansión celular;
- 35 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que adicionalmente comprende, después de sembrar la población de condrocitos en un sustrato de policarbonato para producir matriz extracelular, exponer la población de condrocitos a TGF- β en el medio de producción tisular durante un periodo de aproximadamente siete (7) días.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 que adicionalmente comprende mantener la población de
- 40 condrocitos en el medio de producción tisular a un nivel predeterminado de oxígeno y dióxido de carbono durante un periodo de cultivo de aproximadamente cuarenta y cinco (45) a aproximadamente sesenta y cinco (65) días.
11. Un cultivo celular que comprende una población expandida de condrocitos que expresa un fenotipo natural y un nivel natural de expresión génica de cartílago hialino que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo preferentemente la población de condrocitos, condrocitos
- 45 de sinovio capsular, condrocitos de periostio, condrocitos articulares juveniles, condrocitos articulares adultos o condrocitos transgénicos resistentes a rechazo de xenoinjerto mediado por el sistema inmunitario y una membrana de policarbonato que tiene una pluralidad de poros a través de la misma, teniendo los poros un diámetro interno de al menos aproximadamente 1 μ m a aproximadamente 12 μ m.

1/13

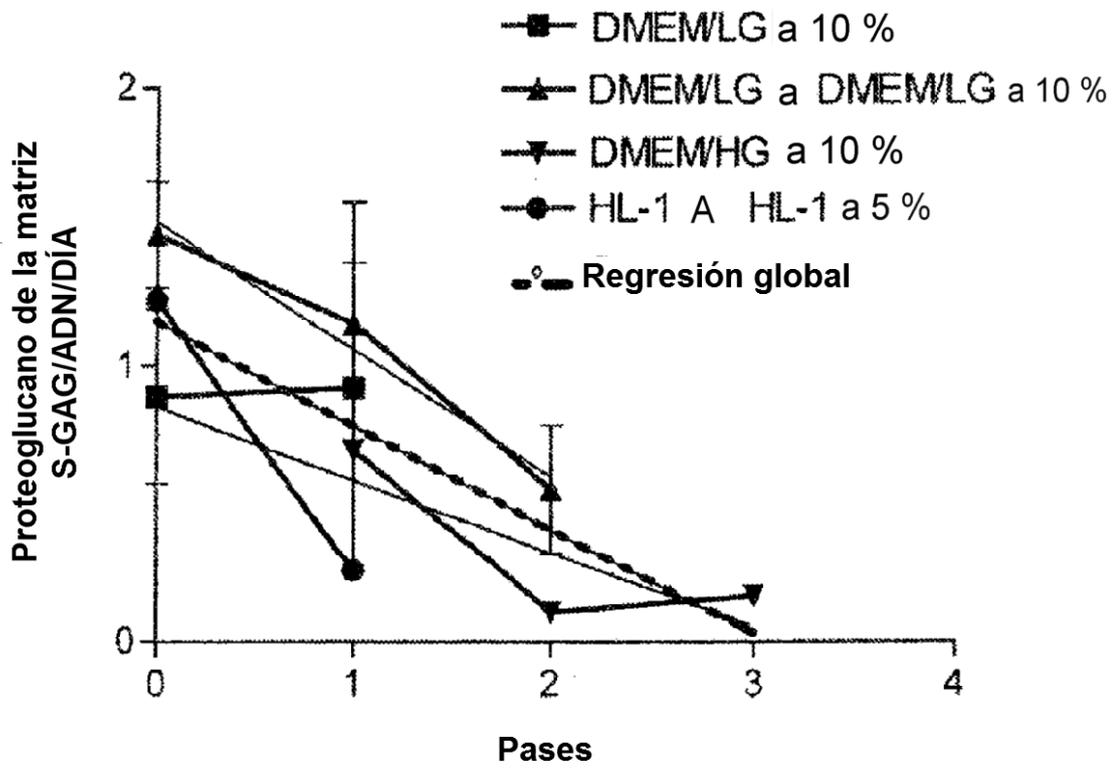
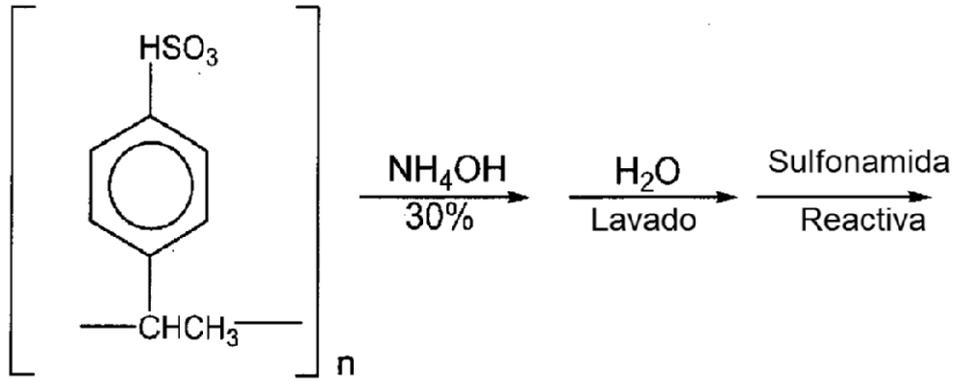
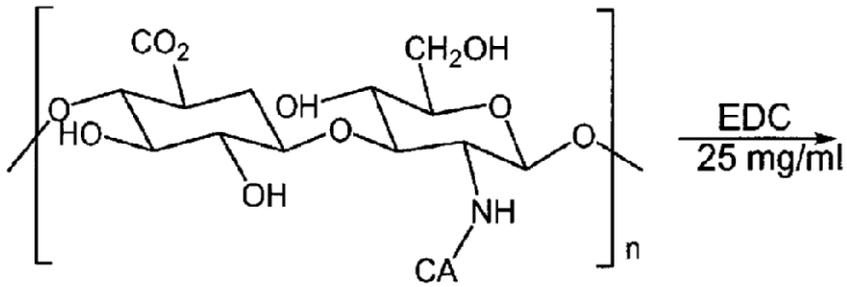


