

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 752**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/32 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2012 PCT/EP2012/054654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12126824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012 E 12710906 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2686435**

54 Título: **Medios de diferenciación condrogénica y métodos para inducir la diferenciación condrogénica de células**

30 Prioridad:

18.03.2011 EP 11305306

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

23.11.2016

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris Cedex 13, FR;

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR

L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) (33.3%) y

UNIVERSITÉ DE NANTES (33.3%)

72 Inventor/es:

REDERSTORFF, EMILIE;

SINQUIN, CORINNE;

RATISKOL, JACQUELINE;

COLLIEC-JOUAULT, SYLVIA;

GUICHEUX, JÉROME;

WEISS, PIERRE y

MERCERON, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 590 752 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

Medios de diferenciación condrogénica y métodos para inducir la diferenciación condrogénica de células

5 **Estado de la técnica**

El cartílago articular es un tejido especializado que rodea los extremos de los huesos largos. Reduce la fricción y actúa como un tejido que absorbe los golpes durante la movilización de la articulación. El cartílago se compone de un solo tipo de células, el condrocito, que es responsable de la síntesis de una abundante matriz extracelular esencialmente compuesta de colágenos de tipo II, IX y XI y proteoglicanos. Los condrocitos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad del cartílago a través del control de los procesos anabólicos y catabólicos. El cartílago es sin embargo susceptible de daño como consecuencia del envejecimiento, traumatismo y enfermedades inflamatorias o degenerativas. Estas alteraciones a menudo tienen como resultado la degradación de la matriz extracelular y en última instancia la pérdida de la función articular.

Se han desarrollado muchos enfoques quirúrgicos para mejorar la mala capacidad de auto-reparación intrínseca del cartílago. Desafortunadamente, estas técnicas no han demostrado una eficacia satisfactoria. En este contexto, se ha contemplado la regeneración de un cartílago funcional a través del trasplante de células madre mesenquimales con matrices sintéticas bioactivas. Las células madre mesenquimales (MSC) se identificaron inicialmente en la médula ósea y posteriormente en varios otros tejidos tales como, por ejemplo, tejido adiposo, tendón, membrana sinovial, músculo, periostio. Las MSC presentan una serie de características atractivas, especialmente para la medicina regenerativa, incluyendo su auto-renovación, su capacidad para proliferar en cultivo y su multipotencia. En particular, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea y las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) son prometedores para su uso en la reparación del cartílago. Sin embargo, es necesario un mayor entendimiento para desarrollar un enfoque sistemáticamente reproducible para inducir de forma potente la diferenciación condrogénica en estas líneas de células madre y para inhibir condrocitos diferenciados de maduración adicional en el linaje hipertrófico.

Un enfoque para inducir la diferenciación condrogénica ha sido usar hidrogeles para la incorporación de polisacáridos, incluyendo exopolisacáridos de origen marino (WO 2009/070842; Vinatier et al, Biomaterials, 20015, 26: 6643-6651; Rederstorff et al, Acta Biomaterialia de 2011, 7:2119-2130; Rederstorff et al, Bone, 2011, 48: S141). Otros enfoques para inducir la diferenciación condrogénica en líneas de células madre incluyen medios de diferenciación condrogénica apropiados. Jennifer L. Puetzer et al. han revisado los diferentes medios de diferenciación condrogénica propuestos hasta la fecha por la comunidad científica (Tissue Engineering: Parte B, Volumen 16, Número 4, 2010). Estos autores concluyen que ninguno de estos medios de diferenciación condrogénica es capaz de producir condrocitos estables.

Por tanto, existe una necesidad de proporcionar nuevos medios de diferenciación condrogénica con propiedades mejoradas.

40 **Objeto de la invención**

Los inventores han demostrado que las propiedades de diferenciación condrogénica de los medios de diferenciación condrogénica que comprenden factores de crecimiento conocidos por inducir la diferenciación condrogénica se pueden aumentar de manera espectacular, completando dichos medios con derivados de polisacárido sulfatado de bajo peso molecular específicos de exopolisacáridos nativos marinos (EPS).

La invención se refiere, por lo tanto, a medios de diferenciación condrogénica que comprenden:

- 50 - al menos un factor de crecimiento condrogénico seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes β , proteínas morfogenéticas óseas y mezclas de los mismos y
- un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular preparado a partir de un exopolisacárido (EPS) nativo marino excretado por una bacteria marina mesófila de un ambiente hidrotermal de aguas profundas,

55 en el que dicho polisacárido sulfatado bajo peso molecular se puede obtener mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

- (a) una etapa que consiste en la despolimerización por radicales libres de dicho EPS nativo a fin de obtener un EPS despolimerizado que tiene un peso molecular de 5.000 a 100.000 g/mol,
- 60 (b) una etapa subsiguiente que consiste en la sulfatación del EPS despolimerizado, que comprende la adición al EPS despolimerizado de al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener un polisacárido sulfatado que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del polisacárido sulfatado.

65 La invención también se refiere a kits que consisten en:

- al menos un factor de crecimiento condrogénico seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes β , proteínas morfogenéticas óseas y mezclas de los mismos
- un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular de acuerdo con la invención, y
- un medio de cultivo celular líquido.

5 También se describe en la presente memoria un método para inducir la diferenciación condrogénica en células pluripotentes o multipotentes, en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica de acuerdo con la invención.

10 También se describe en la presente memoria un método para obtener un tejido de cartílago en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica de acuerdo con la invención.

15 También se describen en la presente memoria los tejidos de cartílago obtenidos utilizando un método de este tipo y el uso de estos tejidos de cartílago como injertos en los métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal.

Definiciones

20 En el contexto de la presente invención, la expresión “*Medios de diferenciación condrogénica*” se refiere a medios líquidos capaces de inducir la diferenciación condrogénica en células pluripotentes o multipotentes cultivadas en dichos medios. Un medio de diferenciación condrogénica de acuerdo con la invención contiene generalmente, además de dicho factor(s) de crecimiento condrogénico y dicho derivado(s), los nutrientes necesarios para soportar el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. Por lo tanto, los medios de diferenciación condrogénica apropiados de acuerdo con la invención comprenden generalmente un medio mínimo en el que las

25 células pueden crecer como por ejemplo el medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el medio F-12 de Ham o mezclas de los mismos, suplementado con al menos uno de los siguientes: glucosa, seroalbúmina bovina (BSA), BD™ ITS + suplementos de cultivo universal, insulina, transferrina, ácido selenioso, ácido linoleico, hidrocortisona, fosfato inorgánico, ascorbato-2-fosfato, ascorbato, ascorbato de sodio, cloruro de calcio, tiroxina, prolina, piruvato, piruvato de sodio, hidrócloruro de piridoxina, glutamax, aminoácidos no esenciales,

30 L-glutamina, β -glicero fosfato, dexametasona. Ejemplos de medios adecuados se divulgan por Jennifer L. Puetzer et al. en Tissue Engineering: Parte B, Volumen 16, Número 4, 2010.

La expresión “*diferenciación condrogénica*”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la diferenciación de células pluripotentes o pluripotentes en células que producen una matriz extracelular cercana a la del cartílago. La diferenciación condrogénica de las células pluripotentes o multipotentes se evalúa generalmente midiendo el volumen del sedimento celular, la morfología celular y la composición de la matriz mediante tinción de hematoxilina-eosina-azafrán (HES) y tinción con azul alcian, como se describe totalmente por Merceron C. et al. en Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 298 (2): p.355-64. La tinción HES permite distinguir núcleos celulares y citoplasma en las células que constituyen el sedimento celular, evidenciando de este modo la presencia o no de una organización estructural de las células dentro del sedimento celular, una organización estructural que es indicativa de una diferenciación condrogénica. La tinción HES colorea además las fibras de colágeno dentro de la matriz, lo que también es indicativo de la diferenciación condrogénica. La tinción con azul alcian revela la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), que es otro marcador de la diferenciación condrogénica. Además, la detección inmunohistológica de los colágenos tipo II, IX y XI, así como agregano podría utilizarse también como marcadores adicionales de diferenciación condrogénica. La diferenciación condrogénica de las células pluripotentes o multipotentes también se evalúa midiendo el nivel de expresión en las células del ARNm que codifica para COL2A1 (colágeno de tipo II), ACAN (agregano), SOX9 y COMP (proteína de la matriz oligomérica del cartílago), que son marcadores específicos de los condrocitos.

50 El término “*al menos un factor de crecimiento condrogénico*”, como se usa en la presente memoria, se refiere a uno, dos, tres, cuatro o más factores de crecimiento condrogénico.

El término “*células pluripotentes*”, como se usa en la presente memoria, se refiere a células no diferenciadas que pueden dar lugar a una variedad de diferentes linajes de células de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Generalmente, las células pluripotentes pueden expresar los siguientes marcadores oct4, SOX2, Nanog, SSEA 3 y 4, TRA 1/81, véanse las recomendaciones internacionales de la Iniciativa de Células Madre (Nature Biotechnology 25, 803-816 (2007)).

60 Los términos “*células multipotentes*” y “*células progenitoras*” se utilizan aquí indistintamente. Se refieren a células no diferenciadas que pueden dar lugar a un número limitado de diferentes linajes de células, incluyendo condrocitos. Células multipotentes típicas de acuerdo con la invención son las células madre mesenquimales.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “*sujeto*” se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, que puede o no puede sufrir de una enfermedad asociada con el daño del cartílago.

