

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 944**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

**A01N 1/00** (2006.01)

**A61K 35/32** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2008 PCT/AU2008/001795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09070842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2008 E 08858097 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2229436**

54 Título: **Protección de células progenitoras y regulación de su diferenciación**

30 Prioridad:

**04.12.2007 AU 2007906607**

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

**27.12.2017**

73 Titular/es:

**PROTEOBIOACTIVES PTY LTD (100.0%)  
27/9 POWELLS ROAD  
BROOKVALE, NSW 2100, AU**

72 Inventor/es:

**GHOSH, PETER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 647 944 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

Protección de células progenitoras y regulación de su diferenciación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de polisulfato de pentosano en combinación con células progenitoras para mejorar la viabilidad de las células progenitoras incluyendo la mejora de la crioconservación de las células progenitoras y proporciona composiciones, métodos y usos novedosos. La presente invención también se refiere al uso de polisulfato de pentosano para regular la proliferación y la diferenciación de células progenitoras.

**Antecedentes de la invención**

Las células progenitoras humanas son las células inmaduras que dan lugar a todos los diferentes tipos de células maduras que forman los órganos y tejidos del cuerpo adulto. La transición de célula progenitora a célula adulta especializada, madura, es a través de un proceso denominado diferenciación.

Las células progenitoras en el cuerpo toman diferentes vías de diferenciación en respuesta a diferentes estímulos de su entorno. De forma similar, las células progenitoras en el laboratorio pueden ser estimuladas para diferenciarse a lo largo de diferentes vías al exponerlas a diversas combinaciones de productos bioquímicos. Con estímulos apropiados, las células progenitoras pueden diferenciarse en, entre otros tejidos, células sanguíneas, hueso, cartílago, grasa, vasos sanguíneos o músculo cardíaco. Debido a esto, se proporciona gran interés al uso de células progenitoras como la base de tratamientos para reparar y volver a hacer crecer una amplia gama de tejidos y órganos.

Existen células progenitoras en el embrión y también en tejidos adultos tales como la médula ósea, la grasa, la piel y la pulpa dental, aunque en números relativos mucho más pequeñas que en el embrión. Los dos tipos de células progenitoras adultas son hematopoyético, que da lugar a médula ósea y células sanguíneas nuevas, y no hematopoyético, que da lugar a órganos y tejidos sólidos, tales como hueso, corazón y cartílago. Pueden obtenerse células progenitoras adultas de tipo hematopoyético fácilmente a partir de médula ósea y ya se usan clínicamente. Sin embargo, la tecnología relacionada con las células progenitoras adultas de tipo no hematopoyético está mucho menos desarrollada debido a la dificultad de obtener un número suficiente de estas células y de su cultivo en el laboratorio.

Con el fin de usar células progenitoras en terapia es necesario ser capaz de almacenar satisfactoriamente las células progenitoras antes de su uso. Las células progenitoras deben almacenarse de manera que se conserven de forma eficaz y se mantenga su viabilidad. En general, las células progenitoras se crioconservan para su almacenamiento y se descongelan antes de su uso.

La preservación criogénica (almacenamiento por debajo de -100 °C) de cultivos celulares se usa ampliamente para mantener copias de seguridad o reservas de células sin el esfuerzo y el coste asociados de la alimentación y el cuidado de las mismas. El éxito del proceso de congelación depende de cuatro áreas críticas, la manipulación adecuada de los cultivos, la congelación controlada, el almacenamiento adecuado y un agente crioprotector adecuado. El último punto es particularmente importante y un agente adecuado puede ayudar en el mantenimiento de la viabilidad de las células.

En un entorno clínico, es particularmente importante que después de la crioconservación las células permanezcan viables y cualquier aumento en la viabilidad de las células aumentará el efecto del tratamiento.

Además, con el fin de que las células progenitoras sean terapéuticamente eficaces, es necesario que se diferencien en el tipo de célula requerido. Por tanto, también existe la necesidad de desarrollar reguladores eficaces de la diferenciación de células progenitoras para asegurar que las células progenitoras se diferencien en el tipo de célula requerido.

Además, también existe la necesidad de desarrollar reguladores eficaces de la proliferación de células progenitoras. Con frecuencia es deseable que las células progenitoras proliferen tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de un agente o agentes que puedan proteger las células progenitoras durante la crioconservación, potenciar su viabilidad, regular su diferenciación y/o regular su proliferación.

**Sumario de la invención**

Los presentes inventores han descubierto que el polisulfato de pentosano puede mejorar la viabilidad de las células progenitoras. En particular, los presentes inventores han descubierto que el polisulfato de pentosano puede potenciar la crioconservación de las células progenitoras.

Los presentes inventores también han descubierto que el polisulfato de pentosano puede regular la proliferación de las células progenitoras.

5 El presente inventor también ha descubierto que el polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación de las células progenitoras. La regulación puede ser regulación positiva o regulación negativa. Se ha descubierto que el polisulfato de pentosano o fragmentos moleculares biológicamente activos del mismo pueden regular la diferenciación en condrocitos, osteoblastos y adipocitos. En particular, se ha descubierto que el polisulfato de pentosano puede inducir la condrogénesis.

10 Estos hallazgos indican que el polisulfato de pentosano puede usarse en combinación con células progenitoras para mejorar o potenciar la viabilidad de las células progenitoras después de la crioconservación y puede usarse en combinación con células progenitoras en métodos y usos *in vitro* e *in vivo*.

15 Estos hallazgos inesperados, por tanto, abren la posibilidad de usar el polisulfato de pentosano en una serie de nuevas aplicaciones. Por ejemplo, mediante la regulación de la diferenciación, en particular la condrogénesis, es posible, entre otras cosas, reconstruir el cartílago y los discos intervertebrales, prevenir la degradación de las articulaciones y potenciar la reparación de tejidos conectivos avasculares. Antes de la presente invención, no se sabía que el polisulfato de pentosano podía regular la diferenciación de las células progenitoras, en particular la condrogénesis. Además, mediante la regulación de la proliferación, es posible controlar la producción de células progenitoras tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque se ha publicado el uso de polisulfato de pentosano en relación con tratamientos de la osteoartritis (OA) en sí, anteriormente no se sabía que el polisulfato de pentosano tuviera propiedades ventajosas de crioconservación en relación con las células progenitoras o que pudieran regular la diferenciación y/o proliferación celular de dichas células. Por tanto, esto abre nuevas vías de tratamiento que no se habían considerado antes.

25 Como se usa en el presente documento un "fragmento molecular biológicamente activo" es una porción de una molécula de la invención que mantiene una actividad definida de la molécula de longitud completa, es decir, en una realización ser capaz de potenciar la viabilidad, regular la diferenciación celular y/o regular la proliferación celular.

30 En consecuencia, en una primera realización, la presente invención proporciona una composición que comprende células progenitoras seleccionadas entre células condroprogenitoras y células progenitoras mesenquimatosas junto con un polisulfato de pentosano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un medio de crioconservación.

35 En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición de la primera realización que comprende además un medio de vehículo.

El medio de vehículo puede ser un medio de cultivo, bioarmazón, medio de crioconservación, medios fisiológicos y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 La composición puede usarse tanto *in vitro* como *in vivo*.

La composición puede contener cualquier número de células progenitoras. En una realización adicional, la presente invención contiene de aproximadamente 1000 a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células progenitoras. En una realización adicional, la presente invención contiene aproximadamente  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^9$  células. En una realización adicional, la presente invención contiene de 100.000 a aproximadamente  $5 \times 10^8$  células progenitoras. En una realización adicional, la presente invención contiene de aproximadamente 500.000 a aproximadamente  $2 \times 10^8$  células progenitoras, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $2 \times 10^8$  células progenitoras o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células progenitoras. En una realización adicional más, la composición contiene aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  o  $9 \times 10^8$  células progenitoras. En una realización adicional más, la composición contiene aproximadamente  $1 \times 10^8$  células progenitoras.

55 En una realización, la concentración del polisulfato de pentosano en la composición dependerá del número de células en la composición. Por tanto, en una realización, la concentración del polisulfato de pentosano en la composición es de 500 ng/ml/millón de células-10 mg/ml/millón de células, o 500 ng/ml/millón de células-2000 µg/ml/millón de células, 1 µg/ml/millón de células-1000 µg/ml/millón de células o 1 µg/ml/millón de células-500 µg/ml/millón de células.

60 En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 500 ng-10 µg/ml/millón de células; 1 µg-10 µg/ml/millón de células; 1 µg-8 µg/ml/millón de células; 1 µg-6 µg/ml/millón de células; 1 µg-5 µg/ml/millón de células; 1 µg-3 µg/ml/millón de células; 2 µg-6 µg/ml/millón de células; 2,5 µg-5 µg/ml/millón de células; o 3 µg-5 µg/ml/millón de células. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 1 µg-100 µg/ml/millón de células; 1 µg-50 µg/ml/millón de células; 1 µg-20 µg/ml/millón de células; 1 µg-15 µg/ml/millón de células; 10 µg-100 µg/ml/millón de células; 20 µg-100 µg/ml/millón de células; o 50 µg-100 µg/ml/millón de células. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 1 µg-1000 µg/ml/millón de células; 100 µg-800 µg/ml/millón de

células; 100 µg-600 µg/ml/millón de células; 100 µg-500 µg/ml/millón de células; 200 µg-500 µg/ml/millón de células. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 250 µg-500 µg/ml/millón de células.

5 En una realización, la concentración de polisulfato de pentosano comprende 500 ng, 1 µg, 2 µg, 2,5 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg, 700 µg, 750 µg, 800 µg, 850 µg, 900 µg, 950 µg, 1000 µg, 1050 µg, 1100 µg, 1150 µg, 1200 µg, 1250 µg, 1300 µg, 1350 µg, 1400 µg, 1450 µg, 1500 µg, 1550 µg, 1600 µg, 1650 µg, 1700 µg, 1750 µg, 1800 µg, 1850 µg, 1900 µg, 1950 µg o 2000 µg/ml/millón de células. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano comprende concentraciones de polisulfato de pentosano que comprenden 200 µg/ml/millón de células, 250 µg/ml/millón de células, 300 µg/ml/millón de células, 400 µg/ml/millón de células o 500 µg/ml/millón de células. En una realización adicional más, la concentración de polisulfato de pentosano comprende 250 µg/ml/millón de células o 500 µg/ml/millón de células.

15 Como alternativa, la concentración del polisulfato de pentosano es independiente del número de células en la composición. Por tanto, en una realización adicional de la presente invención la concentración del polisulfato de pentosano en la composición es de 500 ng/ml-10 mg/ml; 500 ng/ml-2000 µg/ml; 1 µg/ml-1000 µg/ml; o 1 µg/ml-500 µg/ml.

20 En una realización adicional, la concentración del polisulfato de pentosano está en el intervalo de 500 ng-10 µg/ml; 1 µg-10 µg/ml; 1 µg-8 µg/ml; 1 µg-6 µg/ml; 1 µg-5 µg/ml; 1 µg-3 µg/ml; 2 µg-6 µg/ml; 2,5 µg-5 µg/ml; o 3 µg-5 µg/ml. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 1 µg-100 µg/ml; 1 µg-50 µg/ml; 1 µg-20 µg/ml; 1 µg-15 µg/ml; 10 µg-100 µg/ml; 20 µg-100 µg/ml; o 50 µg-100 µg/ml. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 1 µg-1000 µg/ml; 100 µg-800 µg/ml; 100 µg-600 µg/ml; 100 µg-500 µg/ml; 200 µg-500 µg/ml. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 1 mg-1000 µg/ml; 100 µg-800 µg/ml; 100 µg-600 µg/ml; 100 µg-500 µg/ml; 200 µg-500 µg/ml. En una realización adicional, la concentración de polisulfato de pentosano está en el intervalo de 250 µg-500 µg/ml.

30 La concentración de polisulfato de pentosano adicional comprende 500 ng, 1 µg, 2 µg, 2,5 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg, 700 µg, 750 µg, 800 µg, 850 µg, 900 µg, 950 µg, 1000 µg, 1050 µg, 1100 µg, 1150 µg, 1200 µg, 1250 µg, 1300 µg, 1350 µg, 1400 µg, 1450 µg, 1500 µg, 1550 µg, 1600 µg, 1650 µg, 1700 µg, 1750 µg, 1800 µg, 1850 µg, 1900 µg, 1950 µg o 2000 µg/ml. Concentraciones de polisulfato de pentosano adicionales comprenden 200 µg/ml, 250 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml o 500 µg/ml. Concentraciones adicionales de polisulfato de pentosano comprenden 250 µg/ml y 500 µg/ml.

35 Composiciones adicionales contienen un contenido total de polisulfato de pentosano de 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg o 100 mg. Otras composiciones contienen un contenido de polisulfato de pentosano total de 15-70 mg, 20-60 mg o 25-50 mg.

45 Una realización adicional comprende aproximadamente  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  células progenitoras y 25-50 mg de polisulfato de pentosano. Una realización adicional contiene  $1 \times 10^8$  células progenitoras y 25-50 mg/ml de polisulfato de pentosano.

50 En una realización adicional, el polisulfato de pentosano puede administrarse en una cantidad tal como para producir una concentración del polisulfato de pentosano en el compartimento biológico de 0,01 a 100 microgramos/ml de medio biológico, por ejemplo de 0,1 a 50 microgramos por ml de medio biológico, de 0,1 a 50 microgramos por ml de medio biológico, de 0,1 a 10 microgramos por ml de medio biológico, de 1 a 10 microgramos por ml de medio biológico, de 2 a 8 microgramos por ml de medio biológico, de 4 a 6 microgramos por ml de medio biológico o 4, 5 o 6 microgramos por ml de medio biológico.

55 Por compartimento biológico, se entiende una zona del cuerpo tal como el disco intervertebral, músculo, articulaciones sinoviales, tejido intrasinovial (menisco, membrana sinovial), tejido extrasinovial (cápsula), intratendón, extratendón, cardio, pericardio, músculo cardíaco y/o tejido intraadiposo, intraligamento, extraligamento, intradérmico, subdérmico, intraperitoneal, intraintravenosa, intraarterial. El medio biológico dependerá del compartimento biológico. Los medios biológicos incluyen sangre, suero, plasma, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido seroso o tejidos adiposos. De este modo, por ejemplo, en una realización adicional, el polisulfato de pentosano puede administrarse en una cantidad tal como para producir una concentración del polisulfato de pentosano en las articulaciones sinoviales de 1 a 10 microgramos por ml de líquido sinovial.