FIG. 1

2/13



Placa de cultivo tisular de poliestireno después de la sulfatación



GlcA- β -1,3-GlcNAc- β -1,4-



FIG. 2

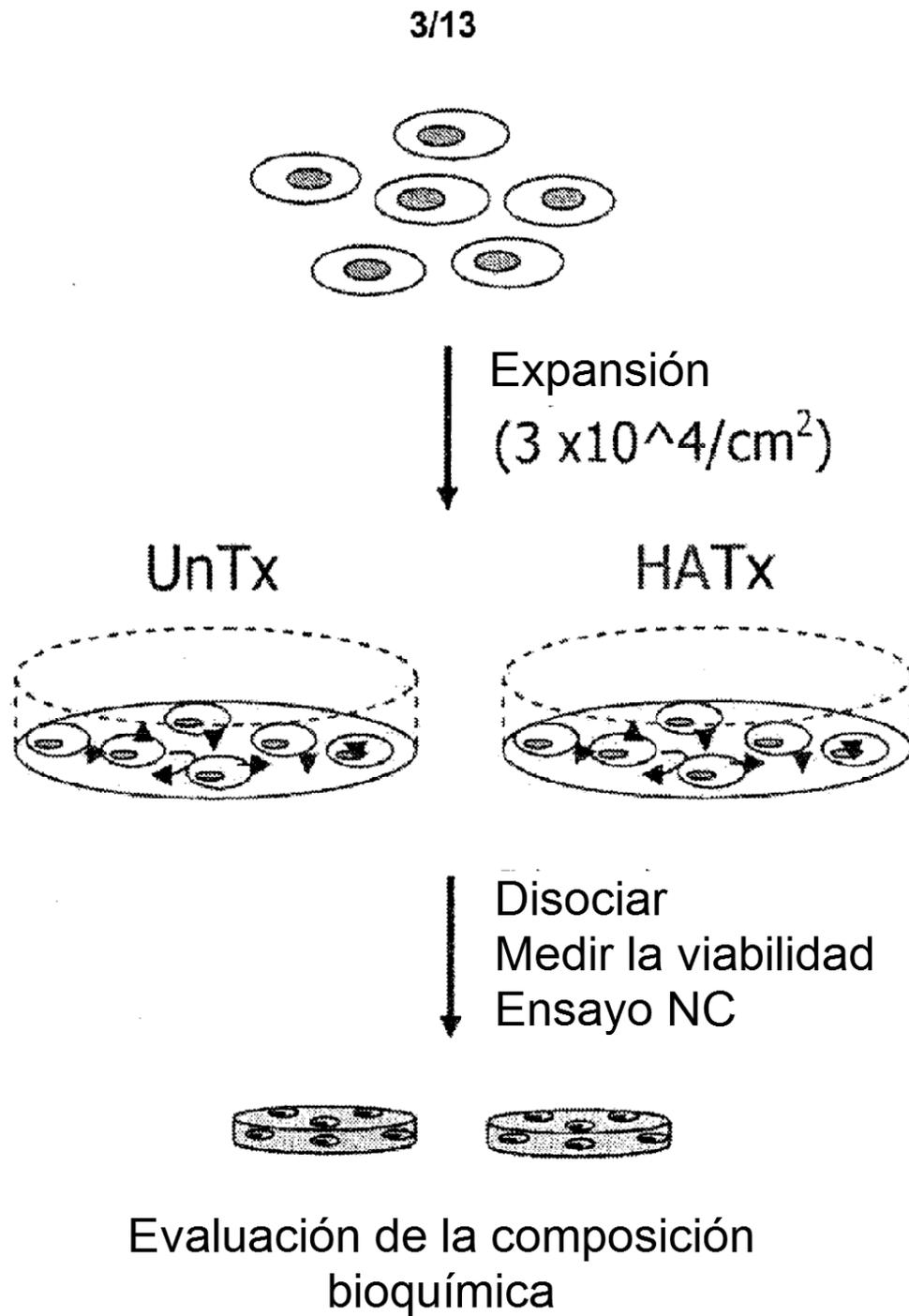


FIG. 3

4/13