65

El término “tratar” o “tratamiento” se refiere a un método que está dirigido a retrasar o prevenir la aparición de una enfermedad, a revertir, aliviar, inhibir, ralentizar o detener la progresión, empeoramiento o deterioro de los síntomas de la enfermedad, lograr mejorías de los síntomas de la enfermedad y/o la curación de la enfermedad

5 Descripción detallada de la invención

I - Medios de diferenciación condrogénica

La invención se refiere, por lo tanto, a medios de diferenciación condrogénica que comprenden:

- al menos un factor de crecimiento condrogénico seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes β , proteínas morfogenéticas óseas y mezclas de los mismos y
- un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular preparado a partir de un exopolisacárido (EPS) nativo marino excretado por una bacteria marina mesófila de un ambiente hidrotermal de aguas profundas,

en el que dicho polisacárido sulfatado bajo peso molecular se puede obtener mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

- (a) una etapa que consiste en la despolimerización por radicales libres de dicho EPS nativo a fin de obtener un EPS despolimerizado que tiene un peso molecular de 5.000 a 100.000 g/mol,
- (b) una etapa subsiguiente que consiste en la sulfatación del EPS despolimerizado, que comprende la adición al EPS despolimerizado de al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener un polisacárido sulfatado que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del derivado polisacárido sulfatado.

1. Procesos para la obtención de polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular

Los procesos para la obtención de derivados de polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular de exopolisacáridos (EPS) nativos marinos de acuerdo con la invención se describen completamente en la solicitud internacional WO 2006/003290 y también por Collic Jouault S. et al. en Biochim Biophys Acta 2001 de 1528 (2-3): p.141-151 y por Guezenc J. et al. en Carbohydrate Polymers 1998, 37(1): p.19-24.

En ciertas realizaciones, los derivados despolimerizados obtenidos después de la etapa (a) se liofilizan.

En otras realizaciones, la etapa (b) del proceso va seguida de una etapa de diálisis.

Durante la primera fase de despolimerización, el EPS nativo se puede utilizar en una forma líquida, es decir, excretado por las bacterias en el medio de cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo se centrifuga y solo el sobrenadante que contiene el EPS nativo y que está libre de residuos bacterianos se recoge. El EPS nativo se puede recoger por cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica, tal como por ejemplo ultrafiltración de membrana y pueden entonces opcionalmente liofilizarse tal cual o en forma de una sal de adición.

La etapa que consiste en la despolimerización por radicales libres del EPS nativo se lleva a cabo preferiblemente por adición de una solución de un agente oxidante a una mezcla de reacción que comprende el EPS nativo, preferiblemente en presencia de un catalizador de metal. El agente oxidante se elige preferiblemente de peróxidos, en particular peróxido de hidrógeno y perácidos, en particular ácido peracético y ácido 3-cloroperbenzoico. La adición se lleva a cabo preferiblemente de forma continua y con agitación durante un periodo de entre 30 minutos y 10 horas. La mezcla de reacción se mantiene preferiblemente a un pH de entre 6 y 8, por ejemplo, por adición de un agente alcalinizante tal como hidróxido de sodio y a una temperatura de entre aproximadamente 30 °C y 70 °C durante toda la duración de la reacción de despolimerización por radicales libres.

De acuerdo con una realización específica de la presente invención, en esta etapa, el EPS nativo está presente en la mezcla de reacción a una concentración de entre aproximadamente 2 y 10 mg/ml de mezcla de reacción.

En realizaciones preferidas, el agente oxidante es una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que tiene preferiblemente una concentración de entre aproximadamente 0,1 % y 0,5 % en peso, preferentemente del orden de 0,1 % a 0,2 % en peso y se añade a una velocidad de flujo de V1/1000 a V1/10 ml/minuto, preferiblemente V1/50 y V1/500 ml/minuto y más preferiblemente del orden de V1/100 ml/minuto, siendo V1 el volumen del medio de reacción que contiene un exopolisacárido (EPS) marino al que se añade una solución de peróxido de hidrógeno.

Los catalizadores de metal que se pueden utilizar durante la etapa de despolimerización se eligen preferiblemente de iones Cu⁺⁺, Fe⁺⁺ y Cr⁺⁺⁺ iones y el anión Cr₂O₇²⁻, tal como se describe en particular en la solicitud de patente EP 0 221 977. De acuerdo con una realización específica, el catalizador de metal está presente en la mezcla de reacción a una concentración de entre aproximadamente 10⁻³ M y 10⁻¹ M, y preferiblemente a una concentración de entre aproximadamente 0,001 y 0,05 M.

- El proceso de despolimerización por radicales libres de acuerdo con la invención y como se ha descrito anteriormente hace que sea posible obtener, en una sola etapa y con un buen rendimiento, derivados de polisacárido de bajo peso molecular homogéneos. En el contexto de la presente invención, el término “derivados homogéneos” se pretende que signifique derivados que, cuando se evalúan mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento, presentan un solo pico principal que representa una población predominante de cadenas de polisacáridos que son homogéneas con respecto al tamaño, caracterizado por un índice de polidispersidad I (Mw/Mn) <5, donde Mw = peso molecular promedio en peso y Mn = peso molecular promedio en número.
- En ciertas realizaciones, cuando la reacción de despolimerización finaliza, los derivados de polisacáridos obtenidos se reducen usando un agente reductor, a fin de estabilizar las cadenas, los extremos reductores de las cuales son muy reactivas y, en particular para evitar la hidrólisis de la cadena por reacción de “pelado”. La naturaleza de los agentes reductores que se pueden utilizar a este efecto no es esencial. El agente reductor puede ser, en particular, borohidruro de sodio.
- El catalizador de metal usado en la etapa de despolimerización se puede eliminar al final de la reacción de despolimerización, (o al final de la reacción de reducción, si se lleva a cabo una etapa de reducción) usando cualquier método adecuado, por ejemplo, por cromatografía de intercambio de iones, preferiblemente una resina de intercambio catiónico débil pasivada de antemano, o por tratamiento con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).
- En ciertas realizaciones, antes de la etapa de sulfatación, se lleva a cabo una etapa que consiste en la N-desacetilación de los derivados de polisacáridos que comprenden hexosaminas N-acetiladas que se obtienen al final de la etapa de despolimerización por radicales libres y/o al final de la etapa de reducción. Esta etapa de N-desacetilación se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo adaptado de Zou et al. (Carbohydr. Res, 1998, 309: 297-301.). Ventajosamente, la etapa de N-desacetilación se lleva a cabo mediante la adición, a la mezcla de reacción que comprende los derivados de polisacáridos, de una solución de borohidruro de sodio, bajo condiciones de agitación. Cuando la temperatura de la mezcla de reacción alcanza aproximadamente 80 °C, un agente alcalinizante, preferiblemente hidróxido de sodio, se añade al medio de reacción. Después de la reacción durante una hora, el medio de reacción se neutraliza mediante la adición continua de ácido acético hasta que se obtiene un pH de 5. Los derivados de polisacárido obtenidos se pueden recuperar mediante ultrafiltración de membrana y, a continuación, opcionalmente, se pueden liofilizar.
- Los derivados de polisacáridos que resultan de la despolimerización y/o de la reducción y/o de la N-desacetilación pueden, si es necesario, ser recuperados por cualquier técnica adecuada bien conocida por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, por ultrafiltración de membrana o diálisis. A continuación, se liofilizaron y se fraccionan por cromatografía de exclusión de tamaño para aumentar su pureza requerida para mejorar la etapa de sulfatación posterior. Por último, los derivados de polisacáridos purificados se acondicionan en forma de sal por adición de una base débil o fuerte, que puede ser elegida, por ejemplo, a partir de piridina, trietilamina, tributilamina, hidróxido de tetrabutilamonio e hidróxido de sodio. Esta sal liofilizada se puede preparar, por ejemplo, mediante elución de una solución acuosa de los derivados de polisacárido a una concentración de entre 1 y 8 mg/ml en una columna de resina de intercambio iónico, tal como, por ejemplo, los vendidos con el nombre Dowex® por la empresa Dow Chemical. El eluato se recoge siempre que el pH se mantiene ácido, por ejemplo, menos de 5, a continuación, el pH se ajusta posteriormente a aproximadamente 6,5 con la base deseada tal como se define anteriormente. A continuación, los derivados de polisacáridos en forma de una sal se ultrafiltran y se liofilizan.
- Los derivados de polisacáridos liofilizados, posiblemente en forma de una sal de adición, se disuelven preferiblemente en un disolvente anhidro al comienzo de la etapa de sulfatación; este disolvente se elige preferiblemente de dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), formamida y mezclas de los mismos. La cantidad de derivados de polisacárido presentes en el disolvente anhidro puede ser de entre aproximadamente 1 y 10 mg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 5 mg/ml, e incluso más preferiblemente esta cantidad es de aproximadamente 2,5 mg/ml. La disolución del EPS en el disolvente anhidro se lleva a cabo preferiblemente, con agitación, a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 a 2 horas y luego a una temperatura de entre 40 °C y 50 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 45 °C durante aproximadamente 2 horas en atmósfera de argón o nitrógeno con el tamiz molecular.
- El uno o más agentes de sulfatación química utilizados durante la etapa de sulfatación se puede añadir a los EPS despolimerizados y/o reducidos y/o N-desacetilados que están en forma liofilizada o en forma de una solución.
- Los agentes de sulfatación se eligen preferiblemente entre los complejos de sulfato de piridina (libre o unido a un polímero), de sulfato de dimetilformamida, de sulfato de trietilamina y de sulfato de trimetilamina. El uno o más agentes de sulfatación química se añaden a la solución de derivados de polisacárido en una cantidad en peso que representa preferiblemente de aproximadamente 4 a 6 veces y aún más preferiblemente aproximadamente 5 veces, la masa de derivados de polisacárido en solución. La reacción de sulfatación química se lleva a cabo preferiblemente con agitación durante un período de entre aproximadamente 2 y 24 horas dependiendo del grado deseado de sulfatación. Cuando se alcanza el grado deseado de sulfatación, la reacción de sulfatación se detiene después del enfriamiento del medio de reacción:

- por precipitación en presencia de acetona saturada con cloruro sódico o de metanol y posterior disolución del precipitado en agua;
- o, preferiblemente, por adición de agua en una proporción preferentemente igual a 1/10 del volumen de reacción y ajuste del pH del medio de reacción a 9 con un agente alcalinizante tal como, por ejemplo, hidróxido sódico (3 M).