#### Medio de vehículo

65 La composición puede contener un medio de vehículo. En una realización, el medio de vehículo es una solución acuosa. El medio puede contener opcionalmente componentes adicionales que preserven la estructura fisiológica

normal y las funciones de las células, en particular en relación con el mantenimiento de su osmolaridad ambiental, el pH, la integridad y la fluidez de su membrana plasmática y sus orgánulos intracelulares.

- Los vehículos adecuados para la presente invención incluyen los utilizados convencionalmente solos y en combinación, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, solución de Ringer de mamíferos de Krebs, solución de Earles, solución de Gey, solución de Simm, solución de Tyrode, hialuronano, solución salina fisiológica tamponada (PBS), solución de Locke, solución de Hank, tampón de Clark y Lubs, tampones; tampones compuestos de MES-NaOH, HEPES-NaOH, TRICINE-NaOH, EPPS-NaOH, BICINE-NaOH, Tris(hidroximetil)aminometano-HCl, Glicina-NaOH, Bicarbonato de sodio-CO<sub>2</sub>, carbonato-bicarbonato de sodio, cacodilato de sodio, de hidrógeno maleato de sodio-NaOH; medios de cultivo tales como, medio de Eagle, medio o tampón de Dulbecco, medio de McCoy, medio de Click, medio de Ames, MEM alfa, DMEM, F12 de Ham, F10 de Ham, RPMI-1640CMRL 1066 y 1415 NCTC 135; medios de estirpes celulares especialistas comerciales por ejemplo Stemline® y Megacell® o agentes de crioconservación comerciales tales como Profreeze® y CryoStor®.
- 15 Por tanto, en una realización, el medio de vehículo es un medio acuoso que opcionalmente puede incluir adicionalmente uno o más de los siguientes componentes:
- sales orgánicas y/o inorgánicas;
  - tampones
  - 20 - proteínas tales como BSA o transferrina;
  - factores de crecimiento y citocinas, incluyendo factor de crecimiento similar a insulina, insulina, factores de crecimiento similares a fibroblastos; súper familia BMP-TGF-beta (por ejemplo, BMP-2, BMP-7, BMP-8, TGF beta) y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, IGF, FGF, EGF, PDGF, VEGF;
  - sueros animales incluyendo FBS, ternero recién nacido, todas las demás especies de mamíferos;
  - 25 - agentes de crioconservación tales como Profreeze® y CryoStor®;
  - crioprotectores, incluyendo sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, trehalosa, sacarosa y otros azúcares o dimetilacetamida;
  - hidratos de carbono;
  - vitaminas/cofactores;
  - 30 - hormonas
  - antibióticos
  - factores de fijación;
  - aminoácidos;
  - expansores del plasma como dextrano;
  - 35 - plasma tanto humano como de otras especies de mamíferos;
  - sustituto del plasma;
  - hialuronano y/o ácido hialurónico, tanto natural o reticulado.

40 Por tanto, en una realización, el medio de vehículo comprende un medio acuoso seleccionado entre agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, una solución tamponada, hialuronano y glicoles, solución salina tamponada fisiológica (PBS), solución de Ringer, solución de Locke, solución de Hank, medio esencial mínimo, medio esencial mínimo alfa (MEM alfa) o DMEM. En una realización, el medio de vehículo comprende MEM alfa. En una realización alternativa, el medio de vehículo comprende DMEM. En una realización alternativa, el medio de vehículo comprende HAMS 12.

45 El medio de vehículo puede comprender adicionalmente agentes de crioconservación tales como preparaciones patentadas como Profreeze® o CryoStor®.

50 En una realización alternativa, el medio de vehículo puede comprender de crioconservación agentes tales como preparaciones patentadas como Profreeze® o CryoStor® como la solución acuosa. En esta realización, la composición no contiene vehículos como agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialuronano, solución salina tamponada fisiológica (PBS), solución de Locke, solución de Hank, MEM alfa; DMEM; o F12 de HAM y en su lugar comprende agentes de crioconservación tales como preparaciones patentadas como Profreeze® o CryoStor®, opcionalmente en combinación con uno o más crioprotectores tales como sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, trehalosa, sacarosa y otros azúcares o dimetilacetamida. Como un ejemplo, el medio de vehículo puede comprender o consistir en Profreeze® y DMSO.

60 El medio de vehículo puede actuar como un medio de cultivo y puede complementarse con sales orgánicas y/o inorgánicas, hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos y/u otras entidades que cumplan los requisitos nutricionales de las células permitiéndoles dividirse y funcionar normalmente *in vitro*. En una realización, el medio de vehículo comprende adicionalmente complementos de suero y/o de proteínas. Por tanto, los medios de cultivo

pueden complementarse con proteínas, incluyendo, pero no limitadas a BSA o transferrina. Además de, o en lugar de, el medio de cultivo puede complementarse con suero, por ejemplo, sangre fetal o neonatal que contiene factores de crecimiento, por ejemplo, suero de ternero fetal. Las recetas para la preparación y el método de uso de estos medios son bien conocidos por los expertos en la materia. Pueden encontrarse medios adecuados en Adams RLP.

5 *Cell culture for Biochemists*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Nueva York, Oxford. 1980, págs. 84-97 y págs. 246-260. (ISBN 0-444-80199-5) y Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH y Jones KM, *Data for Biochemical Research* (Tercera Edición), Clarendon Press, Oxford, 2002, págs. 417-448 (ISBN 0-19-855299-8) cuyo contenido se incorpora en su totalidad.

10 En una realización, el medio de vehículo actúa como un medio de crioconservación. Los medios de crioconservación para congelar-descongelar células incluye el uso de los vehículos habitualmente conocidos y/o medios de cultivo incluyendo los medios acuosos descritos en el presente documento (ya sea solos o en combinación con complementos de proteína sérica). Como alternativa, el medio de vehículo puede comprender o incluir preparaciones patentadas tales como Profreeze® y CryoStor®. Para actuar como un medio de vehículo, en general se añaden compuestos que protegen la membrana celular y los orgánulos de daños por cristales de hielo formados durante el proceso de congelación-descongelación.

Por tanto, en una realización adicional, el medio de vehículo comprende adicionalmente uno o más crioprotectores. Los agentes o crioprotectores adecuados incluyen sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, sacarosa y otros azúcares. Pueden encontrarse ejemplos de agentes adecuados en Brudder S, Jaiswal N, Hainsworth S, documento WO9739104; Farrant, J. 1980. *General observations on cell preservation*. En: M.J. Ashwood-Smith y J. Farrant, Eds. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical Limited, Kent, Inglaterra, págs. 1-18; Frederick V, et al. *Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells*. *Human Reprod.* 2004, 19:948-53, Pegg DE, *Principles of Cryopreservation*. *Methods Mol Biol.* 2007; 368: 39-57, cuyo contenido se incorporan por referencia. Por tanto, en una realización adicional, el medio de vehículo comprende adicionalmente un agente o crioprotector seleccionado entre uno o más de sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, sacarosa y otros azúcares. Los crioprotectores alternativos incluyen dimetilacetamida como una alternativa a glicerol, trehalosa y/o sacarosa. En una realización adicional, el medio de vehículo comprende crioprotectores convencionales, opcionalmente en combinación con factores de crecimiento y/o factores de diferenciación. Pueden encontrarse ejemplos de medios de vehículo adecuados en el documento WO9832333, el documento WO9739104 o el documento WO1997/039104.

En una realización adicional más, el medio de vehículo comprende adicionalmente unas preparaciones patentadas tales como Profreeze® y CryoStor®. Profreeze es comercializado por Lonza-BioWhittaker como medio de congelación que contiene componentes de origen no animal. El medio de vehículo puede complementarse con los agentes o protectores analizados en el presente documento, en particular, DMSO, glicerol, sacarosa y otros azúcares y más en particular DMSO. En una realización particular, el medio de vehículo incluye Medio de Congelación CDNAO Profreeze®™, opcionalmente en combinación con DMSO. En una realización adicional, el medio de vehículo comprende MEM Alfa, Medio de Congelación CDNAO Profreeze®™ y DMSO.

La presente invención contempla e incluye la posibilidad de que el medio de vehículo cumpla múltiples requisitos. Por tanto, el medio de vehículo puede actuar como un medio de cultivo y como un medio de crioconservación. De igual modo, el medio de vehículo puede actuar como un medio de crioconservación y como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El medio de vehículo puede comprender sulfóxido de dimetilo (DMSO) y/o glicerol. En una realización, el medio de vehículo comprende sulfóxido de dimetilo (DMSO). En una realización adicional, la composición comprende DMSO al 1-20 %. En una realización adicional más, la composición comprende DMSO al 1-15 %, DMSO al 5-15 %, DMSO al 1-10 %, DMSO al 5 %, DMSO al 7,5 %, DMSO al 10 %, DMSO al 15 % o DMSO al 20 %. En una realización particular, el DMSO es DMSO de alto grado de pureza.

Algunas células pueden ser verse afectadas adversamente por el contacto prolongado con DMSO. Esto puede reducirse o eliminarse añadiendo el DMSO a la suspensión de células a 4 °C y retirándolo inmediatamente después de la descongelación. Como alternativa, puede usarse una concentración menor de DMSO.

Como posibilidad adicional el medio de vehículo puede comprender glicerol en lugar de DMSO. Por tanto, en una realización alternativa, el medio de vehículo puede comprender glicerol. En una realización, el glicerol está presente a una concentración del 1-30 %, 1-20 %, 5-20 %, 1-15 %, 5-15 %, 1-10 % o 5-10 %.

En una realización, el medio contiene DMSO o glicerol en combinación con DMEM, HETA-almidón y/o componentes de suero humano y/u otros agentes de carga.

En una realización, el medio de vehículo es aceptable para la inyección y no afecta a la funcionalidad de las células. En una realización, el medio contiene suero. En una realización adicional, el medio es un medio sin suero.

65

5 En una realización, el medio de vehículo contiene suero, en una realización, componentes de suero humano. En una realización, el medio de vehículo comprende adicionalmente suero bovino fetal (FBS). En una realización, la composición comprende FBS al 1-50 %. En una realización adicional, la composición comprende FBS al 1-20 %, FBS al 1-10 %, FBS al 5 %, FBS al 7,5 %, FBS al 10 %, FBS al 15 % o FBS al 20 %. Como alternativa, el suero adecuado incluye BSA, transferrina y/o proteínas de yema de huevo a las mismas concentraciones posibles.

10 Un ejemplo de un medio de criopreservación a base de suero sería un medio de vehículo que comprende una solución acuosa tal como solución de Ringer, solución salina fisiológica tamponada (PBS), solución de Locke, solución de Hank, MEM alfa, DMEM o F12 de HAM junto con un crioprotector tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, trehalosa, sacarosa y otros azúcares o dimetilacetamida y suero tal como FBS.

Por tanto, un medio de criopreservación a base de suero de ejemplo sería un medio de vehículo que comprende DMEM o MEM alfa, DMSO y suero (usando, por ejemplo, suero bovino fetal).

15 El medio de vehículo también puede ser sin suero y/o sin proteína y puede ser un medio definido químicamente. Los ejemplos de medios sin suero incluyen, Reemplazo de Suero KnockOut™, D-MEM KnockOut™, SFM StemPro®-34.

20 Un ejemplo de un medio sin suero sería un medio de vehículo que comprende una solución acuosa tal como solución de Ringer, solución salina tamponada fisiológica (PBS), solución de Locke, solución de Hank, MEM alfa, DMEM o F12 de HAM junto con un crioprotector tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, trehalosa, sacarosa y otros azúcares o dimetilacetamida y un medio de criopreservación tal como preparaciones patentadas como Profreeze® o CryoStor®.

25 Por tanto, un medio de criopreservación a base de suero de ejemplo sería un medio de vehículo que comprende MEM alfa, DMSO y Profreeze® o simplemente DMSO y Profreeze®.

30 En una realización, el medio de vehículo comprende Profreeze®. Profreeze® es un medio de congelación sin suero y se formula específicamente para criopreservar células que se han propagado en medios libres de suero. Este medio sin componentes animales y sin proteínas está libre de proteínas animales naturales y mantiene una alta viabilidad celular tras su recuperación desde el almacenamiento congelado. En una realización adicional, el medio de vehículo comprende Profreeze® junto con DMSO, con el DMSO opcionalmente al 7,5 o 15 %. Como alternativa, el medio de vehículo puede incluir CryoStor®.

35 En una realización, el medio puede contener tampones. Los tampones incluyen DMEM, tampones fosfato o CMF-PBS. Todos los tampones fisiológicos utilizados habitualmente están incluidos en la presente invención. Pueden encontrarse tampones de ejemplo en la bibliografía, por ejemplo, Lelong IH y Rebel G. *pH drift of "physiological buffers" and culture media used for cell incubation during in vitro studies. J Pharmacol Toxicol Methods. 1998; 39: 203-210*; John A Bontempo. *Development of Biopharmaceutical Parenteral Dosage Forms. en Drugs and the Pharmaceutical Sciences.* Marcel Dekker Inc, NY (ISBN: 0-8247-9981-X): págs. 91-108.

40 El medio puede comprender además opcionalmente sacáridos incluyendo dextrano, trehalosa, sacarosa o dimetilacetamida (DMA).

45 En una realización, la composición comprende células progenitoras; polisulfato de pentosano y un medio de vehículo que comprende:

- un medio acuoso seleccionado entre agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialuronano, glicoles, solución salina tamponada fisiológica (PBS), solución de Locke, solución de Hank, MEM alfa, DMEM o F12 de HAM;
- 50 - un medio de criopreservación, incluyendo Profreeze® o CryoStor; y
- un crioprotector seleccionado entre sulfóxido de dimetilo (DMSO) y/o glicerol.

En una realización, el medio de criopreservación es Profreeze®.

55 En una realización, el medio acuoso es MEM alfa o DMEM.

En una realización el crioprotector es DMSO.

60 En una realización, el medio acuoso está presente en un 1-99 %, aproximadamente al 10 %, aproximadamente al 20 %, aproximadamente al 30 %, aproximadamente al 40 %, aproximadamente al 50 %, aproximadamente al 60 %, aproximadamente al 70 %, aproximadamente al 80 % o aproximadamente al 90 %.