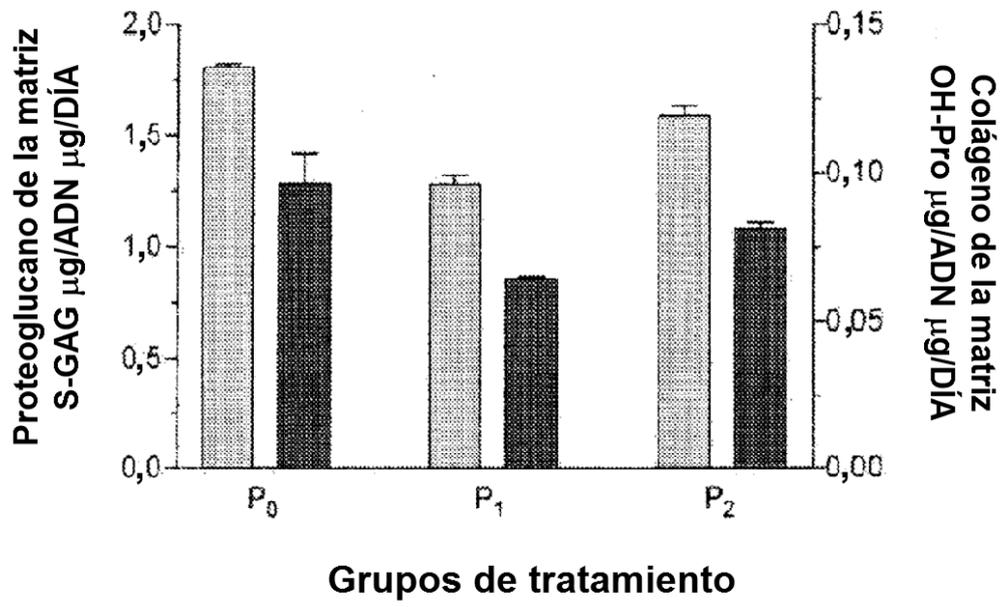


FIG. 4

5/13

FIG. 5A

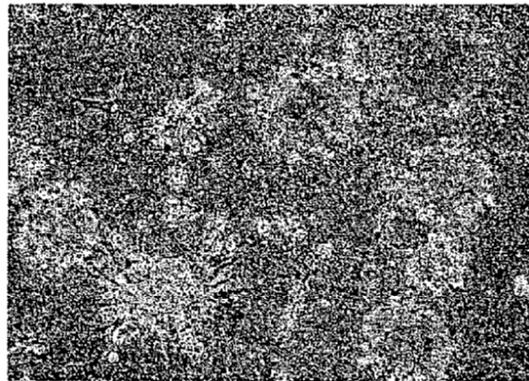
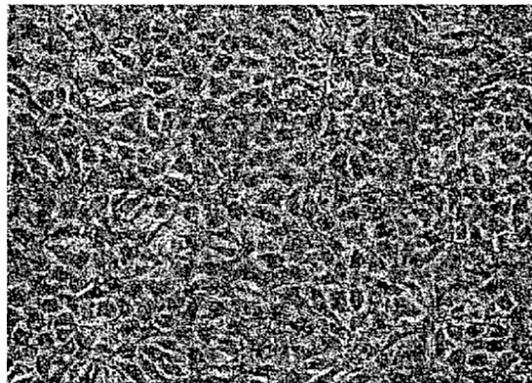
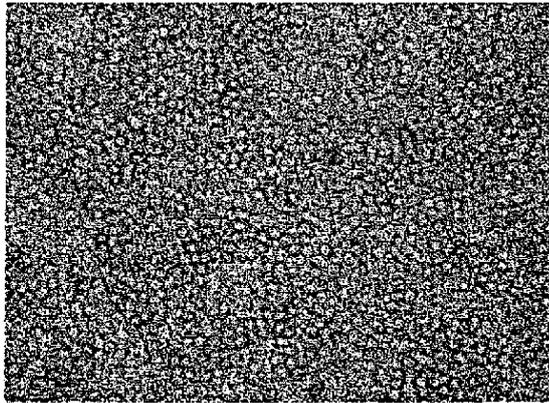