De acuerdo con ciertas realizaciones, la solución de derivados de polisacáridos sulfatados se dializa preferiblemente con el fin de eliminar las diversas sales, y después se liofiliza. El producto final, generalmente con un peso molecular exacto y un índice de polidispersidad bajo de menos de 2, se obtiene por fraccionamiento realizado por cromatografía de exclusión de tamaño.

Los derivados de polisacárido sulfatado de bajo peso molecular de acuerdo con la invención tienen un peso molecular de 5.000 a 100.000 g/mol, 5.000 a 60.000 g/mol, 5.000 a 50.000 g/mol, 5.000 a 40.000 g/mol, preferiblemente de 5.000 a 30.000 g/mol, más preferiblemente de 10.000 a 25.000 g/mol.

Los derivados de polisacárido sulfatado de bajo peso molecular de acuerdo con la invención tienen un índice de polidispersidad de menos de 5, preferiblemente de 1,5 a 4, más preferiblemente de menos de 2. El índice de polidispersidad (PDI) de acuerdo con la invención es una medida de la distribución de la masa molecular de los derivados. El PDI calculado es el peso molecular promedio en peso dividido por el peso molecular promedio en número. El PDI se mide generalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Los derivados de polisacáridos sulfatados de acuerdo con la invención tienen un grado de sustitución con grupos sulfato de entre 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del derivado de polisacárido sulfatado. En ciertas realizaciones, el grado de sustitución con grupos sulfato es de entre 10 % y 40 %, de entre 20 % y 45 % o de entre 20 % y 40 %.

En ciertas realizaciones, los derivados de polisacáridos sulfatados de acuerdo con la invención tienen un peso molecular de 5.000 a 50.000 g/mol, un índice de polidispersidad de menos de 5, en particular de 1,5 a 4, más particularmente de menos de 2 y un grado de sustitución con grupos sulfato de entre 20 % y 40 % en peso con respecto al peso total del derivado de polisacárido sulfatado.

2. Bacterias marinas mesófilas

Los derivados de acuerdo con la invención se preparan a partir de exopolisacáridos (EPS) nativos marinos excretados por una bacteria marina mesófila de un entorno hidrotermal de aguas profundas seleccionado del grupo que consiste en bacterias del género *Alteromonas*, del género *Pseudoalteromonas* y del género *Vibrio*. En una realización particular, la bacteria del género *Alteromonas* se selecciona del grupo que consiste en las cepas GY785, HYD 657, HYD 708, HYD 721, HYD 1545, HYD 1644, ST 716 y MS 907. En otra realización particular, la bacteria marina mesófila es la cepa HE 800 del género *Vibrio*.

En ciertas realizaciones preferidas, el derivado de acuerdo con la invención se prepara a partir de la cepa GY785 del género *Alteromonas* (*Alteromonas infernus*). Tal derivado se llama "GY 785 DRS" (véase la Figura 1 para la estructura molecular).

3. Características químicas de los EPS nativos y derivados

En ciertas realizaciones, los derivados de polisacárido sulfatados de bajo peso molecular se obtienen de EPS nativos excretados por las bacterias del género *Alteromonas*. Los EPS nativos tienen generalmente un contenido de monosacáridos neutro de 20 % a 70 %, preferiblemente de 30 % a 60 % y más preferiblemente de 38 % a 57 % en peso. Además, los EPS nativos tienen generalmente un contenido de monosacárido ácido de desde 5 % a 60 %, preferiblemente de entre 6 % y 50 % y más preferiblemente de entre 8 % y 42 % en peso. Los EPS nativos también tienen generalmente un contenido de amino azúcar de desde 0 % a 1 % en peso en su composición óxido.

En una realización particular, los EPS nativos excretados por bacterias del género *Alteromonas* tienen una composición óxido que comprende:

- de 20 % a 70 %, preferiblemente de 30 % a 60 %, y más preferiblemente de 38 % a 57 % en peso de monosacáridos neutros,
- de 5 % a 60 %, preferiblemente de 6 % a 50 %, y más preferiblemente de 8 % a 42 % en peso de monosacáridos ácidos,
- de 0 % a 1 % en peso de amino azúcares.

De acuerdo con otra realización, el polisacárido sulfatado de bajo peso molecular de la invención se obtiene de los EPS nativos excretados por las bacterias del género *Vibrio*, preferiblemente por la cepa bacteriana HE 800. Los EPS nativos excretados por las bacterias del género *Vibrio* no están sulfatados. Los EPS nativos tienen generalmente un contenido de monosacáridos neutro de 0 % a 5 %, preferiblemente de 0 % a 1 % en peso. Los EPS nativos también

5 tienen generalmente un contenido de monosacárido ácido de 20 % a 50 %, preferiblemente de 25 % a 40 % y más preferiblemente de 30 % a 32 % en peso. El EPS nativo todavía tiene generalmente un contenido de amino azúcar de 20 % a 50 %, preferiblemente de 25 % a 40 % y más preferiblemente de 30 % a 35 % en peso. Por último, los EPS nativos tienen generalmente un contenido de grupos N-acetilados de 0 % a 15 %, preferiblemente de 4 % a 8 % y más preferiblemente de 5 % a 6 % en peso.

En una realización particular, los EPS nativos excretados por las bacterias del género *Vibrio* tienen una composición óxido que comprende:

- 10 - de 0 % a 5 %, preferiblemente de 0 % a 1 % en peso de monosacáridos neutros,
 - de 20 % a 50 %, preferiblemente de 25 % a 40 %, y más preferiblemente de 30 % a 32 % en peso de monosacáridos ácidos,
 - de 20 % a 50 %, preferiblemente de 25 % a 40 %, y más preferiblemente de 30 % a 35 % en peso de amino azúcares,
 15 - de 0 % a 15 %, preferiblemente de 4 % a 8 %, y más preferiblemente de 5 % a 6 % en peso de grupos N-acetilados.

20 Aún más generalmente, los EPS nativos excretados por una bacteria marina mesófila de acuerdo con la invención tienen un contenido de proteínas de 0 % a 15 %, preferiblemente de 0 % a 5 % y más preferiblemente de 0 % a 1 % en peso.

4. Cantidad de derivados en los medios de diferenciación condrogénica

25 En ciertas realizaciones, los medios de diferenciación condrogénica de acuerdo con la invención comprenden de 5 µg/ml a 200 µg/ml, particularmente de 25 µg/ml a 100 µg/ml, más particularmente de 25 µg/ml a 75 µg/ml, más particularmente aproximadamente 50 µg/ml de dicho derivado.

5. Factores de crecimiento condrogénicos

30 Los factores de crecimiento condrogénicos se describen completamente en la técnica anterior y son bien conocidos por la persona experta. La revisión de Jennifer L. Puetzer (Tissue Engineering: Parte B, Volumen 16, Número 4, 2010), por ejemplo, divulga diferentes factores de crecimiento condrogénicos, utilizados solos o en combinación para inducir la diferenciación condrogénica de las células pluripotentes o multipotentes.

35 Las principales familias de factores de crecimiento condrogénico son factores de crecimiento transformantes β y proteínas morfogenéticas óseas. Los factores de crecimiento transformantes β se seleccionan generalmente de TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. Las proteínas morfogenéticas óseas se seleccionan generalmente de BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP-9.

40 Otros factores de crecimiento condrogénico incluyen factores de crecimiento de fibroblastos, en particular FGF-2 y factores de crecimiento similares a la insulina FGF-2, y, en particular IGF-1.

45 Ejemplos de factor de crecimiento condrogénico o mezclas de factores de crecimiento condrogénico particulares que se pueden incluir en medios de diferenciación condrogénica de acuerdo con la invención son: TGF-β1; TGF-β2; TGF-β3; TGF-β1 + TGF-β2 + TGF-β3; TGF-β1 + FGF-2; TGF-β1 + IGF-1; TGF-β1 + BMP-2; TGF-β1 + BMP-6; TGF-β2 + IGF-1; TGF-β3 + FGF-2; BMP-2; BMP-4; BMP-6; BMP-7; BMP-9; BMP-2 + BMP-9; TGF-β3 + BMP-6; TGF-β3 + BMP-2; TGF-β3 + BMP-6 + IGF-1; TGF-β1 + TGF-β3 + BMP-6 + IGF-1; BMP-2 + BMP-7; TGF-β3 + BMP-2 + BMP-4 + BMP-6 + BMP-7 + IGF-1; TGF-β2 + BMP-2 + BMP-6 + BMP-7.

50 En ciertas realizaciones, los medios de acuerdo con la invención generalmente comprenden también insulina, transferrina, ácido selenioso o ITS o ITS+ suplementos de cultivo universal (BD™).

II - Kits para la diferenciación condrogénica

55 La invención también se refiere a kits que consisten en al menos un factor de crecimiento condrogénico seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes β, proteínas morfogenéticas óseas y mezclas de los mismos, un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular preparado a partir de un exopolisacárido (EPS) nativo marino excretado por una bacteria marina mesófila de un entorno hidrotermal de aguas profundas, como se ha descrito anteriormente y un medio de cultivo celular líquido.

60 Ejemplos de medios de cultivo celular líquido comprenden generalmente un medio mínimo en el que las células pueden crecer, como por ejemplo, medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el medio F-12 de Ham o mezclas de los mismos, suplementado con al menos uno de los siguientes: glucosa, seroalbúmina bovina (BSA), BD™ ITS o ITS+ suplementos de cultivo universal, insulina, transferrina, ácido selenioso, ácido linoleico, hidrocortisona, fosfato inorgánico, ascorbato-2-fosfato, ascorbato, ascorbato de sodio, cloruro de calcio, tiroxina, prolina, piruvato, piruvato de sodio, hidroccloruro de piridoxina, glutamax, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, β-
 65

glicero fosfato, dexametasona. Ejemplos particulares de medios de cultivo celular adecuados se describen completamente en la revisión de Jennifer L. Puetzer (Tissue Engineering: Parte B, Volumen 16, Número 4,2010).