En una realización, el medio de criopreservación está presente en un 1-99 %, aproximadamente al 10 %, aproximadamente al 20 %, aproximadamente al 30 %, aproximadamente al 40 %, aproximadamente al 50 %, aproximadamente al 60 %, aproximadamente al 70 %, aproximadamente al 80 % o aproximadamente al 90 %.

65 En una realización, el crioprotector está presente en una cantidad del 1-50 %, 1-30 %, 1-15 %, 1-10 %, 1-7,5 %, 1-5 %, 1-2,5 % o 1-1,5 %.

2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 % o 20 %.

5 En una realización adicional, se proporciona células progenitoras junto con un polisulfato de pentosano o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo, criopreservadas en aproximadamente 5 ml de Medio de Congelación CDNAO Profreeze®™, DMSO al 7,5 % y MEM alfa al 50 %. Las concentraciones de células en el momento de la criopreservación pueden ser de  $90 \times 10^6$  células/criobolsa a  $180 \times 10^6$  células/criobolsa en 5 ml de medio de congelación.

10 En una realización adicional más, el medio de vehículo comprende una matriz de soporte. La matriz de soporte puede denominarse de otro modo como biomatriz o bioarmazón.

La presente invención enseña un método de potenciación de la criopreservación de células progenitoras, que comprende exponer las células progenitoras a un polisulfato de pentosano.

15 La presente invención enseña el uso de un polisulfato de pentosano para potenciar la criopreservación de células progenitoras.

20 La presente invención enseña un método de mejora de la viabilidad de las células progenitoras, que comprende exponer un polisulfato de pentosano a las células progenitoras.

La presente invención enseña el uso de un polisulfato de pentosano para mejorar la viabilidad de las células progenitoras.

25 La presente invención enseña el uso de un polisulfato de pentosano como un agente de criopreservación.

30 En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de una composición como se define en el presente documento para potenciar la criopreservación de células progenitoras. En otra realización, la presente invención proporciona un método de mejorar de la viabilidad de las células progenitoras, que comprende criopreservar una composición como se define en el presente documento y posteriormente descongelar la composición.

35 Por tanto, por primera vez, se ha demostrado que la adición de polisulfato de pentosano a los medios criogénicos no tiene un efecto adverso sobre las células progenitoras y no tiene un efecto perjudicial sobre su viabilidad. De hecho, se ha demostrado que la adición de polisulfato de pentosano a los medios criogénicos mejora la viabilidad de las células progenitoras.

40 Además, se ha demostrado que la adición de polisulfato de pentosano a las células progenitoras mantiene o mejora la viabilidad de las células progenitoras en sí. Por tanto, se enseña el uso de polisulfato de pentosano para mantener o mejorar la viabilidad de las células progenitoras. Se enseña un método de mantenimiento o mejora de la viabilidad de las células progenitoras que comprende poner en contacto un polisulfato de pentosano con la célula progenitora.

También se ha descubierto que el polisulfato de pentosano puede regular la proliferación de células progenitoras.

45 La presente invención enseña un método de regulación de la proliferación de células progenitoras, que comprende exponer un polisulfato de pentosano a una célula progenitora.

La presente invención enseña el uso de un polisulfato de pentosano para regular la proliferación de células progenitoras.

50 La presente invención enseña el uso de una composición como se define en el presente documento para aumentar la proliferación. Por tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un método de regulación de la proliferación de células progenitoras, que comprende el uso de una composición como se define en el presente documento. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de una composición como se define en el presente documento para regular la proliferación de células progenitoras.

55 En una realización, la proliferación aumenta o se regula positivamente.

60 Por tanto, por primera vez, se ha demostrado que el uso de polisulfato de pentosano con células progenitoras puede mejorar la proliferación de las células progenitoras. El polisulfato de pentosano estimula la proliferación de células progenitoras de una manera dependiente de la concentración. Por tanto, puede utilizarse polisulfato de pentosano en aplicaciones en las que se desea hacer proliferar las células. Por ejemplo, la proliferación *in vitro* de células progenitoras sería útil para la expansión de la colonia para su aplicación en el campo de la bioingeniería. Como un ejemplo, podría impregnarse un bioarmazón con una colonia de células progenitoras y perfundirse por un medio de cultivo a 37 °C que contiene polisulfato o polisulfatos de pentosano. Esto promovería la proliferación para, adicionalmente, injertar y rellenar el armazón proporcionando de este modo un tejido sustituto más funcional. Como un ejemplo adicional, podría sembrarse un bioarmazón preformado (tubular o semiesférico) con células progenitoras

65



autólogas o alógenas y perfundirse con medios que contienen polisulfato o polisulfatos de pentosano para producir finalmente una superficie de tráquea o articulación para el trasplante en un hospedador en el que estos cartílagos son defectuosos. Puede encontrarse información adicional sobre estos usos en Chen FH y Tuan RS. *Mesenchymal cells in rhematic diseases. Arthritis research and Therapy*. 2008; 10: 223-239.

5 La estimulación con polisulfato de pentosano *in vivo* de la proliferación sería ventajosa para facilitar el injerto en defectos grandes (tal como en el cartílago articular) o compartimentos denudados de células residentes endógenas viables (por ejemplo, el centro del disco intervertebral) reduciendo de este modo el tiempo necesario para la reparación y reconstrucción del defecto. Puesto que las células progenitoras también son una fuente abundante de  
10 citocinas antiinflamatorias y factores inmunosupresores (véase, por ejemplo, Aggarwal S y Pittenger A, *Human progenitor cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood*. 2005; 105: 1815-1822, Tyndale A, et al. *Immunomodulatory properties of progenitor cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. Arthritis Res Ther*. 2007; 9: 301-15; Jorgensen C, et al. *Multipotent mesenchymal stromal cells in articular disease. Best Practice and Research Clinical Rheumatology*.  
15 2008; 22: 269-284) su proliferación en sitios de inflamación o respuesta antigénica después de la inyección aumentaría el potencial para la supresión de estos procesos celulares no deseados. También se ha descubierto que el polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación de células progenitoras. La diferenciación puede regularse positivamente o negativamente.

20 Se enseña un método de regulación de la diferenciación de células progenitoras mediante la exposición de un polisulfato de pentosano a una célula progenitora.

Se enseña el uso de un polisulfato de pentosano para regular la diferenciación de células progenitoras.

25 La presente invención regula la diferenciación de células progenitoras. Las células de la presente invención pueden diferenciarse en linajes de condrocitos, osteoblastos y adipocitos y, en una realización, pueden diferenciarse en tipos celulares de diferentes linajes, incluyendo hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo, tendón y estroma.

30 El polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación en condrocitos. El polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación en osteoblastos. El polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación en adipocitos. El polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación en fibrocondrocitos. El polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación en tenocitos. El polisulfato de pentosano puede regular la diferenciación en cardiocitos.

35 En particular, se ha descubierto que el polisulfato de pentosano puede regular e inducir la condrogénesis.

La presente invención regula la condrogénesis en células progenitoras que soportan la diferenciación y la supervivencia del fenotipo condrocito. La presente invención se refiere a la formación de condrocitos o fibrocondrocitos.

40 El polisulfato de pentosano regula positivamente la diferenciación. En una alternativa, el polisulfato de pentosano regula negativamente la diferenciación.

La presente invención enseña un método de regulación de la condrogénesis en las células progenitoras que comprende aplicar un polisulfato de pentosano a una célula progenitora.

45 Se enseña el uso de un polisulfato de pentosano para regular la condrogénesis en las células progenitoras.

Se enseña el uso de un polisulfato de pentosano para regular negativamente la osteogénesis en las células progenitoras.

50 Se enseña el uso de un polisulfato de pentosano para evitar la osteogénesis por las células progenitoras. Este método o uso puede encontrar una aplicación cuando la producción de hueso fuera perjudicial para el hospedador tal como en los sitios de tejidos blandos que requieren flexibilidad y movimiento para su función normal, por ejemplo, músculo (corazón), estroma, tejidos conectivos de soporte, etc., o en los sitios donde el hueso podría afectar o  
55 atrapar fibras/raíces nerviosas y/o vasos sanguíneos conduciendo a parálisis, parálisis, isquemia y lesión tisular irreversible potencial.

60 Se enseña un método de tratamiento de una célula para que experimente condrogénesis que comprende poner en contacto una célula progenitora con una cantidad eficaz de un polisulfato de pentosano, durante un tiempo y en condiciones que estimulan la célula a diferenciarse.

#### Células progenitoras

65 La expresión "célula progenitora" tiene por objeto abarcar cualquier célula multipotente. Por tanto, la expresión célula progenitora abarca células madre adultas y embrionarias.

La célula progenitora es una célula progenitora mesenquimatosa.

5 En una realización adicional, la célula progenitora es una célula mesenquimatosa o progenitora mesenquimatosa, embrionaria o adulta, endógena o exógena. En una realización adicional, la célula progenitora es una célula estromal multipotente. En una realización adicional, la célula es una célula mesenquimatosa indiferenciada adulta.

En una realización adicional, la célula progenitora es una célula condroprogenitora.

10 En una realización, las células progenitoras derivan de la médula ósea. Como alternativa, las células progenitoras derivan de cartílago, tejido sinovial, músculo, tejido adiposo, piel, cordón umbilical, pulpa dental u otras fuentes disponibles.

15 En una realización, la célula progenitora es una célula somática, tal como células del tejido conectivo reprimidas de la diferenciación por factores endógenos.

En una realización adicional, las células progenitoras son una población de células enriquecidas para Stro-1<sup>bri</sup>, o células Stro-1<sup>bri</sup> homogéneas, o células de progenie Stro-1<sup>bri</sup>.

#### 20 Polisacáridos polisulfatados

Puede considerarse que la familia de polisacáridos polisulfatados es cualquier polisacárido polisulfatado de origen natural o semisintético/sintético o un fragmento biológicamente activo del mismo que contiene dos o más anillos de azúcar o estructuras de hidrato de carbono a los que uno o más grupos éster de sulfato se unen covalentemente como se ejemplifica por la heparina y el polisulfato de pentosano.

25 El polisulfato de pentosano es polisulfato de pentosano.

30 El polisulfato de pentosano son polisulfato de pentosano, la sal de sodio de polisulfato de pentosano (NaPPS), la sal de magnesio de polisulfato de pentosano (MgPPS) y/o la sal de calcio de polisulfato de pentosano (CaPPS).

Se ha demostrado que el polisulfato de pentosano mejora la viabilidad de las células progenitoras, potencia la crioconservación de las células progenitoras, regular la proliferación de las células progenitoras y/o regula la diferenciación de las células progenitoras.

35 Se ha demostrado que el polisulfato de pentosano regula positivamente la diferenciación y, en particular, induce la condrogénesis.

#### Usos

40 Las células progenitoras de la presente invención pueden diferenciarse en una serie de tipos celulares incluyendo condrocitos, fibrocondrocitos, osteoblastos y adipocitos.

45 Puesto que las células progenitoras pueden diferenciarse en condrocitos o fibrocondrocitos, estas células son útiles en la producción de matriz extracelular. La matriz extracelular puede ser adecuada para el trasplante en un defecto del tejido conectivo en un sujeto que necesite dicho tratamiento.

La presente invención puede utilizarse para inducir la reparación del cartílago, la restauración o la neogénesis de la matriz y atenuar su catabolismo mediante la administración de un polisacárido polisulfatado o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo en combinación con células progenitoras.

50 En una realización adicional, las composiciones de la presente invención también pueden usarse como un agente inmunosupresor, anticatabólico o antiinflamatorio. Como ejemplo, la composición de la presente invención puede usarse en el tratamiento de la artritis reumatoide.

55 Los métodos analizados en el presente documento pueden usarse *in vivo* o *in vitro*. *In vivo*, las células progenitoras insertadas pueden, entre otras cosas, reconstruir el cartílago in-situ. Además, las células progenitoras residentes en las articulaciones también pueden estimularse para reconstruir el cartílago in-situ formando de este modo un tratamiento dirigido eficaz.

60 *In vitro*, la presente invención permite la producción de cartílago dentro de una biomatriz que posteriormente puede implantarse en un paciente. Esto podría usarse para generar cartílago para reemplazar parcial o totalmente superficies de la articulación articular, para el reemplazo de tejidos cartilagosos/fibrocartilagosos o cualquier otro tejido que pueda beneficiarse de este proceso que se haya lesionado o que sea resultado de anomalías genéticas que requieren la corrección quirúrgica.

65 La presente invención también encuentra un uso en los pacientes que no pueden beneficiarse de los tratamientos médicos o quirúrgicos disponibles actualmente. Por ejemplo, muchos deportistas o individuos que han sufrido una

lesión aguda provocada por un traumatismo pueden tener defectos de cartílago/fibrocartilagosas que son sintomáticos. La presente invención enseña un método que podría usarse para estimular el crecimiento de cartílago nuevo para reemplazar el tejido defectuoso. Esto puede hacerse o bien *in vivo* mediante la estimulación del crecimiento de células progenitoras en la articulación in-situ o bien *in vitro* a través de un bioarmazón adecuado que está conformado de manera que encaje en el defecto y posteriormente se inserte en el defecto; o mediante métodos tanto *in vivo* como *in vitro*. Como alternativa, podría usarse con pacientes mayores con degeneración de articulaciones establecida tal como en la osteoartritis de las articulaciones periféricas y la columna vertebral, donde la presente invención podría usarse para estimular el crecimiento de cartílago nuevo para reemplazar el tejido defectuoso y prevenir la progresión de osteofitos y reducir la inflamación que es con frecuencia la causa de los síntomas de estos trastornos.

La presente invención ha identificado un compuesto o compuestos que pueden actuar como un agente de crioconservación y como un agente que puede regular la diferenciación. La presente invención ha identificado un compuesto o compuestos que pueden actuar como un agente de crioconservación y como un agente que puede regular la proliferación. La presente invención ha identificado un compuesto o compuestos que pueden actuar como un agente de crioconservación, como un agente que puede regular la proliferación y como un agente que puede regular la diferenciación. Dichos compuestos multiuso no se habían descubierto anteriormente en relación con las células progenitoras.

La presente invención ha identificado familias de moléculas o sus fragmentos biológicamente activos que pueden, independientemente o en combinación entre sí, potenciar la crioconservación de las células progenitoras, regular su proliferación celular y o regular su diferenciación; por tanto, estas moléculas pueden usarse en combinación con células progenitoras en el tratamiento terapéutico.