FIG. 5B

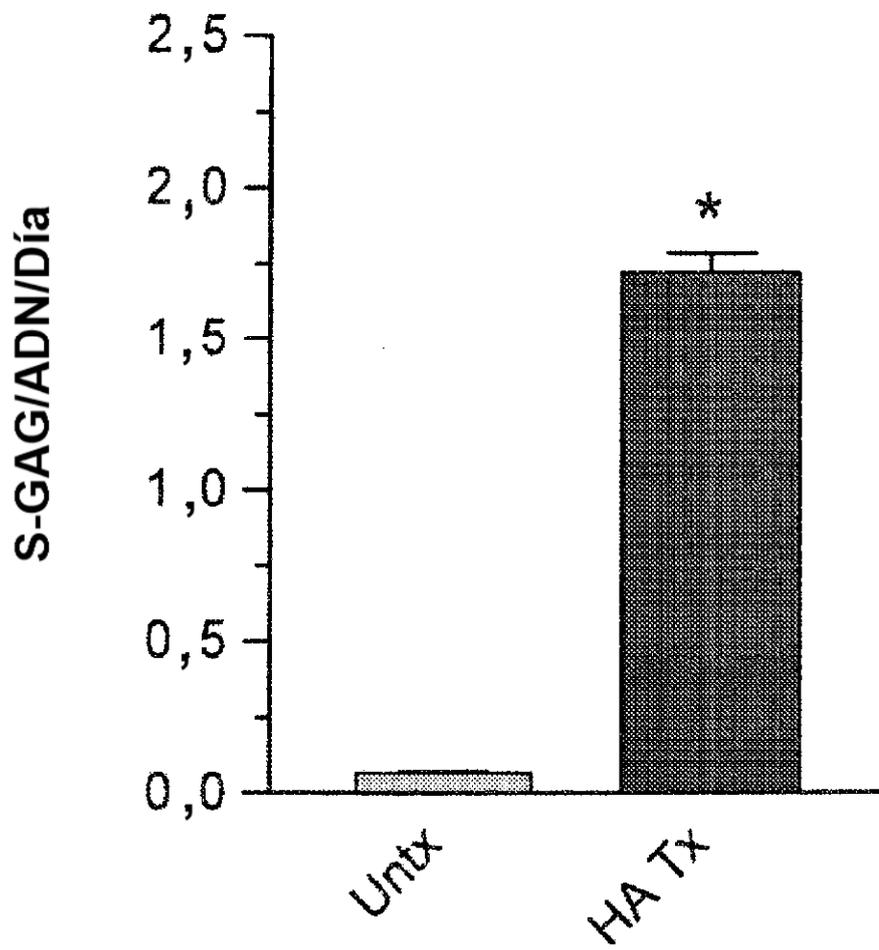


6/13

FIG. 6

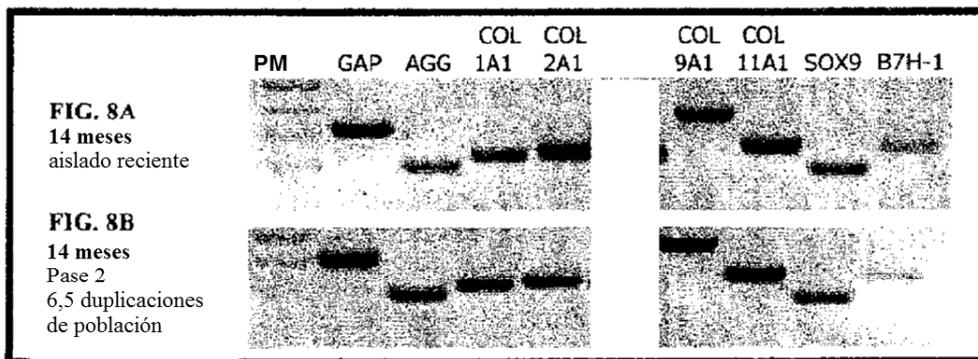


7/13



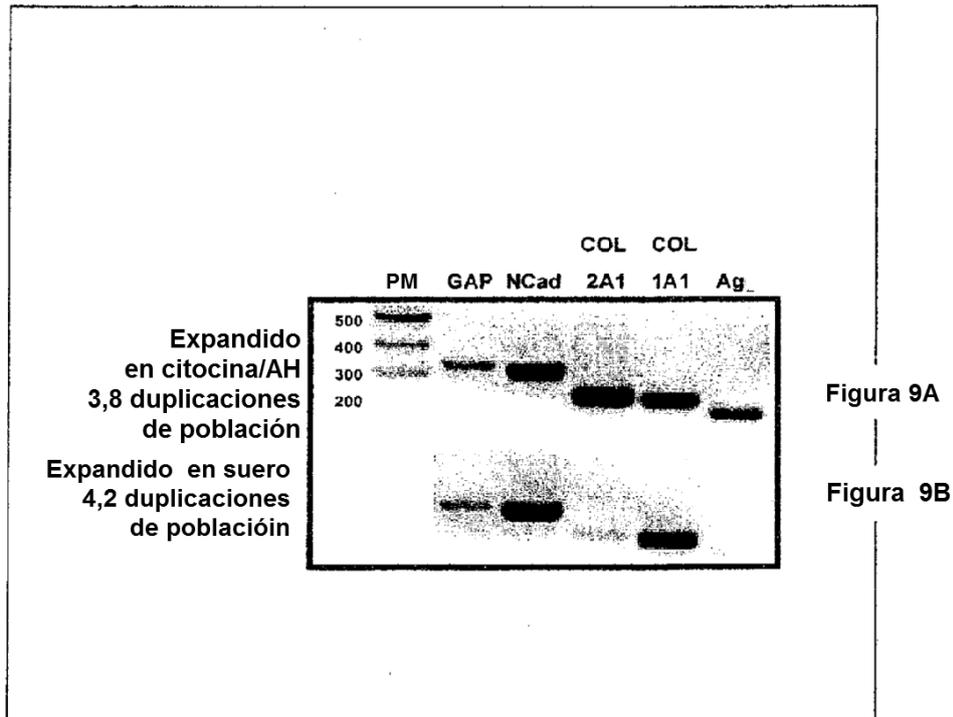