III - Diferenciación condrogénica

5 Se describen métodos *ex vivo* para inducir la diferenciación condrogénica en células pluripotentes o multipotentes, en los que los métodos comprenden una etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con la invención.

10 Se describen métodos *ex vivo* para obtener un tejido de cartílago, en los que los métodos comprenden una etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con la invención.

También se describe el tejido de cartílago obtenido mediante un método de este tipo.

15 También se describe el tejido de cartílago para su uso en métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal, en particular para uso en métodos de tratamiento de una enfermedad asociada con el daño del cartílago en el cuerpo humano o animal.

20 Un tratamiento de una enfermedad asociada con el daño del cartílago en un sujeto en necesidad del mismo, comprende una etapa de colocar en dicho sujeto un tejido de cartílago. La etapa de colocación de un tejido de cartílago tal en un sujeto puede llevarse a cabo mediante injerto.

25 Ejemplos de enfermedades asociadas con daño en el cartílago incluyen, pero no se limitan a, artrosis, ruptura traumática o desprendimiento de cartílago, osteocondritis, enfermedad degenerativa del disco (degeneración del disco intervertebral), policondritis recidivante.

30 La etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica líquido de la invención debe llevarse a cabo durante una duración de tiempo que permita la diferenciación condrogénica. Generalmente, el cultivo de células pluripotentes o multipotentes con el medio de la invención se lleva a cabo durante al menos 15 días, preferiblemente al menos 20 días, aún más preferiblemente al menos 25 días, lo más preferiblemente durante 28 días.

35 Si es necesario, el medio de diferenciación condrogénica líquido de la invención puede renovarse, en parte o totalmente, a intervalos regulares. Generalmente, el medio de diferenciación condrogénica de la invención se puede reemplazar con medio de diferenciación condrogénica fresco de la invención, cada 2-3 días, durante 28 días.

40 El cultivo de células madre humanas en el medio de diferenciación condrogénica líquido se puede realizar mediante el uso de un sistema de cultivo tridimensional. Para la obtención de tejidos de cartílago se prefieren particularmente los sistemas de cultivo tridimensionales. Ejemplos de sistemas de cultivo tridimensionales son gránulos micromasa, cultivos celulares de alta densidad, así como cultivos tridimensionales en biomateriales, totalmente descritos por Vinatier C. et al. en Trends Biotechnol 2009, 27 (5): p.307-14.

45 Las células pluripotentes o multipotentes pueden ser células pluripotentes o multipotentes humanas.

Las células pluripotentes o multipotentes pueden ser células pluripotentes o multipotentes de mamíferos no humanos.

50 Las células pluripotentes o multipotentes pueden ser células madre.

Las células pluripotentes o multipotentes pueden ser células madre multipotentes, en particular células madre mesenquimales humanas. Las células madre mesenquimales humanas normalmente se aíslan de médula ósea, tejido adiposo, membrana sinovial, sangre del cordón umbilical, músculo, periostio o placenta. Las células madre mesenquimales humanas pueden ser células madre derivadas de tejido adiposo humano (hATSC).

55 Las células pluripotentes o multipotentes pueden ser células pluripotentes, en particular células madre embrionarias.

Las células pluripotentes pueden ser células madre embrionarias humanas (células HES). Generalmente, se pueden emplear líneas celulares hES tales como las descritas en la tabla siguiente:

60

línea	cariotipo	pase disponible	país de origen	origen
SA01	46XY	25	Suecia	Cellartis AB
VUB01	46XY	73	Bélgica	AZ-VUB Bruxel
HUES 24	46XY	26	Estados Unidos	Harvard

línea	cariotipo	pase disponible	país de origen	origen
H1	46XY, 20q11.21	26	Estados Unidos	Wicell research Institute
H9	46XX	27	Estados Unidos	Wicell research Institute
WT3	46XY	35	Reino Unido	UKSCB

Las células pluripotentes pueden ser células madre embrionarias no humanas, tales como células madre de ratón.

Las células pluripotentes pueden ser células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células madre pluripotentes inducidas (células iPS) son un tipo de células madre pluripotentes obtenidas artificialmente a partir de una célula no pluripotente, generalmente una célula somática adulta, mediante la inducción de una expresión “forzada” de ciertos genes. Las células iPS se produjeron por primera vez en 2006 a partir de células de ratón (Takahashi et al. Cell 2006 126: 663-76) y en 2007 a partir de células humanas (Takahashi et al. Cell 2007 131-861-72, Yu et al. Science 2007 318:1917).

Otros aspectos y ventajas de esta invención se divulgarán en las siguientes figuras y ejemplos, que deben considerarse como ilustrativos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Estructura de la unidad de repetición no sacarídica GY785 DR. GY785 DR está sulfatado de forma natural en la posición C2 del residuo de ácido galacturónico en azul. GY785 DRS es una forma químicamente sobresulfatada de GY785 DR. Las posibles posiciones para grupos sulfato adicionales (SO₃Na) se indican mediante flechas.

Figura 2: Viabilidad y proliferación de ATSC humanas. ATSC humanas se cultivaron en presencia de GY785 DR (A y C), GY785 DRS (B y D) a las concentraciones indicadas de actinomicina D (5 µg/ml) durante 72 horas. La viabilidad (A y B) se evaluó por medición de la actividad MTS y se expresa como la actividad de MTS relativa en comparación con el control no tratado. La proliferación (C y D) se estimó por recuento de células viables después de la tinción con exclusión de azul de tripano. *P<0,05 en comparación con la condición de control (0 µg/ml de polisacárido).

Figura 3: Caracterización histológica de gránulos de hATSC. ATSC humanos se cultivaron en gránulos en la presencia de medio control (CT) o condrogénico (CH) suplementado o no con 50 µg/ml de GY785 DR o GY785 DRS durante 28 días. Los volúmenes de gránulos se calcularon equiparando estas entidades a elipsoides. *P<0,05 en comparación con la condición de control (0 µg/ml de polisacárido). La producción de GAG se evaluó macroscópicamente después de la tinción con azul alcian de los gránulos completos. Barra: 500 µm.

Figura 4: Análisis de los niveles de expresión de marcadores condrogénicos. Gránulos ATSC humanos se cultivaron en la presencia de medio control (CT) o condrogénico (CH) suplementado o no con 50 µg/ml de GY785 DR o GY785 DRS durante 28 días. La expresión de los marcadores condrogénicos *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9* y *COMP* fue analizada por PCR en tiempo real. Los resultados se expresan como el nivel de expresión relativa en comparación con el medio condrogénico en ausencia de polisacárido. *p<0,05 en comparación con el medio condrogénico (CH). # p<0,05 en comparación con medio condrogénico suplementado con GY785 DR.

Ejemplos

Materiales y métodos

Materiales

Se adquirieron artículos de plástico para cultivo celular de Corning-Costar BV LifeSciences (Schiphol-Rijk, Holanda). Solución salina equilibrada de Hank (HBSS), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (4,5 g/l), medio esencial mínimo alfa (αMEM), solución salina tamponada con fosfato (PBS), penicilina/estreptomina, tripsina/EDTA (0,05 %/0,53 mM), L-glutamina, kit superscript III, NuPAGE™ 4 % -12 % Bis-Tris gel, PVDF (difluoruro de polivinilideno). Las membranas Invitrolon se obtuvieron de Invitrogen Corporation (Paisley, Reino Unido). Los reactivos MTS eran de Promega (Charbonnières, Francia). La colagenasa tipo I A en bruto, el tampón de lisis celular de eritrocitos, el azul de tripano, el L-ascorbato sódico, el suplemento de medios IT, la dexametasona, el azul alcian y la anisomicina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Brilliant® SYBR® Green Master Mix se obtuvo de Stratagene Europa (Amsterdam Zuidoost, Holanda). Los cebadores de PCR se sintetizaron por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). El suero de ternera fetal (FCS) se adquirió de Dominique Dutscher (Brumath, Francia). El TGF-β1 se obtuvo de PeproTech Inc. (Londres, Reino Unido). El kit micro RNeasy fue adquirido de Qiagen y la ADNasa turbo de Ambion Inc. ambos distribuidos por Applied Biosystem (Courtaboeuf, Francia). El contenido de proteína se determinó utilizando el ensayo de Pierce Coomassie Plus (Pierce, Rockford, IL). El anti fosfo-SMAD 2 (3101) de conejo, fosfo ERK1/2 (9101), fosfo-JNK 1/2 (9251), fosfo-p38 (9211), SMAD 2 (3102), ERK1/2 (9102) y los anticuerpos anti-IgG de conejo de cabra unidos a HRP (7074) se adquirieron de Cell Signaling Inc. (Beverly, MA). El sistema de detección de transferencia Western se obtuvo de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de proveedores de laboratorio

estándar y eran de la más alta pureza disponible.

Producción, purificación y caracterización de GY785 DR y polisacárido GY785 DRS

5 Los dos polisacáridos de bajo peso molecular GY785 y GY785 DR DRS se derivaron de GY785, un exopolisacárido de alto peso molecular ($1,5 \times 10^6$ Da) producida por una bacteria: *Alteromonas infernus*, aislada de una muestra de líquido recogida en la proximidad de una fuente hidrotermal activa. El procedimiento de aislamiento y caracterización de la cepa de *Alteromonas infernus* han sido previamente descritos por Raguenes et al. (Raguenes GH et al. J Appl Microbiol. 1997; 82: 422-430). El polisacárido nativo puede someterse a una despolimerización radical para obtener
10 GY785 DR. A continuación, el GY785 DR puede ser químicamente sobre-sulfatado para obtener el GY785 DRS como se describe en otro lugar (Guezennec J et al. Carbohydrate Polymers. 1998; 37:19-24). GY785 DR y GY785 DRS son fracciones homogéneas con una masa molecular promedio de 15 kDa y 20 kDa y 10 % y 45 % de grupos sulfato, como se determina por cromatografía analítica de alto rendimiento de exclusión por tamaño y análisis elemental, respectivamente (Figura 1) (Collicie Jouault S et al. Biochim Biophys Acta. 2001; 1528: 141-151).