En particular, la presente invención permite que las células progenitoras se diferencien en condrocitos/fibroblastos, permitiendo de este modo la formación de cartílago o fibrocartílago. Por tanto, el uso de células progenitoras y polisulfato de pentosano puede usarse para tratar enfermedades degenerativas, para tratar un defecto del cartílago/fibrocartílago y/o para prevenir o minimizar la progresión de enfermedades degenerativas y defectos del cartílago.

La presente invención ha identificado una nueva composición. Esta composición tiene un uso terapéutico y puede usarse ventajosamente ya sea *in vivo* o *in vitro*. En una realización, el método se realiza *in vivo*. Como alternativa, el método se realiza *in vitro*.

Por tanto, en una realización de la presente invención, se proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de cualquier enfermedad que se vea afectada por una degradación o reducción del cartílago, incluyendo enfermedades del sistema musculoesquelético, incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD), enfermedades degenerativas, y en un método de inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de cualquier enfermedad que se vea afectada por una degradación o reducción de cartílago, incluyendo enfermedades del sistema musculoesquelético, incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD), enfermedades degenerativas, y en un método de inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de cualquier enfermedad en la que la diferenciación de células progenitoras a través de la osteogénesis no se desee. Por ejemplo, la formación de hueso con frecuencia no se desea para la reparación de tejidos blandos tales como la inyección intradiscal. La fuga de las células desde un disco al canal espinal o sobre los órganos adyacentes (por ejemplo, el esófago) puede ser desastrosa. Un ejemplo de esto se observó cuando se colocó BMP-2 en el espacio discal para promover la fusión espinal (hueso nuevo). Se descubrió que el uso de proteínas morfogenéticas de hueso recombinantes dio como resultado complicaciones potencialmente mortales, debido a la formación de hueso ectópico adyacente al espacio discal lo que provocó la compresión neurológica y de las vías aéreas.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad que se vea afectada por una degradación o reducción del tejido adiposo.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona el uso de una composición como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier enfermedad que se vea afectada por una degradación o reducción del cartílago, incluyendo enfermedades del sistema musculoesquelético, incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD), enfermedades degenerativas, y en un método de inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.

Por tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una composición como se define en el presente documento para su uso en un método para tratar, mitigar, reducir o prevenir cualquier enfermedad que se vea afectada por una degradación o reducción de cartílago, tal como enfermedades del sistema musculoesquelético incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD), enfermedades degenerativas, y en un método de inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.

Serían ejemplos de dicha aplicación inyectar la composición de la presente invención en articulaciones de individuos con lesiones de cartílago o de disco, o por vía sistémica para otros sitios menos accesibles, lo que permite que la preparación perfunda a los tejidos y células ejerciendo de este modo sus efectos biológicos singulares. Las aplicaciones podrían incluir el tratamiento de individuos que pueden no tener la enfermedad clínica definida (con frecuencia OA o trastornos relacionados), pero han sufrido una lesión traumática en tejidos articulares a través de, por ejemplo, el deporte o la actividad relacionada con el trabajo.

Las composiciones para su uso en los métodos y usos de la presente invención también podrían servir como un método profiláctico después de la cirugía artroscópica o abierta en la que fuera necesaria la escisión/desbridamiento del cartílago o menisco. Está bien establecido que, con el tiempo, dichos pacientes post quirúrgicos generalmente progresan para presentar OA sintomática que requiere tratamiento médico. No es improbable que mediante la disminución de los síntomas de la degradación del cartílago también puedan mejorar debido a la reducción en la producción de antígenos que promueven la inflamación.

Por tanto, el uso de las composiciones de la presente invención analizado en el presente documento para regular la diferenciación y/o proliferación celular de las células progenitoras introducidos en el paciente puede usarse para tratar, mitigar, reducir o prevenir cualquier enfermedad que se vea afectada por una degradación o reducción del cartílago. Las enfermedades específicas incluyen enfermedades del sistema musculoesquelético, incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD), enfermedades degenerativas y un método de inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.

En una realización, la composición se administra por vía intravenosa. De acuerdo con una realización adicional más, la composición se administra por vía sistémica. De acuerdo con una realización adicional más, la composición se administra por vía intraarticular. De acuerdo con una realización adicional más, la composición se administra por vía intradiscal. De acuerdo con una realización adicional más, la composición se administra por vía sistémica.

El método puede incluir la inyección de un polisulfato de pentosano, en combinación con células progenitoras, en la articulación o articulaciones del paciente. El polisulfato de pentosano ayuda a regular la diferenciación y/o proliferación de las células progenitoras.

Se ha descubierto adicionalmente que el polisulfato de pentosano de la presente invención también puede producir, regular positivamente o estimular la producción de hialuronano o ácido hialurónico (HA) en las células diferenciadas. El ácido hialurónico (HA) puede producirse en una célula animal o, concretamente, un animal *in vivo* o en una célula *in vitro*.

Este hallazgo inesperado significa que las composiciones de la presente invención pueden usarse para reemplazar el HA perdido en las articulaciones, en particular en el líquido sinovial, ya sea debido al desgaste normal, a las enfermedades degenerativas o a otros traumatismos agudos. A medida que se degenera el líquido sinovial, su capacidad para proteger y lubricar las articulaciones se reduce. Esto degrada la articulación adicionalmente y también puede estimular la producción de autoantígenos que provocan aún más daños. En el pasado, una forma de superar o al menos mitigar este problema ha consistido en reemplazar el líquido sinovial.

Sin embargo, la presente invención proporciona un medio de estimular la producción de hialuronano o ácido hialurónico (HA) sin la necesidad de reemplazar el líquido sinovial en sí. Las composiciones de la presente invención pueden ponerse en contacto con células progenitoras, que después se diferencian en células mesenquimatosas (por ejemplo, condrocitos o fibroblastos) para aumentar la producción de HA. El HA se forma *in situ* y puede usarse para reemplazar el HA perdido en el líquido sinovial lo que trata, reduce o al menos mitiga los daños provocados por las enfermedades degenerativas o la degradación del tejido.

La presente invención se refiere a un método de producción, regulación positiva o estimulación de la producción de hialuronano (HA), que comprende administrar una composición como se define en el presente documento.

En una realización de la presente invención, las composiciones para su uso en los métodos y usos pueden usarse para tratar la artritis u otras enfermedades degenerativas. Sin embargo, en una realización alternativa, la presente invención excluye métodos para tratar la artritis u otras enfermedades degenerativas. Específicamente, en un aspecto, la presente invención incluye el uso de un polisulfato de pentosano en combinación con células progenitoras para tratar la artritis u otras enfermedades degenerativas.

Por tanto, en una realización de la presente invención, se proporciona una composición como se define en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece enfermedades del sistema musculoesquelético, incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD); enfermedades degenerativas, osteoartritis de las articulaciones sinoviales, en oftalmología, la prevención de adherencias abdominales postquirúrgicas, el tratamiento de la piel y la reparación y la restauración de la función de la matriz extracelular; o para inducir la reparación del cartílago, la restauración o la neogénesis de la matriz; que comprende administrar una composición como se define en el presente documento, para regular la diferenciación y/o proliferación de las células progenitoras.

El paciente o sujeto puede ser un paciente humano o animal. En una realización, el paciente es un mamífero, incluyendo un ser humano, caballo, perro, gato, oveja, vaca o primate. En una realización, el paciente es un ser humano. El paciente puede padecer una enfermedad degenerativa y/o un defecto de cartílago. El paciente puede ser un atleta o puede haber sido sometido a un traumatismo que provoque daño en las articulaciones.

La presente invención abarca composiciones para su uso en métodos de tratamiento que implican polisulfato de pentosano y células progenitoras. La presente invención también abarca el polisulfato de pentosano y células progenitoras para su uso como un medicamento; el uso del polisulfato de pentosano y células progenitoras en la fabricación de un medicamento para los tratamientos como se analizan en el presente documento; y también composiciones y formulaciones que contienen el polisulfato de pentosano y células progenitoras.

#### Terapias de combinación

La presente invención también ha identificado por primera vez polipéptidos o un fragmento biológicamente activo que también pueden regular la diferenciación y la proliferación celular, en particular regular la condrogénesis y la proliferación celular. El polipéptido es un dominio no colagenoso NC4 de colágeno alfa IX o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo (en lo sucesivo en el presente documento NC4). La expresión "fragmento biológicamente activo" es sinónimo de la expresión "un fragmento molecular biológicamente activo".

Sorprendentemente, la presente invención ha descubierto que, aunque que las dos familias separadas pueden ejercer su regulación de la proliferación celular y la condrogénesis independientemente, cuando se combinan juntas pueden actuar sinérgicamente, no solo para aumentar sus efectos individuales sino para proporcionar una mayor especificidad de acción.

Estos hallazgos inesperados abren la posibilidad de usar un polisulfato de pentosano en combinación con NC4, en una serie de nuevas aplicaciones, puesto que mediante la regulación de la condrogénesis, es posible, entre otras cosas, reconstruir el cartílago y los discos intervertebrales, prevenir la degradación de las articulaciones y potenciar la reparación de los tejidos conectivos avasculares. Antes de la presente invención, no se sabía que una combinación de un polisulfato de pentosano y NC4 podría regular la condrogénesis y la proliferación celular y ciertamente no se sabía que la combinación tendría un efecto sinérgico.

En consecuencia, en una realización adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende células progenitoras junto con un polisulfato de pentosano y NC4 o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo.

En una realización adicional, la composición comprende adicionalmente un medio de vehículo, medio de cultivo, medio de crioconservación y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende células progenitoras, un polisulfato de pentosano y NC4 o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo, junto con un medio de vehículo.

El medio de vehículo puede ser un medio de cultivo, medio de crioconservación o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cualquier referencia a las composiciones de la presente invención que se refiera a células progenitoras y polisulfato de pentosano también se refiere a la composición que contiene células progenitoras, polisulfato de pentosano y NC4, incluyendo las concentraciones, el número de células y/o los tipos y las cantidades de ingredientes adicionales opcionales. Además, los métodos y usos de las composiciones como se definen en el presente documento también se refieren a la composición que incluye tanto un polisacárido polisulfatado como NC4.

Por tanto, de acuerdo con una realización adicional de la presente invención, se proporciona un método de regulación de la condrogénesis y/o la proliferación celular que comprende administrar una composición que comprende células progenitoras, polisulfato de pentosano y NC4 o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo.

5 Por tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un método *in vitro* de regulación de la proliferación de células progenitoras, que comprende exponer un polisulfato de pentosano y NC4 o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo a una célula progenitora.

10 Por tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un método *in vitro* de regulación de la diferenciación de las células progenitoras mediante la exposición de un polisulfato de pentosano y NC4 o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo a las células progenitoras.

15 En una realización, el fragmento molecular biológicamente activo de NC4 tiene al menos un 65 % de identidad de aminoácidos con un fragmento de la SEQ ID NO: 1.

En una realización adicional, el fragmento molecular biológicamente activo de NC4 tiene al menos un 65 % de identidad de aminoácidos con un fragmento de la SEQ ID NO: 2.

20 En una realización adicional más, el fragmento molecular biológicamente activo de NC4 tiene al menos un 65 % de identidad de aminoácidos con un fragmento de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

25 En una realización adicional, el fragmento molecular biológicamente activo de NC4 tiene al menos un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 %, un 100 % de identidad de aminoácidos con los fragmentos enumerados anteriormente.

30 También es posible administrar o usar las composiciones de la presente invención como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, el polisacárido o polisacáridos de la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más de otros compuestos. Estos compuestos pueden ser un fármaco para la osteoartritis modificador de la estructura (FOAME).

35 La presente invención se extiende a las terapias de combinación para su uso en el tratamiento de las enfermedades analizadas en el presente documento. En particular, en un ejemplo, la presente invención se extiende al uso de un polisulfato de pentosano en combinación con un agente adicional para el uso en el tratamiento de diversas afecciones degenerativas. Se ha de entender que estos agentes pueden administrarse al mismo tiempo o en un momento diferente. Por tanto, la terapia de combinación puede comprender los agentes activos que se administran al mismo tiempo, ya sea en una única formulación o en múltiples formulaciones administradas en el mismo o en diferentes momentos. De igual modo, la terapia de combinación puede comprender los agentes activos que se administran en diferentes formulaciones en diferentes momentos. Las formulaciones podrían administrarse secuencialmente y pueden estar separadas por un periodo de tiempo que incluye horas, días, semanas y meses.

45 La presente invención también se extiende al uso del polisulfato de pentosano como se analiza en el presente documento en combinación con uno o más factores de crecimiento. La presente invención se extiende además a los métodos, usos, formulaciones y/o composiciones como se desvelan en el presente documento en combinación con uno o más factores de crecimiento. Los posibles factores de crecimiento incluyen el factor de crecimiento similar a insulina, la insulina, los factores de crecimiento similares a fibroblasto; la súper familia BMP-TGF-beta (por ejemplo, BMP-2, BMP-7, BMP-8, TGF beta) y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, IGF, FGF, EGF, PDGF y VEGF.

#### Breve descripción de las figuras

55 Figura 1. Los efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre las viabilidades de congelación/descongelación de CMM humanas normales. Las CMM se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 °C y se lavaron dos veces con HHF (HBSS que contiene suero de ternero fetal al 5 % (v/v)). Las células se sembraron posteriormente en múltiples matraces T-75 a 8.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron hasta el 70-80 % de confluencia, se tripsinizaron y se crioconservaron a concentraciones celulares de 50x10<sup>6</sup>/ml en Profreeze®/DMSO al 7,5 % complementado con PPS a las concentraciones indicadas. Se recuperaron ampollas del almacenamiento de nitrógeno líquido y se descongelaron rápidamente, se mezclaron suavemente y se retiraron muestras de 10 ul en el tiempo = 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. A cada muestra de células se le añadieron 290 ul de azul de tripano y se realizó un recuento de células/ensayo de viabilidad. El PPS no afectó negativamente a la viabilidad celular.

65

Figura 2. Gráfico de barras que muestra la viabilidad de diferentes números de células progenitoras ATDC5 murinas suspendidas en medio criogénico que contenía DMSO al 7,5 % y diversas concentraciones de polisulfato de pentosano (PPS) después de haber sido sometidas a un ciclo de congelación-descongelación. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo MTT de deshidrogenasa mitocondrial.