8/13

FIG. 8



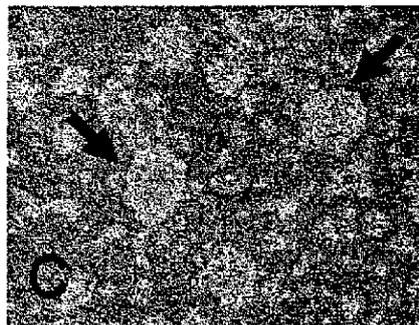
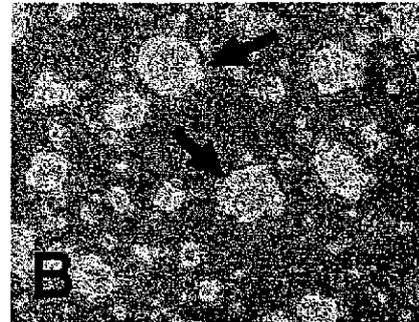
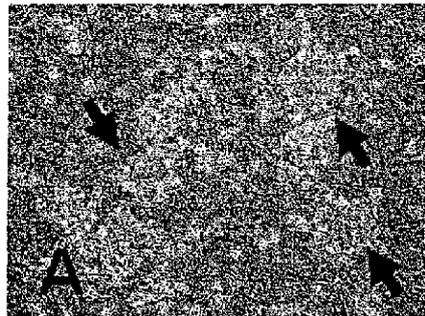
9/13