Cultivo de células

Las células del estroma de tejido adiposo humano (hATSC) se aislaron mediante digestión con colagenasa de lipoaspirados obtenidos a partir de 3 pacientes diferentes sometidos a liposucción y que habían dado su consentimiento informado. Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética nacional francés. Brevemente y como se ha descrito previamente (Estes BT et al. Nat Protoc. 2010; 5:1294-1311; Merceron C et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2010; 298:355-364), los lipoaspirados se lavaron extensamente con HBSS para eliminar los residuos. Los lipoaspirados lavados se trataron con colagenasa (0,025 %) en HBSS durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. El tratamiento con colagenasa se inactivó mediante la adición de un volumen igual de DMEM de alto contenido de glucosa que contiene 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de L-glutamina y 10 % de FCS (medio de control). El producto digerido se centrifugó a 250 x g durante 5 min para separar los adipocitos de las células del estroma. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en el medio de control y se filtró a través de un filtro de malla de nylon de 70 µm. El filtrado se centrifugó y las células se resuspendieron en tampón de lisis de eritrocitos. La reacción de lisis se detuvo mediante la adición de medio de control. La suspensión se centrifugó y las células se resuspendieron finalmente en medio de control y se sembraron a razón de 5×10^4 células/cm² en matraces de cultivo de 75 cm². Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO₂ y 95 % de aire y el medio de control se sustituyó 24 horas después de la siembra para eliminar las células no adherentes. A partir de ese momento, el medio de control se renovó cada 2-3 días. Para evitar la diferenciación espontánea, los cultivos primarios de hATSC se cultivaron hasta un 90 % de confluencia y después se extrajeron del matraz de cultivo de células utilizando tripsina/EDTA y se sembraron a razón de 10^4 células/cm². Para todos los experimentos posteriores se usó las hATSC en el pase 2. Las ATSC humanas aisladas utilizando el protocolo descrito anteriormente se han caracterizado ampliamente en nuestro laboratorio (para más detalles véase Merceron C et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2010; 298: 355-364 y Merceron C et al. The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous
40 transplantation with an injectable hydrogel, Cell Transplant. 2011 Feb 3, publicación electrónica previa a la publicación impresa).

Viabilidad y proliferación

45 La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo MTS como se describe previamente (Vinatier C et al. Biomaterials. 2005; 26: 6643-6651). Las hATSC se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/cm² y se cultivaron en medio de control en la ausencia o presencia de 25, 50, 75 y 100 µg/ml de GY785 DR o GY785 DRS durante 72 horas. Como control negativo, las células se cultivaron en presencia de actinomicina D (5 µg/ml) un conocido inductor de la muerte celular (Vinatier C et al. Biomaterials. 2005; 26:6643-6651). Brevemente, el medio de cultivo se retiró y se reemplazó por medio fresco que contenía reactivos de MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como la actividad MTS relativa en comparación con la condición de control (células cultivadas en ausencia de polisacárido).

Para correlacionar la actividad MTS con la proliferación celular, también se estimó el número de células viables. Como se ha descrito anteriormente, las células se trataron con tripsina/EDTA después de 72 h de cultivo y se contaron usando tinción de exclusión con azul de tripano (Merceron C et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2010; 298:355-364; Vinatier C et al. Biomaterials. 2005; 26: 6643-6651). Los resultados se expresaron como el número total de células viables/cm² en comparación con la condición de control (células cultivadas en ausencia de polisacárido).

Diferenciación condrogénica

Para la diferenciación condrogénica *in vitro* de hATSC, se colocaron 5×10^5 células en un tubo de polipropileno de 15 ml que contenía 1 ml de medio de control, como se ha descrito previamente (Merceron C et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2010; 298:355-364). Después se centrifugaron durante 5 min a 250 x g. Los tubos estaban equipados con tapas de ventilación para permitir el intercambio de gases y los sedimentos celulares se conservaron a 37 °C en una

atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO₂ y 95 % de aire. Después de 24 horas, los pellets de hATSC se dividieron en 6 grupos experimentales y se cultivaron en presencia de medio control (CT) o medio condrogénico (CH) solo o suplementado con GY785 DR o GY785 DRS. El medio condrogénico se componía de medio de control sin suero suplementado con 6,25 µg/ml de insulina, 6,25 µg/ml de transferrina, 6,25 ng/ml de selenito sódico (ITS), L-ascorbato sódico 50 nM, dexametasona 10⁻⁸M y 10 ng/ml de TGF-β1 (Merceron C et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2010; 298:355-364; Merceron C et al. The effect of two and three dimensional cell Culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel, Cell Transplant. 2011 Feb 3., publicación electrónica previa a la publicación impresa). Los medios de cultivo se cambiaron cada 2-3 días durante 28 días. Los sedimentos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada (5 % de CO₂ y 95 % de aire).

Caracterización de pellets de ATSC humanas

Para la medición del volumen de gránulos, los gránulos se consideran como entidades de elipsoide escaleno. Sus volúmenes se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del elipsoide escaleno} = \frac{4}{3} \pi a b c$$

donde a, b y c representan el radio del eje largo en cada plano espacial.

Para el análisis del aspecto macroscópico de los gránulos, se analizó la producción de GAG sulfatados en gránulos enteros de 28 días por tinción con azul alcian. Los sedimentos se lavaron con PBS enfriado en hielo y se fijaron durante 20 minutos en etanol 100 %. Los sedimentos se tiñeron a continuación a temperatura ambiente con solución de azul alcian 0,1 % en HCl 0,1 M. Después de la incubación durante la noche, la solución se desechó y los gránulos se lavaron con HCl 0,1 M para eliminar la tinción inespecífica. Se obtuvieron fotografías con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6, Wetzlar, Alemania).

Para el análisis histológico, los gránulos de hATSC de 28 días se fijaron en formalina 10 % y se embebieron en parafina. Los cortes de parafina (5 µm de espesor) se desparafinizaron utilizando tolueno, se rehidrataron mediante una serie graduada de etanol y se enjuagaron en agua destilada. Los cortes de tejido se tiñeron con hematoxilina-eosina-azafrán (HES) y azul alcian como se ha descrito previamente (Merceron C et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2010; 298: 355-364). Los cortes se visualizaron a continuación utilizando un microscopio óptico (Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Alemania). El azul alcian revela la presencia de un GAG que contiene la matriz cartilaginosa y la HES tiñe de púrpura el núcleo, el citoplasma de rosa y las fibras de colágeno de amarillo.

Análisis del transcrito

El ARN total de los gránulos de 28 días de hATSC se extrajo usando el kit RNeasy micro de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la digestión con ADNasa, el ARN se cuantificó usando un espectrofotómetro UV (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, Francia) y se determinó la calidad con el sistema Agilent Bioanalyser 2100 (Waldbronn, Alemania). Se realizó la transcripción inversa de 500 ng de RNA por muestra usando el kit supercript III en un volumen total de 30 µl. El ADN complementario (ADNc) se amplificó en un volumen total de 25 µl de una mezcla de reacción para PCR que contiene 12,5 µl de Brilliant® SYBR® Green Master Mix (1X) y 30 nM de tinte verde de referencia SYBR. La secuencia y la concentración de cada conjunto de cebadores se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de pares de cebadores, números de acceso al banco de genes utilizados para análisis por RT-PCR en tiempo real y tamaño de los productos de PCR.

Gen	Número de acceso al banco de genes	Secuencia	Pares de bases (pb)
<i>β-ACTIN</i>	NM_001101	Fwd 5'- CCAACCGCGAGAAGATGA -3' Rev 5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'	97
<i>Cadena α1 del colágeno tipo II (COL2A1)</i>	NM_001844	Fwd 5'- TGTCAGGGCCAGGATGTC -3' Rev 5'- ATCATTATACCTCTGCCCATCC -3'	63

Gen	Número de acceso al banco de genes	Secuencia	Pares de bases (pb)
<i>Agrecano (ACAN)</i>	NM_001135	Fwd 5'- CCTCCCCTTCACGTGTA AAA - 3' Rev 5'- GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC - 3'	64
<i>Región determinante del sexo en Y – caja 9 (SOX9)</i>	NM_000346	Fwd 5'- GTACCCGCACTTGCAACAAC -3' Rev 5'- TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC -3'	72
<i>Proteína de la matriz oligomérica del cartilago (COMP)</i>	NM_000095	Fwd 5'- GCACCGACGTCAACGAGT -3' Rev 5'- TGGTGTGATACAGCGGACT - 3'	63

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real MX3000P® (Stratagene) en las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 30 s a 72 °C. La eficiencia y la especificidad de cada conjunto de cebadores se confirmó con curvas patrón de los valores del umbral de ciclo (Ct) frente a la dilución en serie del ARN total y la evaluación del perfil de fusión. Los umbrales de ciclo se normalizaron a beta-actina para controlar las diferencias de cuantificación del ADNc. Los resultados se presentaron como los niveles de expresión relativa en comparación con las células cultivadas en presencia de medio condrogénico.