5  
Figura 3. Efectos de diferentes concentraciones de polisulfato de pentosano (PPS) sobre la viabilidad de células progenitoras después de la crioconservación en nitrógeno líquido y la descongelación rápida como se describe en la Figura 1. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo MTT de deshidrogenasa mitocondrial. Datos mostrados = Medias  $\pm$  DT \* =  $p < 0,05$  con respecto a valores de control.

10  
Figura 4. Los efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la proliferación de células progenitoras humanas. Se cultivaron células progenitoras humanas primarias en placas de 24 pocillos en medio de crecimiento complementado con PPS a las concentraciones indicadas. En diversos intervalos de tiempo (día 1, 3, 6), el medio de crecimiento se retiró y se reemplazó por medio sin rojo que contenía la sal de tetrazolio WST-1 durante 2 horas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. WST-1 se escinde por la deshidrogenasa mitocondrial en células viables para producir un colorante de formazán que puede detectarse usando un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Se muestra la absorbancia a 450 nm para cada punto temporal para todas las concentraciones de PPS. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la proliferación en el día 6 a concentraciones de PPS en exceso de 1  $\mu$ g/ml (\*  $p < 0,01$ , ANOVA).

20  
Figura 5. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la síntesis de ADN por las células progenitoras humanas, como se determina por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en el ADN macromolecular, después de cultivos de micromasa de 4 días. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  con respecto a los controles.

25  
Figura 6. Los efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre las células progenitoras humanas tratadas con agentes apoptóticos. Se sembraron células progenitoras humanas en medio sin suero complementado con PPS a las concentraciones indicadas. La apoptosis de las células progenitoras se indujo mediante la adición de una combinación de IL-4 30 ng/ml más IFN-gamma 30.000 U/ml. Después de 5 días de cultivo, las células se obtuvieron por tripsinización y se evaluaron las viabilidades mediante tinción con Anexina V. Se observa una reducción de dos veces en la apoptosis inducida por IFN-gamma/IL-4 (células positivas para Anexina V) cuando las células progenitoras se cultivan en concentraciones de PPS en exceso de 1  $\mu$ g/ml.

30  
Figura 7. Los efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la diferenciación de las células progenitoras humanas: ensayo de mineralización. Se cultivaron células progenitoras humanas primarias en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento no osteoinductor (medio de control) o en condiciones osteoinductoras (DMEM alfa complementado con FCS al 10 %, L-ascorbato-2-fosfato 100  $\mu$ M, dexametasona 10<sup>-7</sup> M y fosfato inorgánico 3 mM) en presencia de PPS en las concentraciones indicadas. El día 28, se determinó la concentración de calcio solubilizado con ácido por pocillo usando el método cresolfaleína complexona. (A) La concentración de calcio solubilizado con calcio por pocillo se determinó después de la evaluación de la cantidad total de ADN por pocillo usando una tinción de ADN fluorogénica (Hoeshst 33258). Se observó una disminución estadísticamente significativa en la formación de la matriz mineralizada cuando se usaron concentraciones de PPS de 1  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml (\*  $p < 0,01$ , ANOVA). (B) Fotomicrografías de contraste de fases de cultivos mineralizados con ampliación x20.

35  
Figura 8. Los efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la diferenciación de células progenitoras humanas: formación de adipocitos. Se cultivaron células progenitoras humanas primarias en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento no adipogénico (medio de control) o en condiciones adipogénicas (metilisobutilmetilxantina 0,5 mM, hidrocortisona 0,5  $\mu$ M e indometacina 60  $\mu$ M) en presencia de PPS en las concentraciones indicadas. El día 28, la presencia de adipocitos cargados de lípidos se determinó usando el colorante lipófilo Rojo de Aceite O. La cantidad relativa de lípido solubilizado por  $\mu$ g de ADN/pocillo se determinó después de la evaluación de la cantidad total de ADN por pocillo usando una tinción de ADN fluorogénica (Hoeshst 33258). (A) Se observó un aumento estadísticamente significativo en el número de adipocitos a concentraciones de PPS en exceso de 1  $\mu$ g/ml (\*  $p < 0,01$ , ANOVA). (A) Fotomicrografías de contraste de fases de adipocitos marcados con Rojo de Aceite O a un aumento de x20.

40  
Figura 9. Efectos dependientes de la concentración de polisulfato de pentosano (PPS) sobre la biosíntesis por células progenitoras murinas (células progenitoras C3H10T1/2) de proteoglucanos (PG) y el contenido de ADN cuando se cultivan en cultivos en monocapa. Datos mostrados = medias  $\pm$  DT.

45  
Figura 10. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la síntesis de DNA por las células progenitoras murinas (células C3H10T1/2) cultivadas en cultivos en monocapa durante 2 días como se determina por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en el ADN macromolecular.

50  
Figura 11. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS), sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado

radiactivamente en los glucosaminoglucanos sulfatados ( $^{35}\text{S}$ -GAG) de los PG después de cultivos en monocapa de 2 días de células progenitoras humanas. Los datos se expresaron como radioactividad  $^{35}\text{S}$ -GAG como desintegraciones por minuto (DPM) normalizadas al contenido de ADN. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ .

5  
Figura 12. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS), sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglucanos sulfatados ( $^{35}\text{S}$ -GAG) de los PG en cultivos de sedimento de 6 días de células progenitoras murinas (ADTC-5). \* =  $p < 0,05$  con respecto al control.

10  
Figura 13. Expresión génica por las células ATDC5 de colágeno tipo II y Sox-9 en cultivo de sedimento de 6 días incubado con diversas concentraciones de PPS en Medio de Mantenimiento (MM).

15  
Figura 14. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de la heparina sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglucanos sulfatados ( $^{35}\text{S}$ -GAG) de los PG en cultivos de sedimento de 6 días de células progenitoras murinas (ADTC-5). La heparina no presenta un efecto condrogénico por encima del intervalo de concentraciones de 1,25-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en esta estirpe celular.

20  
Figura 15. Gráficos de barras que muestran los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS), sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglucanos sulfatados ( $^{35}\text{S}$ -GAG) de los PG en cultivos de sedimento de 7 días de células progenitoras murinas (C3H10T1-2).

25  
Figura 16. Un gráfico de barras que muestra los efectos dependientes de la concentración del PPS sobre la síntesis de proteoglucanos por células progenitoras murinas (C3H10T1-2) en cultivos de micromasa durante 6 días y 9 días. El PPS estaba incluido en el medio (F12 de Ham + FCS al 10 %) y se cambió cada 48 horas. Se añadió  $^{35}\text{S}$ - $\text{SO}_4$  24 horas antes de la finalización del cultivo. Síntesis normalizada al contenido de ADN. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,0005$  con respecto a los controles.

30  
Figura 17. Gráficos de barras que muestran los efectos dependientes de la concentración del PPS sobre la síntesis de proteoglucanos por las células progenitoras humanas en cultivos de micromasa durante 5 días. Los datos se presentan como radioactividad  $^{35}\text{S}$ -GAG y como un porcentaje del control tomado como el 100 %. \*  $P < 0,05$  con respecto al control.

35  
Figura 18. A: Gráfico de barras que muestra la estimulación dependiente de la concentración de polisulfato de pentosano (PPS) de la producción de colágeno de tipo II por las células progenitoras humanas en cultivos de micromasa de 10 días como se determina por la exploración y el análisis digital de los cultivos de micromasa inmunoteñidos mostrados en B. (Véase el texto para más detalles).

40  
Figura 19. Gráficos de barras que muestran los efectos dependientes de la concentración de (A) hialuronano (Supartz™) y (B) polisulfato de dextrano sobre la síntesis de proteoglucanos por las células progenitoras humanas en cultivos de micromasa durante 5 días. Los datos se presentan como radioactividad  $^{35}\text{S}$ -GAG y como un porcentaje del control, tomado como el 100 % o como DPM/ $\mu\text{g}$  de ADN. \*  $P < 0,05$  con respecto al control.

45  
Figura 20. Muestra los resultados del cultivo de medio de crecimiento de células progenitoras humanas primarias complementado con PPS y/o ácido hialurónico (Supartz™), a las concentraciones indicadas. En diversos intervalos de tiempo (día 3 y 5), el medio de crecimiento se retiró y se reemplazó por medio sin rojo de fenol que contenía la sal de tetrazolio WST-1 durante 2 horas a 37 °C/ $\text{CO}_2$  al 5 %. La absorbancia a 450 nm para cada punto temporal se muestra para todas las concentraciones de PPS y HA. Este experimento demuestra que HA y PPS no actúan sinérgicamente para estimular la proliferación de las células progenitoras.

50  
Figura 21. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis*, en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y en presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglucanos sulfatados ( $^{35}\text{S}$ -GAG) de los PG después del cultivo de 3 días con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresaron como % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4.  $P < 0,05$  fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos control.

60  
Figura 22. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis*, en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y en presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) en cultivos de sedimento de células ATDC5. Los datos se muestran como el % de cambio con respecto a los controles tomados como el 100 %.

65



Figura 23. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis* más polisulfato de pentosano (PPS) (2 microgramos/ml), en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y en presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de ADN macromolecular como se determina por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina marcada radiactivamente después de un cultivo de 1 día con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresaron como el % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4. P < 0,05 fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos control.

Figura 24. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de combinaciones de rhNC4 (lote PBA-1202P) y polisulfato de pentosano (PPS) sobre la biosíntesis de <sup>35</sup>S-PG por cultivos monocapa de células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresan con respecto al control (medio de mantenimiento, MM) que se tomó como el 100 %.

Figura 25. Detección por RT-PCR de la expresión génica del marcador óseo Runx2, MGP, HAS3, CD44 y el gen constitutivo de NADPH expresado por las células progenitoras murinas ATDC5 cultivadas en presencia y ausencia de rhNC4 (Lote PBA-1209P) y PPS durante 2 días en cultivos en monocapa.

Figura 26. Detección por RT-PCR de la expresión génica de Runx2 y las proteínas de transducción, Smad 2 y Smad 4 y gen constitutivo de NADPH expresado por las células progenitoras murinas ATDC5 cultivadas en presencia y ausencia de rhNC4 (Lote PBA-1209P) y PPS durante 2 días en cultivos en monocapa.

Figura 27. Perfiles de elución cromatográfica que muestran los efectos de los polisacáridos polisulfatados sobre la biosíntesis de hialuronano (HA) por las células progenitoras, midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-glucosamina en el HA. En los paneles A-D se muestran perfiles cromatográficos Superdex-S200 de medio de células progenitoras humanas cultivadas de micromasa en presencia de diversas concentraciones de polisulfato de pentosano (PPS) durante 9 días. Antes de la digestión por hialasa los perfiles de radiactividad muestran la incorporación de <sup>3</sup>H-glucosamina tanto en el HA como en los PG por las células, pero después de la digestión solamente los <sup>3</sup>H-PG permanecen en el volumen vacío de la columna. El % de diferencia en las áreas debajo de los perfiles de las muestras digeridas y predigeridas en las fracciones de volumen vacío representa las cantidades de <sup>3</sup>H-HA liberadas en el medio por la concentración de PPS especificada.

Figura 28. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (Lote PBA-1202P) expresado por células de la levadura *K. lactis* en ausencia y presencia de insulina (10 microgramos/ml) sobre la síntesis de ADN como se determina por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en el ADN macromolecular, después de un cultivo de 3 días con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresan como el % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4. P < 0,01 fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos de control.

Figura 29 Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (Lote PBA-1202P) expresado por células de la levadura *K. lactis* sobre el número de células progenitoras murinas ATDC5, determinado usando un hemocitómetro, después de un cultivo de 3 días en ausencia y presencia de insulina (10 microgramos/ml). Los datos se expresan como % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4. P < 0,01 fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos de control.

Figura 30. Un gráfico de barras de la cinética del crecimiento de las células ATDC5 inducido por rhNC4 (lote PBA-1200P) (5 ug/ml) o insulina (10 ug/ml) con respecto al control durante 13 días. Se sembraron 20.000 células por pocillo el Día 0 (inicio) con cambios de medio cada 48 horas. Los cultivos tratados con insulina alcanzaron la confluencia el día 6 y los tratados con PBA-1200P el día 9. Los cultivos de control también alcanzaron la confluencia el día 9, pero al contrario que los cultivos que contenían insulina o PBA-1200P dejaron de experimentar replicación.

Figura 31. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis*, en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de los proteoglicanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglicanos sulfatados (<sup>35</sup>S-GAG) de los PG después de un cultivo de 3 días con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresaron como % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4. P < 0,05 fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos de control. La Fig 31 muestra que rhNC4 estimuló la síntesis de PG por las células progenitoras ATDC5 en presencia y en ausencia de insulina, pero más eficazmente a las concentraciones más altas en ausencia de insulina.

Figura 32. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS), en presencia de insulina (10 microgramos/ml), sobre la biosíntesis de proteoglicanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglicanos sulfatados (<sup>35</sup>S-GAG) de los PG después de un cultivo de 3 días con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresaron como radiactividad <sup>35</sup>S-GAG como recuentos por minuto (RPM) y desintegraciones por minuto (DPM)

con respecto a los cultivos de control que no contenían PPS.  $P < 0,05$  fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos de control. La Fig. 32 muestra la estimulación dependiente de la concentración de la síntesis de PG por las células progenitoras murinas ATDC5 en presencia de PPS.

5 Figura 33. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis* más polisulfato de pentosano de sodio (PPS) (2 microgramos/ml), en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y en presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de proteoglicanos (PG) como se determina por la incorporación de glucosamina marcada radiactivamente en los glucosaminoglicanos ( $^3\text{H}$ -GAG) de los PG después de un cultivo de 1 día con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresaron como el % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4.  $P < 0,05$  fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos de control.

15 Figura 34. Un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS) en presencia de insulina (10 microgramos/ml) sobre la síntesis de ADN (replicación celular), como se determina por la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en el ADN macromolecular después de un cultivo de 3 días con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresan como el % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían PPS.

20 Figura 35. SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos para NC4 humano de longitud completa sin péptido señal.

Figura 36. SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos para hNC4 truncado obtenido durante la expresión a partir de cultivos de *K. lactis* por acción supuesta por prolina endopeptidasa.