FIG. 9



10/13

FIG. 10



11/13

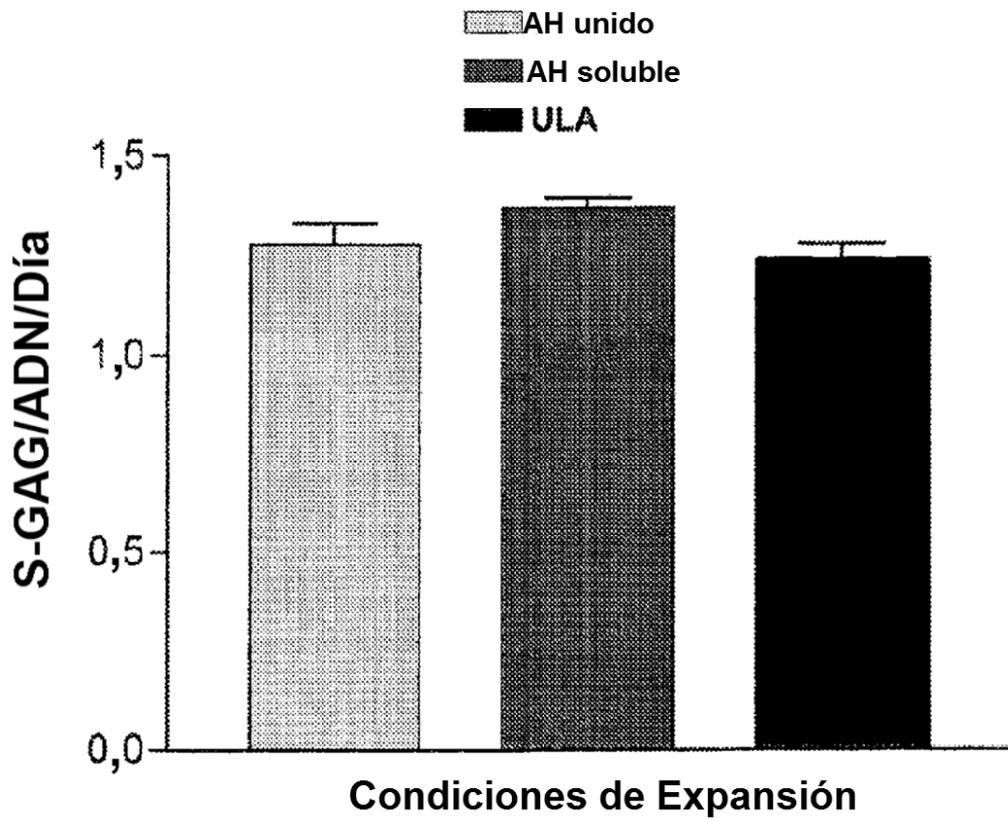


FIG. 11

12/13

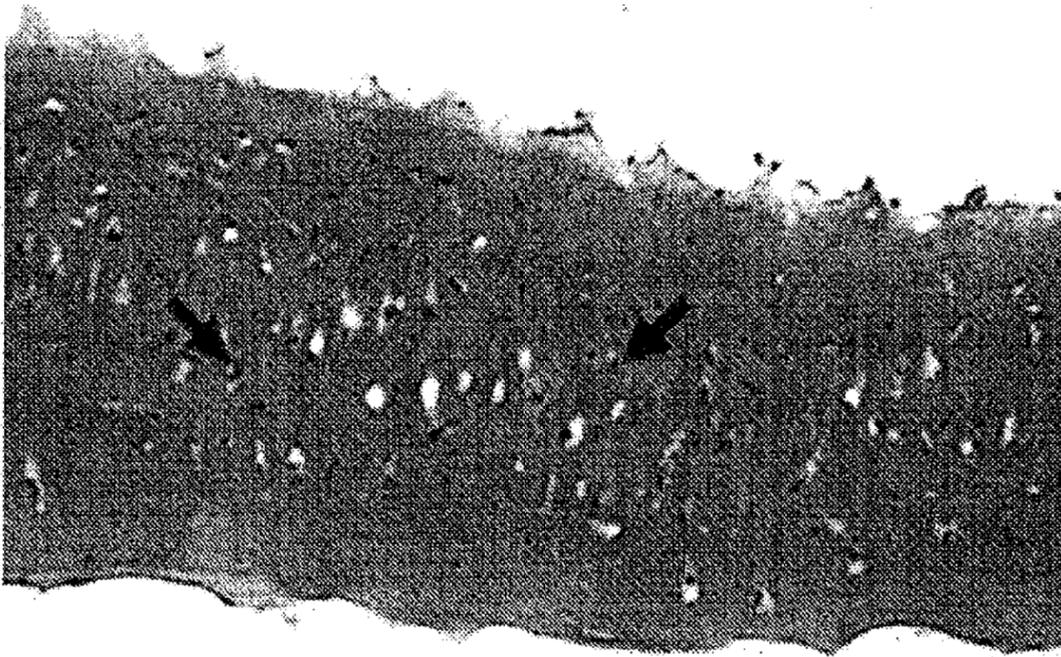


FIG. 12