10 **Resonancia de plasmones superficiales**

Los experimentos se realizaron en un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). El TGF-β1 y la insulina se inmovilizaron covalentemente en la matriz de dextrano de un chip sensor CM5 (Biacore) según lo recomendado por el fabricante a un caudal de 5 µl/min. El ensayo de unión de GY785 DR (1,5, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µg/ml) y GY785 DRS (0,0312, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µg/ml) se llevaron a cabo en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,15 M y tensioactivo P20 0,005 % (tampón HBS-P, Biacore) y la disociación se controló durante 15 minutos. La regeneración se consiguió con NaOH (4,5 mmol/l) después de cada ciclo. Los sensogramas resultantes se ajustaron utilizando el software BiaEval 4.1 (Biacore). Para los cálculos de la K_d se utilizaron los siguientes pesos moleculares: GY785 DR: 15.000 g/mol y GY785 DRS: 20.000 g/mol.

10 **Transferencia Western**

Las hATSC confluentes se cultivaron en la presencia de TGF-β1 (10 ng/ml) solo o en combinación con GY785 DR o GY785 DRS (50 µg/ml) en medio de control que contiene niveles séricos bajos (0,5 %) para los períodos de 1, 4, 8 y 24 horas. Para cada punto de tiempo, las células se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Para la transferencia Western, las células se descongelaron en hielo y se lisaron mediante la adición de un tampón RIPA (Tris HCl 20 mM, pH 7,5, cloruro potásico 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, β-glicerofosfato 20 mM, Na₃VO₄ 2 mM, PMSF 1 mM y NaF 1 mM). La concentración de proteína de los lisados de células se determinó con un ensayo de proteínas de Pierce Coomassie-Plus. Se resolvieron 30 µg de proteína total mediante geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF siguiendo el protocolo del fabricante. Las membranas se bloquearon y se ensayaron en leche en polvo no grasa al 5 % en PBS/Tween20. Los anticuerpos primarios se diluyeron 1/1000 y se detectaron usando anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra conjugados con HRP diluidos 1/2000 en leche en polvo no grasa 5 % en PBS/Tween20. Las transferencias se visualizaron mediante el desarrollo de quimioluminiscencia potenciada (ECL) usando un sistema de detección de transferencia Western.

Como control positivo para SMAD y activación de la MAP quinasa, células MC3T3-E1 osteoblásticas confluentes se dejaron sin adición de suero durante la noche y se trataron durante 15 minutos con anisomicina (5 µg/ml), TGF-β1 (10 ng/ml) o fosfato inorgánico (Pi; 10 mM) como se ha descrito previamente (Julien M et al. J Bone Miner Res. 2009; 24: 1856-68).

10 **Análisis estadístico**

Cada experimento se repitió al menos 3 veces con resultados similares. Los resultados se expresan como la media ± EEM de determinaciones por triplicado. Los estudios comparativos de las medias se realizaron utilizando ANOVA unidireccional seguido de una prueba post hoc (diferencia significativa mínima proyectada de Fisher) con una significación estadística de p<0,05.

Resultados

Viabilidad y proliferación de hATSC cultivadas en presencia de polisacáridos

5 Para examinar la viabilidad y la proliferación de las hATSC cultivadas en presencia de 0, 25, 50, 75 y 100 µg/ml de GY785 DR o GY785 DRS, se midió la actividad MTS y las células se enumeraron usando tinción de exclusión azul de tripano después de 72 horas. Como control negativo, las células se cultivaron en presencia de actinomicina D (5 µg/ml). Cuando se trató con actinomicina D, la actividad MTS y la proliferación de hATSC se redujeron significativamente en casi un 90 %. A la concentración de 50 µg/ml, GY785 DR indujo un ligero pero significativo incremento en la actividad MTS (Figura 2A). Se observó que GY785 DRS desencadenaba un aumento dependiente de la dosis en la actividad MTS, con un máximo a 50 µg/ml (Figura 2B). En cuanto a la proliferación de hATSC, GY785 DR no provocó ningún efecto beneficioso (Figura 2C), mientras que, la forma sulfatada de la molécula (GY785 DRS) a 50 y 75 µg/ml aumentó significativamente la proliferación de hATSC en comparación con la condición de control (Figura 2D).

15 Estos resultados indican que GY785 DR y GY785 DRS tienen solo un efecto leve pero significativo sobre la viabilidad y proliferación de hATSC. En todos los experimentos posteriores, GY785 DR y GY785 DRS se utilizaron a una dosis de 50 µg/ml.

Diferenciación condrogénica de hATSC cultivadas en presencia de polisacáridos

20 Las hATSC se cultivaron en gránulos tridimensionales en presencia de medio control (CT) o condrogénico (CH) suplementado con 50 µg/ml de GY785 DR o GY785 DRS durante 28 días. La diferenciación condrogénica se evaluó mediante una medición del volumen de gránulos y mediante la producción de una matriz cartilaginosa que contiene GAG usando tinción con azul alcian (Figura 3).

30 Sorprendentemente, la estimación del volumen reveló que los gránulos expuestos a GY785 DRS en combinación con el medio condrogénico sufren un aumento masivo en casi 8 veces (Figura 3 panel superior). Además de poner de relieve las diferencias en cuanto a la producción de GAG entre las diferentes condiciones, se observó el aspecto macroscópico de los gránulos después de la tinción con azul alcian. La tinción con azul alcian reveló que en presencia de medio condrogénico y con independencia de la suplementación con polisacáridos, la producción de GAG estaba regulada al alza como se evidencia por el color azul oscuro intenso (Figura 3 panel inferior).

35 Para caracterizar mejor la diferenciación condrogénica, la morfología celular y la composición de la matriz de las hATSC a continuación se examinaron histológicamente los cortes de los gránulos por HES y tinción con azul alcian. En presencia de un medio de control (CT), la tinción HES permite distinguir núcleos de células (púrpura) y el citoplasma (rosa), pero no pone de manifiesto una organización particular de las células. Por el contrario, en presencia de medio condrogénico (CH), suplementado o no con polisacárido, la tinción HES puso de manifiesto una organización estructural particular de las células dentro del gránulo. En la zona externa, las células están orientadas tangencialmente a la superficie del gránulo y en la parte más interna, las células parecen estar dispuestas radialmente. Además, en presencia de medio condrogénico, es visible un anillo de color amarillo-naranja, indicativo de la síntesis de fibras de colágeno dentro de la matriz. La tinción con azul alcian no reveló la presencia de GAG sulfatado dentro de la matriz de los gránulos cultivados en medio de control. Curiosamente, en la presencia de medio condrogénico, los cortes de gránulos eran fuertemente positivos para la detección de GAG sulfatado, especialmente en presencia de medio condrogénico suplementado con polisacárido GY785 DRS, donde se puede observar una tinción azul oscura más densa.

50 Para confirmar el aspecto de tipo cartilago de los gránulos de hATSC evidenciado por las observaciones histológicas de los presentes inventores, se determinó la expresión relativa de *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9* y *COMP* por PCR en tiempo real (Figura 4). Los datos obtenidos indican que en presencia de medio de control (CT) suplementado o no con polisacárido, los transcritos que codifican para los diferentes marcadores de condrocitos no se pudieron detectar (ND) o se mantuvieron en niveles apenas detectables. Para cada transcrito analizado, el nivel de expresión fue significativamente mayor en presencia de medio condrogénico en comparación con el medio de control. Hay que señalar que GY785 DRS utilizado en combinación con medio condrogénico indujo un marcado aumento en los niveles de expresión de los 4 marcadores condrogénicos en comparación con GY785 DR. GY785 DR, no produjo efecto aditivo o sinérgico con el medio condrogénico.

60 En conjunto, estos resultados muestran que GY785 DRS potencia la diferenciación condrogénica de hATSC cuando se utiliza concomitantemente con medio condrogénico.

Interacciones entre los polisacáridos GY785 DR o GY785 DRS con TGF-β1/insulina de medio condrogénico

65 Para abordar más a fondo si GY785 DRS puede estimular la diferenciación condrogénica de hATSC, se realizaron varios experimentos de resonancia de plasmones superficiales. El medio condrogénico utilizado contenía 2 componentes principales: TGF-β1 (Awad HA et al. Tissue Eng. 2003;9: 1301-1312; Puetzer JL et al. Tissue Eng Part B Rev. 2010;16:435-444) e insulina (Malafaya PB et al. Tissue Eng Part A. 2010; 16:735-747; Wang CY et al.

Apoptosis. 2010;15:439-449) que son conocidos por impulsar la diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales. Para investigar si el TGF- β 1 y la insulina pueden interactuar específicamente con GY785 DR o GY785 DRS, se realizaron las mediciones cuantitativas de su potencial de interacción física mediante análisis Biacore. El TGF- β y la insulina se inmovilizaron sobre el chip y se inyectaron concentraciones crecientes de polisacáridos GY785 DR y GY785 DRS sobre la superficie del chip. Se registraron los resultados expresados en unidades de respuesta para cada concentración de analito en la forma de sensograma y se calculó la constante de disociación (K_d). Los polisacáridos GY785 DR y GY785 DRS eran capaces de unirse al TGF- β inmovilizado. La afinidad de unión de GY785 DR por TGF- β es aproximadamente cien veces menor que la del polisacárido GY785 DRS con una K_d de $3,45 \cdot 10^{-8}$ y $5,5 \cdot 10^{-10}$ M respectivamente. No se observó ninguna modificación de los parámetros cinéticos de la interacción entre GY785 DR o GY785 DRS en la unión de la insulina inmovilizada (los datos que muestran un sensograma plano no se muestran). Estos resultados indican que GY785 DRS puede unir TGF- β 1 con mayor afinidad que GY785 DR y ninguno de ellos interactúa con la insulina.

Efectos de GY785 DRS sobre la vía de señalización de TGF β 1.