25 Figura 37. Una composición de secuencia entre secuencias de NC4 bovino, humano, murino y de pollo.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención ilustradas y ejemplificadas

30 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un polipéptido" incluye una pluralidad de polipéptidos, incluyendo mezclas de los mismos.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" se tomará para indicar que un número entero especificado se obtiene a partir de una fuente en particular, aunque no necesariamente directamente de esa fuente.

Una "composición" tiene por objeto significar una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marca detectable) o activo, tal como un adyuvante.

40 A menos que el contexto requiera otra cosa o indique específicamente lo contrario, los números enteros, etapas o elementos de la invención citados en el presente documento como números enteros, etapas o elementos singulares abarcan claramente formas tanto singulares como plurales de los números enteros, etapas o elementos citados.

45 Las realizaciones de la invención descrita en el presente documento con respecto a cualquier realización única se tomarán como que se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, a cualquier otra realización de la invención descrita en el presente documento.

50 En toda la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende", implican la inclusión de una etapa o elemento o número entero o grupo de etapas o elementos o números enteros indicados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

55 Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

60 La presente invención no está limitada en su alcance por los ejemplos específicos descritos en el presente documento. Productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención, como se describe en el presente documento.

65 La presente invención se realiza sin experimentación excesiva usando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en solución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en los siguientes textos que se incorporan en el presente documento por referencia:

1. Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda edición (1989), volúmenes I, II, y III completos;
2. *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo;
3. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y en particular los artículos del mismo de Gait, págs. 1-22; Atkinson et al., págs. 35-81; Sproat et al., págs. 83-115; y Wu et al., págs. 135-151;
4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, texto completo;
5. Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984);
6. Wiinsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Miiler, E., ed.), vol. 15, 4ª edición, Partes 1 y 2, 30 Thieme, Stuttgart.
7. *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)

### Células progenitoras

La presente invención se refiere a células progenitoras. En su realización más amplia, la expresión células progenitoras tiene por objeto abarcar cualquier célula multipotente. Por tanto, la expresión célula progenitora abarca células madre adultas y embrionarias.

La célula progenitora puede ser una célula progenitora mesenquimatosa.

La célula progenitora puede ser una célula mesenquimatosa o progenitora mesenquimatosa, embrionaria o adulta, endógena o exógena. La célula progenitora puede ser una célula estromal multipotente. La célula progenitora puede ser una célula mesenquimatosa indiferenciada adulta.

La célula progenitora puede ser una célula condroprogenitora.

Las células progenitoras pueden derivar de la médula ósea. Como alternativa, las células progenitoras pueden derivar de cartílago, tejido sinovial, músculo, tejido adiposo, piel, cordón umbilical, pulpa dental u otras fuentes disponibles.

Las células progenitoras pueden ser una célula somática, tal como células del tejido conectivo reprimidas de la diferenciación por factores endógenos.

En una realización adicional, las células progenitoras son una población de células enriquecidas para Stro-1<sup>bri</sup>, o células Stro-1<sup>bri</sup> homogéneas o células de progenie Stro-1<sup>bri</sup>.

Un tipo de célula progenitora es una célula progenitora mesenquimatosa (CPM). Originalmente derivadas de médula ósea, se ha identificado que las células CPM y similares a CPM existen en y pueden aislarse de un gran número de tejidos adultos, en los que se postula que realizan la función de reemplazo y regeneración de células locales que se pierden en el recambio, la lesión o el envejecimiento normal del tejido. Estos tejidos incluyen adiposo, periostio, membrana sinovial, fluido sinovial (FS), músculo, dermis, dientes de leche, pericitos, hueso trabecular, almohadilla de grasa infrarrotuliana y cartílago articular.

Las CPM pueden definirse retrospectivamente por una constelación de características *in vitro*, incluyendo una combinación de marcadores fenotípicos y propiedades funcionales de diferenciación multipotencial.

Aunque la adherencia al plástico sirve como el procedimiento de aislamiento más utilizado y simple para las células mesenquimatosas, también se han utilizado diversos marcadores de superficie positivos y negativos (por ejemplo, Stro-1, CD146/molécula de adhesión a células de melanoma, CD271/factor de crecimiento de nervios de baja afinidad y antígeno 4 embrionario específico de etapa) para enriquecer el rendimiento y la homogeneidad de CPM. Además, también puede usarse un panel adicional de marcadores de superficie, incluyendo CD140b (receptor-D factor de crecimiento derivado de plaquetas), CD340 (HER-2/erbB2) y CD349 (frizzled-9) junto con CD217 para el enriquecimiento de CPM.

Células progenitoras adicionales incluyen células progenitoras murinas, incluyendo las estirpes celulares C3H10T1/2 y ATDC5 o las células progenitoras M111. C3H10T1/2 son una estirpe de células madre progenitoras derivadas de la médula ósea de la cepa de ratones C3H/He hembra con morfología similar a fibroblastos. Las células ATDC5 son una estirpe celular condroprogenitora derivada de ratón embrionario con morfología similar a la epitelial.

La estirpe celular C3H10T1/2 se estableció en 1973 a partir de embriones de ratón C3H de 14 a 17 días de edad. Estas células muestran una morfología fibroblástica en cultivo celular y son funcionalmente similares a las células madre mesenquimatosas. La inhibición de la metilación en células C3H10T1/2 con 5-azacitidina produce características morfológicas y bioquímicas estables de células de músculo, tejido adiposo, hueso o cartílago. Se

sugiere que esta alteración fenotípica es resultado de la activación de genes endógenos en respuesta al bloqueo de la metilación. Además se ha demostrado que la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), un miembro de la superfamilia de tipo beta del factor de crecimiento transformante, puede inducir el compromiso de las células C3H10T1/2 a preadipocitos que, cuando se somete a un protocolo de diferenciación de adipocitos, se desarrollan a células del fenotipo adipocito (Tang Qi-Qun, Otto TC, Lane MD. *Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. Pro Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 9607-9611).

La estirpe celular ATDC55 se aisló originalmente de un cultivo diferenciador de teratocarcinoma AT805. Las células ATDC5 expresan un fenotipo de célula fibroblástica en una fase de crecimiento. Puede encontrarse información adicional sobre la estirpe celular ATDC5 en Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y. *A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. Cell Differ Dev.* 1990; 30: 109-16.

Las células progenitoras pueden ser una población de células enriquecidas para Stro-1<sup>bri</sup>. Las células progenitoras pueden ser células Stro-1<sup>bri</sup> homogéneas o células de progenie Stro-1<sup>bri</sup>.

Las células Stro-1<sup>bri</sup> son células que se encuentran en médula ósea, sangre, células de la pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, ganglio linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periostio; y normalmente son capaces de diferenciarse en estirpes germinales, tales como mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo. De este modo, las células Stro-1<sup>bri</sup> son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos celulares incluyendo, pero no limitados a, tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conectivo fibroso. El compromiso de linaje específico y la vía de diferenciación a los que entran estas células dependen de diversas influencias entre influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos del hospedador. Las células Stro-1<sup>bri</sup> pueden, por tanto, ser células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son ya sea células madre o células precursoras que con el tiempo irreversiblemente se diferencian para producir una célula fenotípica.

En una realización adicional, las células Stro-1<sup>bri</sup> se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que se ha de tratar o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o diferente). Los términos 'enriquecido', 'enriquecimiento' o variaciones de los mismos se usan en el presente documento para describir una población de células en la que la proporción de un tipo celular particular o la proporción de una serie de tipos celulares particulares aumentan en comparación con la población sin tratar.

En una realización adicional, las células utilizadas en la presente invención expresan uno o más marcadores individual o colectivamente seleccionados entre el grupo que consiste en TNAP<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, THY-1<sup>+</sup>, STRO-2<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD146<sup>+</sup>, 3G5<sup>+</sup> o cualquier combinación de los mismos.

Por "individual" se entiende que la invención abarca los marcadores o grupos de marcadores citados por separado, y que, a pesar de que los marcadores individuales o grupos de marcadores no pueden enumerarse por separado en el presente documento las reivindicaciones adjuntas pueden definir dicho marcador o grupos de marcadores por separado y de forma divisible entre sí.

Por "colectivamente" se entiende que la invención abarca cualquier número o combinación de los marcadores o grupos de péptidos citados, y que, a pesar de que dichos números o combinaciones de marcadores o grupos de marcadores no pueden enumerarse específicamente en el presente documento, las reivindicaciones adjuntas pueden definir dichas combinaciones o subcombinaciones por separado y de forma divisible de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.

En una realización, las células Stro-1<sup>bri</sup> son, adicionalmente, uno o más de TNAP<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, THY-1<sup>+</sup>, STRO-2<sup>+</sup> y/o CD146<sup>+</sup>.

Una célula denominada "positiva" para un marcador dado puede expresar ya sea un nivel bajo (ba o tenue) o un nivel alto (brillante, bri) de ese marcador dependiendo del grado al que el marcador está presente sobre la superficie celular, donde los términos se refieren a la intensidad de la fluorescencia u otro marcador utilizado en el proceso de clasificación de las células. La distinción de ba (o tenue u opaco) y cla se entenderá en el contexto del marcador utilizado sobre una población celular particular que se clasifique. Una célula denominada "negativa" para un marcador dado no está necesariamente completamente ausente de esa célula. Este término significa que el marcador se expresa a un nivel relativamente muy bajo por esa célula, y que genera una señal muy baja cuando se marcan de forma detectable o no es detectable por encima de los niveles de fondo.

El término "brillante", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando está marcada de forma detectable. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se propone que las células "brillantes" expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células de la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1<sup>bri</sup> producen una mayor señal fluorescente, cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC como se determina mediante el análisis por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), que las células no brillantes (STRO-1<sup>opaco/tenue</sup>). En una realización, las células "brillantes" constituyen al menos

aproximadamente el 0,1 % de las células mononucleares de médula ósea más brillantemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En otras realizaciones, las células "brillantes" constituyen al menos aproximadamente el 0,1 %, al menos aproximadamente el 0,5 %, al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 1,5 % o al menos aproximadamente el 2 %, de las células mononucleares de médula ósea más brillantemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En una realización adicional, las células STRO-1<sup>brillante</sup> tienen una expresión mayor en magnitud 2 log de expresión de superficie de STRO-1 con respecto al "fondo", es decir, células que son STRO-1<sup>ténue</sup> y/o STRO-1<sup>intermedio</sup> tienen una expresión mayor en magnitud inferior a 2 log de expresión de superficie de STRO-1, normalmente de aproximadamente 1 log o menos que el "fondo".

Como se usa en el presente documento, el término "TNAP" tiene por objeto abarcar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma de riñón (KAP). En una realización adicional, la TNAP es BAP. En una realización adicional, TNAP como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que puede unirse el anticuerpo STRO-3 producida por la estirpe celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 a tenor de las disposiciones del Tratado de Budapest con el número de acceso de depósito PTA-7282.

Además, en una realización adicional, las células Stro-1<sup>bri</sup> son capaces de originar CFU-F clonogénica.

En una realización, una proporción significativa de las células multipotenciales es susceptible de diferenciación en al menos dos estirpes germinales diferentes. Los ejemplos no limitantes de los linajes a los que pueden comprometerse las células multipotenciales incluyen células precursoras de hueso; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para células epiteliales del conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores para músculo cardíaco y cardiomiocitos, estirpes celulares beta pancreáticas que secretan insulina sensibles a la glucosa. Otros linajes incluyen, pero no se limitan a, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos, y células precursoras de las siguientes: células epiteliales del pigmento retiniano, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocitos, fibroblastos, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericitos, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocitos.

En otra realización, las células Stro-1<sup>bri</sup> no son capaces de dar lugar, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

En una realización, las células se toman del sujeto que se ha de tratar, se cultivan *in vitro* usando técnicas convencionales y se usan para obtener células expandidas para la administración al sujeto en forma de una composición autóloga o alógena. En una realización alternativa, se usan células de una o más de las estirpes celulares humanas establecidas. En otra realización útil de la invención, se usan células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie).

La presente invención también contempla el uso de sobrenadante o factores solubles obtenidos o derivados de células Stro-1<sup>bri</sup> y/o células de progenie de las mismas (las últimas también se denominan células expandidas), que se producen a partir de un cultivo *in vitro* en combinación con las células progenitoras. Las células expandidas de la invención pueden tener una amplia diversidad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o el tipo de factores estimuladores en el medio de cultivo), el número de pases y similares. En ciertas realizaciones, las células de progenie se obtienen después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 pases de la población parental. Sin embargo, las células de progenie pueden obtenerse después de cualquier número de pases de la población parental.

Las células de progenie pueden obtenerse mediante el cultivo en cualquier medio adecuado. El término "medio", como se usa con respecto a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. Los medios gaseosos de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que están expuestas las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también se refiere al material que tiene por objeto su uso en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua u otro líquido se convierte en adecuado para el cultivo celular puede denominarse un "medio en polvo".

En una realización, se obtienen células de progenie útiles para los métodos de la invención mediante el aislamiento de células multipotenciales TNAP<sup>+</sup> STRO-1<sup>+</sup> de médula ósea usando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3 y, después, la expansión en cultivo de las células aisladas (véase Gronthos et al. *Blood* 85:929-940, 1995 para un ejemplo de condiciones de cultivo adecuadas).

En una realización, dichas células expandidas (progenie) (opcionalmente al menos después de 5 pases) pueden ser TNAP<sup>-</sup>, CC9<sup>+</sup>, HLA de clase I<sup>+</sup>, HLA de clase II<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD11a<sup>-</sup>c<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> y/o CD80<sup>-</sup>. Sin embargo, es posible que en condiciones de cultivo diferentes a las descritas en el presente documento la expresión de diferentes marcadores pueda variar. Además, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población celular expandida no significa que haya una proporción menor de las células que no tienen este fenotipo o fenotipos (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9<sup>-</sup>). En una realización, las células expandidas aún tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares.

En una realización, una población de células expandidas utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células en sí, comprende células en las que al menos el 25 %, en una realización adicional, al menos el 50 %, de las células son CC9<sup>+</sup>.

En otra realización, una población celular expandida utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células en sí, comprende células en las que al menos el 40 %, en una realización adicional, al menos el 45 %, de las células son STRO-1<sup>+</sup>.

En una realización adicional, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores colectiva o individualmente seleccionados entre el grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-1<sup>brillante</sup> y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

En una realización, las células de progenie derivadas de las células STRO-1<sup>bri</sup> son positivas para el marcador Stro-1<sup>tenue</sup>. Estas células se denominan Células Comprometidas Específicas de Tejido (CCET) y están más comprometidas a la diferenciación que las células STRO-1<sup>bri</sup>, por tanto, son menos capaces de responder a factores inductores. Los ejemplos no limitantes de los linajes a los que pueden comprometerse las CCET incluyen los progenitores de hepatocitos, que son pluripotentes para las células epiteliales del conducto biliar y los hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos, y precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores para el músculo cardíaco y los cardiomiocitos, estirpes de células beta pancreáticas que secretan insulina sensibles a glucosa. Otras células precursoras comprometidas incluyen, pero no se limitan a, condrocitos, osteoblastos, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos, y células precursoras de los siguientes: células epiteliales del pigmento retiniano, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocitos, fibroblastos, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericitos, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocito. Los precursores incluyen aquellos que pueden conducir específicamente a tejido conectivo incluyendo, en particular, los tejidos adiposo, areolar, óseo, cartilaginoso, elástico y conectivo fibroso.

En otra realización, las células de progenie son células de progenie multipotenciales STRO-1<sup>+</sup> expandidas multipotenciales (MEMP, por sus siglas en inglés) tal como se definen y/o describen en el documento WO 2006/032092. Se describen métodos para preparar poblaciones enriquecidas de células multipotenciales STRO-1<sup>+</sup> a partir de las que puede derivar la progenie en el documento WO 01/04268 y el documento WO 2004/085630. En un contexto *in vitro* las células multipotenciales STRO-1<sup>+</sup> rara vez están presentes como una preparación absolutamente pura y, en general, estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (CCET). El documento WO 01/04268 se refiere a la producción de dichas células a partir de médula ósea con unos niveles de pureza de aproximadamente el 0,1 % al 90 %. La población que comprende células progenitoras de las cuales deriva la progenie puede producirse directamente a partir de una fuente de tejido, o, como alternativa, puede ser una población que ya se ha expandido *ex vivo*.

Por ejemplo, la progenie puede obtenerse de una población obtenida, sin expandir, de células multipotenciales STRO-1<sup>+</sup> sustancialmente purificadas, que comprende al menos aproximadamente el 0, el 1, el 5, el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80 o el 95 % de las células totales de la población en la que están presentes. Este nivel puede conseguirse, por ejemplo, mediante la selección de células que son positivas para al menos un marcador individual o colectivamente seleccionado entre el grupo que consiste en TNAP, STRO-1<sup>brillante</sup>, 3G5<sup>+</sup>, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.

Las MEMP pueden distinguirse de las células Stro-1<sup>bri</sup> recién obtenidas en que son positivas para el marcador STRO-1<sup>bri</sup> y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). Por el contrario, las células Stro-1<sup>bri</sup> recién aisladas son positivas tanto para STRO-1<sup>bri</sup> como para ALP. En una realización adicional de la presente invención, al menos el 15 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 % de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1<sup>bri</sup>, ALP<sup>-</sup>. En una realización adicional las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, α3β1. En una realización adicional más, las MEMP no presentan actividad TERT y/o son negativos para el marcador CD18.

La población de partida de células Stro-1<sup>bri</sup> puede derivar de uno cualquiera o más tipos de tejidos, incluyendo la médula ósea, las células de la pulpa dental, el tejido adiposo y la piel, o tal vez, más ampliamente, de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

5 Se entenderá que en la realización de la presente invención, la separación de células que llevan cualquier marcador de superficie celular dado puede efectuarse mediante una serie de diferentes métodos, sin embargo, ciertos métodos se basan en la unión de un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) al marcador en cuestión seguida de una separación de aquellos que presentan unión, siendo ya sea  
10 unión de alto nivel o unión de bajo nivel o ninguna unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas a base de anticuerpos, siendo preferentemente anticuerpos monoclonales o a base de anticuerpos monoclonales, debido a la especificidad de estos últimos agentes. Pueden usarse anticuerpos para ambas etapas, sin embargo, también podrían usarse otros agentes, por tanto, también pueden emplearse ligandos para estos marcadores para enriquecer en células que los lleven o que carezcan de ellos.

15 Los anticuerpos o ligandos pueden unirse a un soporte sólido para permitir una separación en bruto. Las técnicas de separación maximizan preferentemente la retención de la viabilidad de la fracción que se ha de recoger. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente en bruto. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y la rapidez de  
20 ejecución y la necesidad de equipo sofisticado y/o de habilidad técnica. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero no se limitan a, separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, cromatografía de afinidad y "selección" con anticuerpo unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, pero no se limitan a FACS. Los métodos para realizar FACS serán evidentes para el experto en la materia.

25 Los anticuerpos frente a cada uno de los marcadores descritos en el presente documento están disponibles en el mercado (por ejemplo, hay anticuerpos monoclonales frente a STRO-1 disponibles en el mercado de R&D Systems, EE.UU.), disponibles de ATCC u otra organización depositaria y/o pueden producirse usando técnicas reconocidas en la técnica.

30 Se prefiere que el método para aislar células Stro-1<sup>bri</sup>, por ejemplo, comprenda una primera etapa que sea una etapa de clasificación de fase sólida utilizando, por ejemplo, la clasificación de células magnética activada (MACS) que reconoce la expresión de alto nivel de STRO-1. Después, puede seguirle una segunda etapa de clasificación, si así se desea, para dar lugar a un mayor nivel de expresión de células precursoras. Esta segunda etapa de clasificación  
35 podría implicar el uso de dos o más marcadores.

40 El método que obtiene células Stro-1<sup>bri</sup> también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento usando técnicas conocidas. Por tanto, el tejido se eliminará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido fuente después se separarán en una denominada suspensión de células individuales. Esta separación puede conseguirse por medios físicos y o enzimáticos.

Una vez que se ha obtenido una población de células Stro-1<sup>bri</sup> adecuada, puede cultivarse o expandirse por cualquier medio adecuado para obtener MEMP.

45 En una realización, las células se toman del sujeto que se trata, se cultivan *in vitro* usando técnicas convencionales y se usan para obtener sobrenadante o factores solubles o células expandidas para la administración al sujeto como una composición autóloga o alógena. En una realización alternativa, se usan células de una o más de las estirpes celulares humanas establecidas para obtener los sobrenadante o factores solubles. En otra realización útil de la invención, se usan células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie) para  
50 obtener sobrenadante o factores solubles.

La invención puede realizarse usando células de cualquier especie animal no humana, incluyendo, pero no limitadas a células de primates no humanos, células de ungulados, caninos, felinos, lagomorfos, roedores, aves y peces. Las células de primates con las que la invención puede realizarse incluyen, pero no se limitan a, células de chimpancés, babuinos, macacos, monos y cualquier otro mono del Nuevo o del Viejo Mundo. Las células de ungulados con las que la invención puede realizarse incluyen, pero no se limitan a, células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes. Las células de roedores con las que la invención puede realizarse incluyen, pero no se limitan a, células de ratón, rata, cobaya, hámster y gerbo. Los ejemplos de especies de lagomorfos con las que la invención puede realizarse incluyen conejos domésticos, liebre de California, liebres, liebre de Florida, liebre de  
60 América y pikas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la que la invención puede realizarse.

Pueden almacenarse células útiles para los métodos de la invención antes de su uso o antes de obtener sobrenadante o factores solubles. Se conocen en la técnica métodos y protocolos para la conservación y el  
65 almacenamiento de células eucariotas y, en particular, células de mamíferos, (consúltese, por ejemplo, Pollard, J.W. y Walker, J.M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, segunda edición, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R.I.

(2000) *Culture of Animal Cells*, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.).

#### Células modificadas genéticamente

5 En una realización, las células Stro-1<sup>bri</sup> y/o células de progenie de las mismas se modifican genéticamente, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés, por ejemplo, una proteína que proporciona un beneficio terapéutico y/o profiláctico, por ejemplo, insulina, glucagón, somatostatina, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa pancreática o amilasa o un polipéptido asociado a o causante de la angiogénesis  
10 potenciada o un polipéptido asociado a la diferenciación de una célula en una célula pancreática o una célula vascular.

Los métodos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, un ácido nucleico que se ha de expresar en una célula está ligado operativamente a un promotor para inducir la expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico está ligado a un promotor operable en una diversidad de  
15 células de un sujeto, tal como, por ejemplo, un promotor viral, por ejemplo, un promotor de CMV (por ejemplo, un promotor de CMV-IE) o un promotor de SV-40. Se conocen promotores adecuados adicionales en la técnica y se tomarán como aplicables haciendo los cambios necesarios a la presente realización de la invención.

En una realización, el ácido nucleico se proporciona en forma de una construcción de expresión. Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de expresión" se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de conferir expresión a un ácido nucleico (por ejemplo, un gen indicador y/o un gen indicador contra-seleccionable) al que está conectado operativamente, en una célula. En el contexto de la presente invención, se ha de entender que una construcción de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagémido, cósmido, fragmento sub-genómico o genómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un  
20 formato expresable.

Serán evidentes para el experto en la materia métodos para la construcción de una construcción de expresión adecuada para la realización de la invención y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al (en: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook et al (En: *Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición, 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes de la construcción de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico molde adecuado usando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en una construcción de expresión adecuada, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.  
30

Se conocen en la técnica y/o se describen en el presente documento vectores adecuados para una construcción de expresión de este tipo. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para el método de la presente invención en una célula de mamífero es, por ejemplo, un vector del juego de vectores de pcDNA suministrado por Invitrogen, un vector del juego de vectores pCI (Promega), un vector del juego de vectores pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector psi (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector vector del juego de vectores pcDNA (Invitrogen).  
35  
40

El experto en la materia será consciente de vectores adicionales y fuentes de dichos vectores, tales como, por ejemplo, Invitrogen Corporation, Clontech o Promega.

45 Se conocen medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o una construcción génica que comprende la misma en una célula para su expresión por los expertos en la materia. La técnica utilizada para un organismo dado depende de las técnicas satisfactorias conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en las células incluyen la microinyección, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por liposomas, tal como mediante el uso de lipofectamina (Gibco, MD, EE.UU.) y/o cellfectina (Gibco, MD, EE.UU.), la captación de ADN mediada por PEG, la electroporación y el bombardeo de micropartículas tal como mediante el uso de partículas de tungsteno u oro recubiertas de ADN (Agracetus Inc., WI, EE.UU.), entre otros.  
50

Como alternativa, una construcción de expresión de la invención es un vector vírico. Se conocen en la técnica vectores víricos adecuados y están disponibles en el mercado. Los sistemas a base de virus convencionales para la entrega de un ácido nucleico y la integración de ese ácido nucleico en un genoma de célula hospedadora incluyen, por ejemplo, un vector retrovírico, un vector lentivírico o un vector vírico adeno-asociado. Como alternativa, un vector adenovírico es útil para la introducción de un ácido nucleico que permanece episómico en una célula hospedadora. Los vectores víricos son un método eficiente y versátil de transferencia génica en las células y los tejidos diana. Adicionalmente, se han observado altas eficiencias de transducción en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.  
55  
60

Por ejemplo, un vector retrovírico generalmente comprende repeticiones terminales largas de actuación en cis (LTR, por sus siglas en inglés) con capacidad de empaquetamiento para hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Las LTR de actuación en cis mínimas son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de un vector, que después se usa para integrar la construcción de expresión en la célula diana para proporcionar la expresión a largo plazo. Los vectores retrovíricos utilizados ampliamente incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el  
65



virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia de simio (SRV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J Virol.* 56:2731-2739 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., *Virology* 76:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:274-2318 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); document PCT/US94/05700; Miller y Rosman *BioTechniques* 7:980-990, 1989; Miller, A. D. *Human Gene Therapy* 7:5-14, 1990; Scarpa et al *Virology* 75:849-852, 1991; Burns et al. *Pro. Natl. Acad. Sci USA* 90:8033-8037, 1993).

También se han desarrollado diversos sistemas de vectores de virus adeno-asociado (AAV) para la entrega de ácido nucleico. Pueden construirse vectores de AAV fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.173.414 y 5.139.941.; las Publicaciones Internacionales N.º WO 92/01070 y WO 93/03769.; Lebkowski et al. *Molec. Cell. Biol.* 5:3988-3996, 1988; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter *Current Opinion in Biotechnology* 5:533-539, 1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol, and Immunol.* 158:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling y Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; y Zhou et al. *J Exp. Med.* 179:1867-1875, 1994.

Los vectores víricos adicionales útiles para la entrega de una construcción de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de la familia de virus de la viruela, tales como el virus de la viruela y el virus de la viruela aviar o un alfavirus o un vector de virus conjugado (por ejemplo, el que se describe en Fisher-Hoch et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:317-321, 1989).

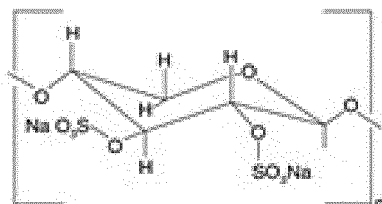
En una realización adicional, las células progenitoras son una población de células enriquecidas para Stro-3<sup>bri</sup>, o células Stro-3<sup>bri</sup> homogéneas, o células de progenie Stro-3<sup>bri</sup>.

Polisacáridos polisulfatados

La presente invención también se refiere al uso de polisulfato de pentosano.

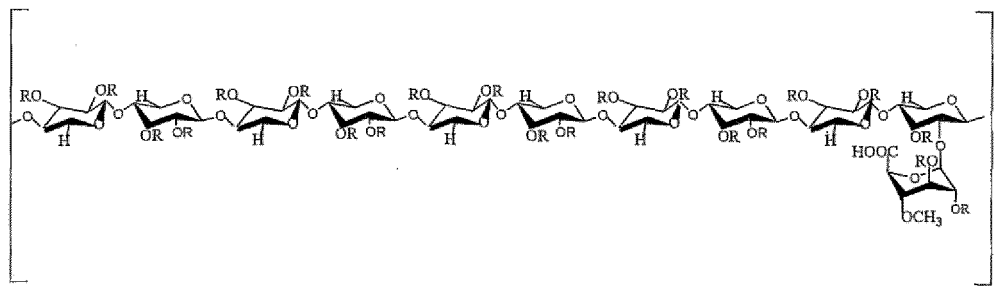
Una lista específica de polisulfatos de pentosano incluye polisulfato de pentosano de calcio, polisulfato de pentosano de magnesio y polisulfato de pentosano de sodio.