TGF- β 1 es conocido por activar varias vías de señalización, incluyendo SMAD 2 (Massague J. et al. Genes Dev. 2000; 14: 627-644). Por lo tanto, para abordar si la interacción GY785 DRS/TGF- β 1 puesta de manifiesto por la resonancia de plasmón superficial puede conducir a la activación específica de los eventos celulares en hATSC, se determinó el potencial de regulación al alza de la activación de SMAD 2 dependiente de TGF- β en las hATSC. Con este fin, las hATSC se expusieron a 10 ng/ml de TGF- β 1 y 50 μ g/ml de GY785 DRS solo o concomitantemente durante 1, 4, 8 y 24 horas. Las células MC3T3-E1 se utilizaron como controles positivos. Las células se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido antes de la lisis a 4 °C. Las muestras resultantes se analizaron por transferencia Western usando anticuerpos específicos contra P-SMAD 2, P-ERK1/2, P-JNK1/2 y P-p38 y/o anticuerpos contra SMAD 2 y ERK1/2. Las inmunotransferencias de los lisados de células indicaban que el TGF- β 1 solo o en asociación con el polisacárido GY785 DRS inducía la fosforilación de SMAD 2 tan solo al cabo de 1 hora y hasta 24 horas después. La presencia del polisacárido sulfatado por sí sola no es suficiente para promover la activación de SMAD 2, no pudiéndose detectar ningún efecto aditivo o sinérgico de GY785 DRS y TGF- β 1 sobre la fosforilación de SMAD 2. Dado que las vías de señalización de la MAP quinasa, incluyendo ERK, JNK y p38, han sido en muchas ocasiones relacionadas con la diferenciación condrogénica dependiente del TGF- β (Derynck R et al. Nature. 2003;425:577-584; Arita NA et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011), los presentes inventores trataron de descifrar si MAPK puede ser activado en respuesta al tratamiento con TGF- β 1 y GY785 DRS.

Es de particular interés que mientras que la fosforilación de ERK 1/2 apenas fue estimulada por TGF- β 1 o GY785 DRS por separado, el tratamiento concomitante de las células con TGF- β 1 y GY785 DRS indujo una marcada regulación al alza de la fosforilación de ERK 1/2 tan solo a las 4 horas. Esta estimulación se mantuvo hasta 24 horas después. El análisis de la fosforilación de la otra MAPK no mostró fosforilación detectable ni de JNK ni de p38 en respuesta al tratamiento con TGF- β 1 y GY785 DRS solo o combinado.

Para garantizar la fiabilidad de nuestro método de detección de la fosforilación de SMAD 2, ERK1/2, JNK y p38, las células MC3T3-E1 fueron tratadas con anisomicina, Pi y TGF- β 1 y se utilizaron como un control positivo. Como se esperaba, en estas condiciones, se observó la fosforilación de p38 y JNK1/2 después del tratamiento con anisomicina (Julien M et al. J Bone Miner Res. 2009; 24:1856-68), se observó la fosforilación de ERK1/2 después de la estimulación con Pi (Julien M et al. J Bone Miner Res. 2009; 24:1856-68) y se observó la fosforilación de SMAD 2 en presencia de TGF- β 1 (Lai CF et al. J Biol Chem. 2000; 275:36400-36406). La fosforilación de las diversas SMAD y MAPK no se asoció con cambios en sus niveles basales, lo que sugiere que su fosforilación tuvo como resultado la estimulación de las quinastas reguladoras de etapas anteriores.

Estos datos sugieren que el TGF- β 1 y GY785 DRS pueden actuar concomitantemente de una manera sinérgica para estimular la activación de la MAP quinasa ERK 1/2 en hATSC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER)

<120> MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA Y MÉTODOS PARA INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA DE CÉLULAS

<130>BEP110081EP

<160> 10

<170> Patentin versión 3.5

<210> 1

<211> 18

ES 2 590 752 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 1
ccaaccgcca gaagatga 18

10 <210>2
<211>20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 2
ccagaggcgt acaggatag 20

20 <210>3
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 3
tgtcagggcc aggatgtc 18

30 <210>4
<211>22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 4
atcattatac ctctgcccat cc 22

40 <210>5
<211>20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador

50 <400> 5
cctccccttc acgtgtaaaa 20

<210>6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador

<400> 6
gctccgcttc tgtagtctgc 20

60 <210>7
<211> 19

ES 2 590 752 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 7
gtacccgcac ttgcacaac 19

10 <210>8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 8
tcgctctcgt tcagaagtct c 21

20 <210>9
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 9
gcaccgacgt caacgagt 18

30 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador

40 <400> 10
tgggttgat acagcggact 20

REIVINDICACIONES

1. Un medio de diferenciación condrogénica líquido que comprende:

- 5 - al menos un factor de crecimiento condrogénico seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes β , proteínas morfogenéticas óseas y mezclas de los mismos y
 - un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular preparado a partir de un exopolisacárido (EPS) nativo marino excretado por una bacteria marina mesófila de un ambiente hidrotermal de aguas profundas,

10 en el que dicho EPS sulfatado de bajo peso molecular se puede obtener mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

- 15 (a) una etapa que consiste en la despolimerización por radicales libres de dicho EPS nativo a fin de obtener un EPS despolimerizado que tiene un peso molecular de 5.000 a 100.000 g/mol,
 (b) una etapa subsiguiente que consiste en la sulfatación del EPS despolimerizado, que comprende la adición al EPS despolimerizado de al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener un polisacárido sulfatado que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato entre 10 % y 45 % en peso con respecto al peso total del polisacárido sulfatado.

20 2. El medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polisacárido sulfatado de bajo peso molecular:

- tiene un peso molecular de 5.000 a 60.000 g/mol, de 5.000 a 50.000 g/mol, de 5.000 a 40.000 g/mol, de 5.000 a 30.000 g/mol o de 10.000 a 25.000 g/mol y
 25 - tiene un índice de polidispersidad de menos de 5, en particular de 1,5 a 4, más particularmente de menos de 2.

3. El medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha bacteria marina mesófila se selecciona del grupo que consiste en bacterias del género *Alteromonas*, del género *Pseudoalteromonas* y del género *Vibrio*.

30 4. El medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha bacteria marina mesófila es la cepa GY785 del género *Alteromonas*.

35 5. El medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho medio comprende de 5 $\mu\text{g/ml}$ a 200 $\mu\text{g/ml}$, particularmente de 25 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, más particularmente de 25 $\mu\text{g/ml}$ a 75 $\mu\text{g/ml}$, lo más particularmente 50 $\mu\text{g/ml}$ de dicho polisacárido sulfatado de bajo peso molecular.

40 6. El medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho al menos un factor de crecimiento condrogénico se selecciona del grupo que consiste en TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 y mezclas de los mismos.

45 7. El medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho medio comprende además un factor de crecimiento de fibroblastos y/o un factor de crecimiento similar a la insulina, en particular, IGF-1.

8. Un kit que consiste en:

- 50 - al menos un factor de crecimiento condrogénico seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes β , proteínas morfogenéticas óseas y mezclas de los mismos y
 - un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular preparado a partir de un exopolisacárido (EPS) nativo marino excretado por una bacteria marina mesófila de un ambiente hidrotermal de aguas profundas y
 - un medio de cultivo celular líquido,

55 en el que dicho polisacárido sulfatado de bajo peso molecular es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

9. Un método para inducir la diferenciación condrogénica en células pluripotentes o multipotentes, en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

60 10. Un método para obtener un tejido de cartílago, en el que dicho método comprende la etapa de cultivar células pluripotentes o multipotentes con un medio de diferenciación condrogénica líquido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

65 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que dichas células son células madre mesenquimales humanas, en particular células madre derivadas de tejido adiposo humano (hATSC).

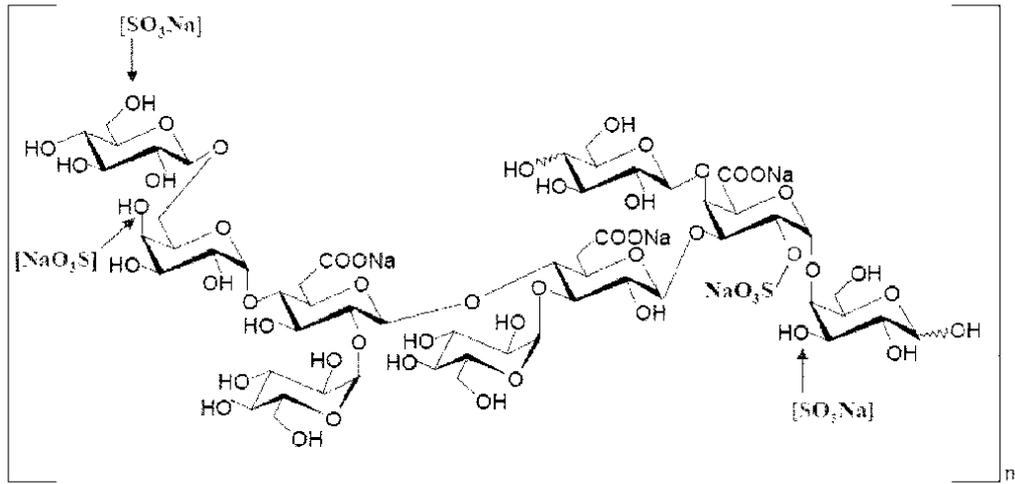


FIGURA 1

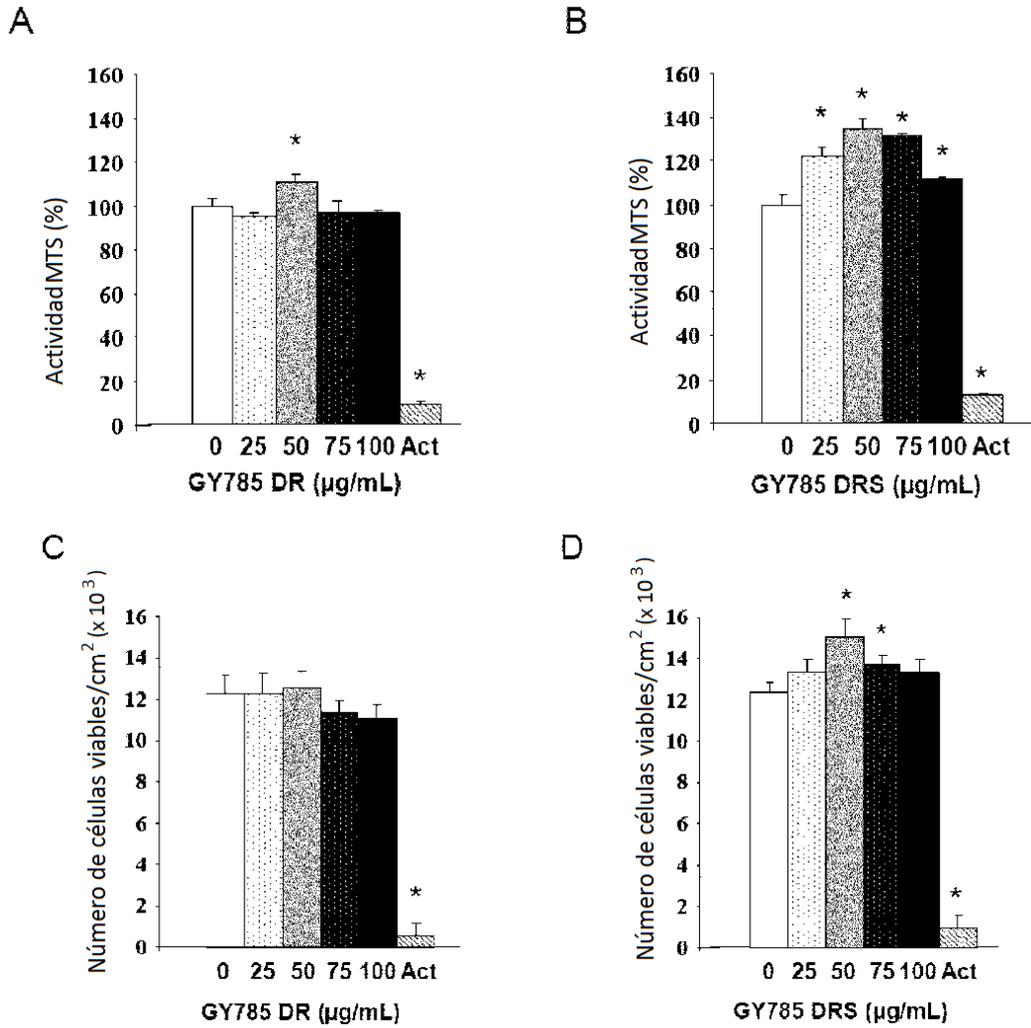


FIGURA 2

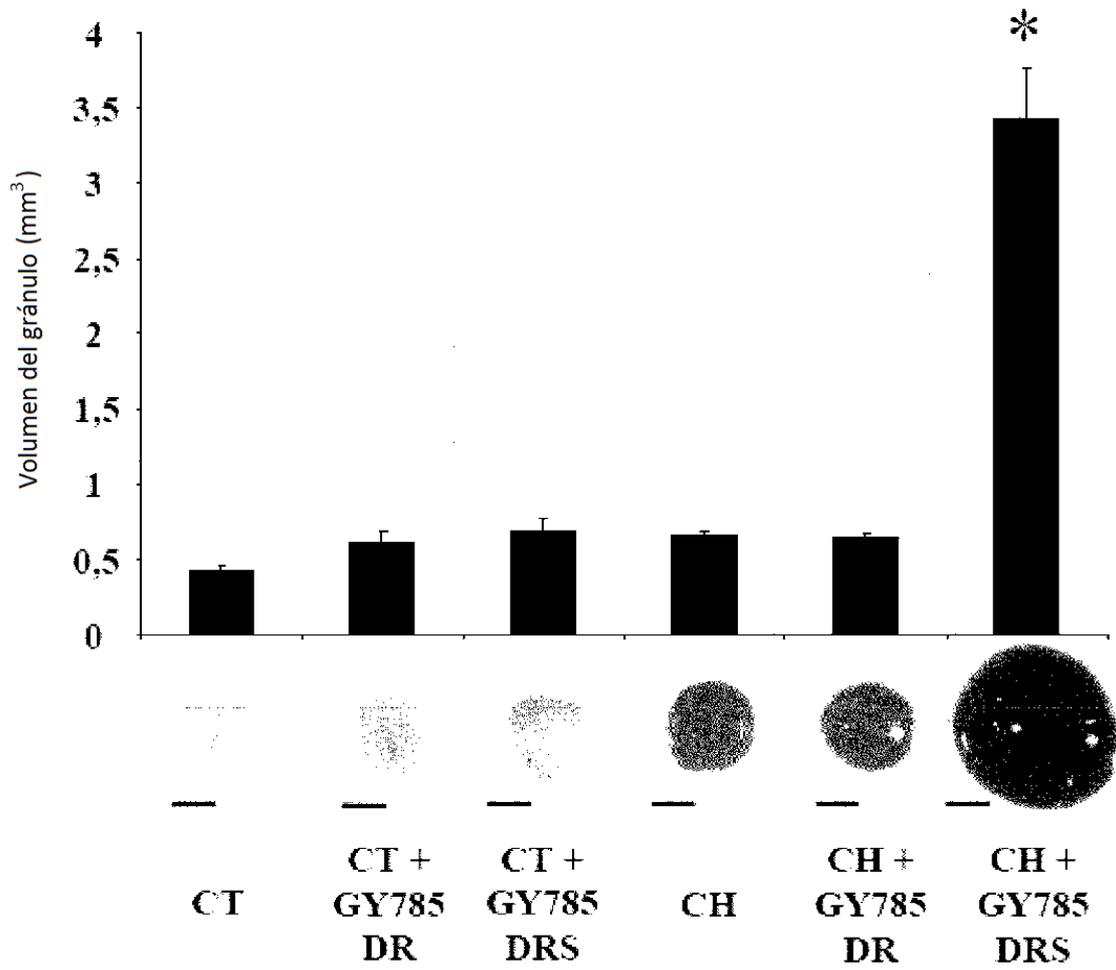


FIGURA 3

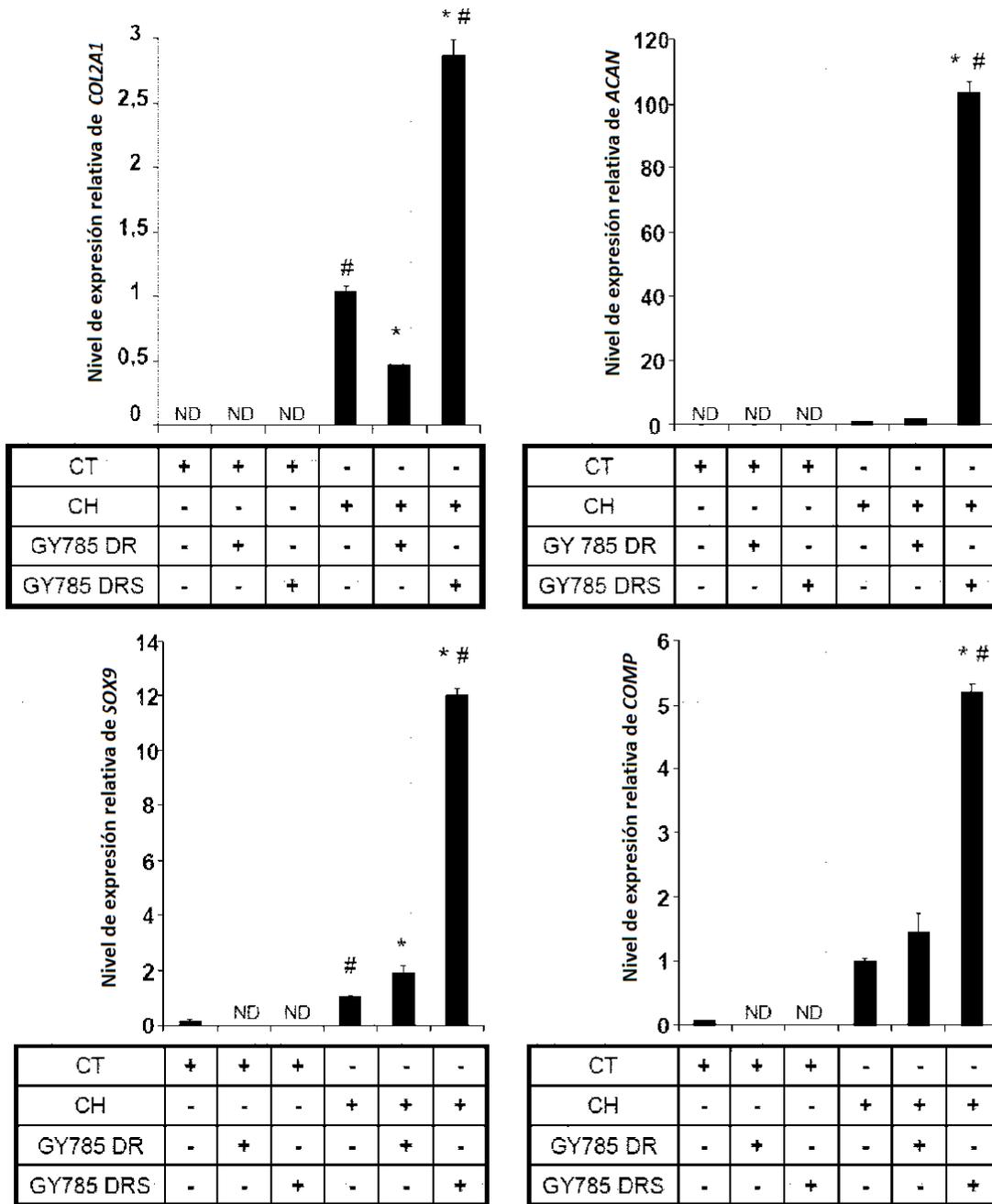


FIGURA 4