La estructura básica del PPS consiste en pentosas, es decir, unidades de beta-D-xilopiranosas con enlaces (1 → 4) que contienen grupos ácido glucurónico estadísticamente cada décima unidad.



A continuación, se muestra la fórmula estructural de un polisulfato de pentosano (PPS) aislado de hemicelulosa de madera de haya (*Fagus silvatica*). Esta fórmula muestra que la estructura principal de xilano lineal (pentosano) de polisulfato de pentosano contiene en promedio una cadena lateral de 4-O-metil-glucuronato enlazada a la posición 2 en cada décimo anillo de xilosa (pentosa).

Los derivados de calcio y de magnesio de PPS (CaPPS o MgPPS) es cuando R = SO<sub>3</sub>-Ca<sup>+</sup> 1/2 o Mg<sup>+</sup> 1/2. El derivado de sodio es cuando R = SO<sub>3</sub>-Na.



El polisulfato de pentosano como su sal de calcio o de sodio tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5700 Dalton y un contenido de azufre de aproximadamente el 16 %. Se sabe desde principios de la década de 1960 que este compuesto es un heparinoide sintético y un agente antitrombótico.

Los iones complejantes particulares pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en los metales alcalinos, por ejemplo,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , metales alcalinotérreos, por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , así como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Au}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{4+}$ ,  $\text{Pt}^{4+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ , iones de metales trivalentes y complejos de compuestos de amonio cuaternario. Son ejemplos de los últimos compuestos cloruro de piridinio, cloruro de tetraalquil amonio, cloruro de colina, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de N-cetil-N,N,N-trialquilamonio o sus derivados. En una realización particular, se usa el complejo de calcio.

La preparación de los complejos de polisacárido polisulfatado-metal se describe en detalle en la patente de los EE.UU. 5.668.116, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia.

Puede encontrarse información adicional relacionada con polisacáridos polisulfatados y PPS en el documento WO02/41901, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia. También puede encontrarse información adicional en *Semin Arthritis Rheum*. Febrero de 1999; 28(4):211-67 Ghosh - *The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment*.

En una realización, el polisacárido polisulfatado es polisulfato de pentosano de sodio. Un ejemplo de éste es SP54, fabricado por Bene Pharmachem, Alemania, que es un polisacárido, esterificado con ácido sulfúrico, más específicamente un polisulfato de pentosano de sodio. La producción semisintética de polisulfato de pentosano de sodio asegura la fabricación uniforme y reproducible con un intervalo definido de pesos moleculares (de 4000 a 6000 Dalton).

La preparación de los complejos de polisulfato de pentosano-metal se describe en detalle en la patente de los EE.UU. 5.668.116.

Puede encontrarse información adicional relacionada con polisulfato de pentosano PPS en el documento WO02/41901. Puede encontrarse información adicional en *Semin Arthritis Rheum*. Febrero de 1999; 28(4):211-67 Ghosh - *The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment*.

En particular, los métodos de fabricación, aislamiento y purificación junto con composiciones y formulaciones de vehículos adecuados se incorporan en la presente solicitud.

También puede encontrarse información adicional en Ghosh P, Edelman J, March L y Smith M. *Effects of pentosan polysulfate in osteoarthritis of the knee: A randomised, double blind, placebo-controlled pilot study*. *Current Therapeutic Research*, 2005, 66: 552-571 y que proporciona información sobre un estudio clínico de OA usando PPS administrado por inyección intramuscular. La información acerca de PPS, y los métodos utilizados en el ensayo, incluyendo las pautas de dosificación y métodos de administración, se incorporan por referencia en la presente solicitud.

#### Dominio no colagenoso NC4 de colágeno alfa IX

De acuerdo con una realización adicional, el polipéptido elegido es un dominio no colagenoso NC4 de colágeno alfa IX o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo. Puede encontrarse información específica sobre polipéptidos de dominio NC4 adecuados puede encontrarse en la solicitud internacional PCT/AU2004/000788.

En particular, el documento PCT/AU2004/000788 desvela una serie de polipéptidos y sus secuencias que pueden usarse en la presente invención junto con formas de expresar y purificar los polipéptidos. Por tanto, el documento PCT/AU2004/000788 incluye ejemplos de polipéptidos de dominio NC4 adecuados y formas de hacerlos que se incorporan específicamente en la presente memoria descriptiva. En particular, las secuencias de aminoácidos como se establecen en la página 7 líneas 24 a página 8 línea 6 junto con las secuencias como se establecen en las figuras 1-7 se incorporan específicamente en la presente solicitud. Además, los métodos de recuperación de polipéptidos tal como se establecen en la página 9 línea 10 a la página 10 línea 36 se incorporan específicamente en la presente solicitud. Las técnicas de autólisis establecidas en la descripción detallada de la página 15 junto con las etapas de separación y recuperación establecidas en la descripción detallada de la página 18 y, específicamente, los polipéptidos como se establecen en las páginas 20-24 se incorporan en la presente invención. Por último, la secuencia parcial de aminoácidos de la figura 7 se incorpora en la presente solicitud.

Como se ha dicho anteriormente, el dominio NC4 se analiza en el documento PCT/AU2004/000788. Éste incluye la secuencia completa de aminoácidos predicha a partir de la secuencia del gen y obtenida por expresión en *E. coli* (véase la Tabla 1).

Sin embargo, cabe señalar que los productos de proteína obtenidos por expresión usando *K. lactis* consistían en el NC4 humano de longitud completa más una forma truncada (PM = 24 kDa), estando ambas formas glicosiladas, éstos también se incluyen en la Tabla 1 y su preparación e identificación se describen en la sección de métodos. Ambas proteínas expresadas por *E. coli* y *K. lactis* se evaluaron en modelos animales y ensayos *in vitro* y pueden identificarse por los códigos AWR-01 y PBA-1200P respectivamente. La célula progenitora utilizada en estos experimentos fue la ATDC5 de ratón que está disponible en el mercado, como se analiza en la sección de métodos.

Las células diferenciadas utilizadas incluyeron: condrocitos de cartílago de articulación humano, cartílago ovino y porcino normal y condrocitos y fibroblastos sinoviales derivadas de tejido sinovial de pacientes con OA que experimentaron cirugía de reemplazo de la articulación total.

5 En particular, las siguientes secuencias también definen polipéptidos para su uso en la presente solicitud.

**TABLA 1 - Secuencias de aminoácidos de interés pero mostradas sin glicosilación de N o O**

**SEQ ID NO: 1**

10 **1) hNC4: (NC4 humano de longitud completa sin péptido señal)**

10	20	30	40	50	60
AVKRRPRFPV	NSNSNGGNEL	CPKIRIGQDD	LPGFDLISQF	QVDKAASRRA	IQRVVG SATL
70	80	90	100	110	120
QVAYKLGNNV	DFRIPTRNLY	PSGLPEEYSF	LTTFRMTGST	LKKNWNIWQI	QDSSGKEQVG
130	140	150	160	170	180
IKINGQTQSV	VFSYKGLDGS	LQTAAFSNLS	SLFDSQWHKI	MIGVERSSAT	LFVDCNRIES
190	200	210	220	230	240
LPIKPRGPID	IDGFAVLGKL	ADNPQVSVPF	ELQWMLIHCD	PLRPRRETCH	ELPARITPSQ

TTDER

**SEQ ID NO: 2**

15 **2) hNC4 truncado (restos 6-224) obtenidos durante la expresión a partir de cultivos de *K. lactis* por acción supuesta por prolina endopeptidasa:**

10	20	30	40	50	60
RFPVNSNSNG	GNELCPKIRI	GQDDLPGFDL	ISQFQVDKAA	SRRAIQRVVG	SATLQVAYKL
70	80	90	100	110	120
GNNVDFRIPT	RNLYPSGLPE	EYSFLTTFRM	TGSTLKKNWN	IWQIQDSSGK	EQVGIKINGQ
130	140	150	160	170	180
TQSVVFSYKG	LDGSLQTAAF	SNLSSLFDSQ	WHKIMIGVER	SSATLFVDCN	RIESLPIKPR
190	200	210			
GPIDIDGFAV	LGKLADNPQV	SVPFELQWML	IHCDPLRP		

20 **3) Secuencias subrayadas en rojo en negrita que se identificaron mediante proteómica y se describieron en la Solicitud de Patente PCT/AU2004/000788**

1 Met Lys Thr Cys Trp Lys Ile Pro Val Phe Phe Phe Val Cys Ser 16 Phe Leu Glu Pro  
 Trp Ala Ser Ala 23 Ala Val Lys Arg Arg **Pro Arg 31 Phe Pro Val Asn Ser Asn Ser**  
**Asn Gly Gly Asn Glu Leu Cys Pro 46 Lys Ile Arg Ile Gly Gln Asp Asp Leu Pro**  
**Gly Phe Asp Leu Ile 61 Ser Gln Phe Gln** Val **Asp Lys Ala Ala Ser Arg Arg Ala Ile**  
**Gln 76 Arg Val Val Gly Ser** Ala Thr **Leu Gln Val Ala Tyr Lys Leu Gly 91 Asn Asn**  
**Val Asp Phe Arg** Ile Pro Thr Arg Asn Leu Tyr Pro Ser 106 Gly Leu **Pro Glu Glu Tyr**  
**Ser Phe Leu Thr Thr Phe Arg Met Thr 121 Gly Ser Thr Leu** Lys **Lys Asn Trp Asn**  
**Ile Trp Gln Ile Gln Asp 136 Ser Ser Gly Lys Glu Gln Val Gly Ile Lys Ile Asn Gly**  
**Gln Thr 151 Gln Ser Val Val Phe Ser Tyr Lys Gly Leu Asp Gly Ser Leu Gln 166**  
**Thr Ala Ala Phe Ser Asn Leu** Ser **Ser Leu Phe Asp Ser Gln Trp 181 His Lys Ile**  
**Met Ile Gly Val Glu Arg Ser Ser Ala Thr Leu Phe 196 Val Asp Cys Asn Arg Ile**  
**Glu Ser Leu Pro Ile Lys Pro** Arg Gly 211 Pro Ile Asp Ile Asp Gly Phe Ala Val Leu  
 Gly Lys Leu Ala Asp 226 Asn Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Glu Leu Gln Trp Met Leu  
 Ile 241 His Cys Asp Pro Leu Arg Pro Arg Arg Glu Thr Cys His Glu Leu 256 Pro Ala  
 Arg Ile Thr Pro Ser Gln Thr Thr Asp Glu Arg 268

Se proporciona una composición de secuencia entre secuencias NC4 bovinas, humanas, murinas y de polluelo en la Figura 37. Las secuencias conservadas son como se indica a continuación:

- 5  
 SEQ ID NO: 3 - K/QSVS/V/A/EFSYKG  
 SEQ ID NO: 4 - KI/LMIG/SVER/TS/T  
 SEQ ID NO: 5 - KLGNNVDFRI  
 SEQ ID NO: 6 - R/KI/VES/TLP/NIKPR/KG  
 10 SEQ ID NO: 7 - KH/N/YWS/N/TIWQIQDS/AGK/R  
 SEQ ID NO: 8 - K/QSVS/VFSYKG  
 SEQ ID NO: 9 - KIMIGVERTS  
 SEQ ID NO: 10 - RIESLPIKPRG  
 SEQ ID NO: 11 - KH/NWS/NIWQIQDSSGK  
 15 SEQ ID NO: 12 - RIGQDDLPGFDLISQFQI/VDKA  
 SEQ ID NO: 13 - RH/NLYPN/SGLPEEYSFLTTFR  
 SEQ ID NO: 14 - FSNLP/SSLFDSQWHKI  
 SEQ ID NO: 15 - RSSATLFVDCNRI  
 SEQ ID NO: 16 - KSVSFSYKG  
 20 SEQ ID NO: 17 - KIMIGVERS  
 SEQ ID NO: 18 - KLGNNVDFRI  
 SEQ ID NO: 19 - RIESLPIKPRG  
 SEQ ID NO: 20 - KHW/SIWQIQDSSGK  
 SEQ ID NO: 21 - RIGQDDLPGFDLISQFQIDKA  
 25 SEQ ID NO: 22 - RHLYPNGLPEEYSFLTTFRM  
 SEQ ID NO: 23 - FSNKOSKFDSQWHKI  
 SEQ ID NO: 24 - RSSATLFVDCNRI

#### Crioconservación

30 Existen diversas técnicas para crioconservar células progenitoras conocidas por el experto en la materia. Un procedimiento de ejemplo es como se indica a continuación:

Examen:

35 Antes de la congelación, las células deben mantenerse en un estado de crecimiento activo para asegurar la máxima salud y una buena recuperación. Idealmente, el medio de cultivo debe cambiarse el día anterior. Usando un microscopio invertido, comprobar rápidamente el aspecto general del cultivo. Buscar signos de contaminación microbiana. También es importante examinar el cultivo a simple vista para buscar pequeñas colonias de hongos que  
 40 puedan estar flotando en la superficie de contacto medio-aire y, por tanto, no visibles a través del microscopio. Es mejor si los cultivos se mantienen sin antibióticos durante al menos una semana antes de la congelación para

ayudar a descubrir cualquier contaminante críptico (oculto) del cultivo.

Recolección de células y congelación:

- 5 Tratar las células suavemente durante la recolección, puesto que es muy difícil que las células dañadas durante la recolección sobrevivan al daño adicional que se produce durante los procesos de congelación y descongelación. Debería ser capaz de obtener hasta  $1,5 \times 10^7$  células de un matraz T-75 cerca de la confluencia (dependiendo del tipo celular y del grado de confluencia). Éstas deberían ser suficientes células para preparar al menos varios viales a  $2 \times 10^6$  células/vial.
- 10
1. Usando una pipeta estéril, retirar y desechar el medio de cultivo viejo.
  2. Para un matraz T-75, aclarar la monocapa de células con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato sin calcio y magnesio (CMF-PBS) para retirar todos los restos de suero bovino fetal.
  3. Añadir de 4 a 5 ml de la solución de tripsina (en CMF-PBS) al matraz y permitir que las células se incuben durante al menos un minuto. (El precalentamiento de la solución enzimática 4 disminuirá el periodo de exposición). Retirar aproximadamente 3 ml de la solución de tripsina y permitir que las células se redondeen y se suelten.
  4. Comprobar el progreso del tratamiento enzimático cada pocos minutos en un microscopio de contraste de fase invertida. Una vez que todas las células se han redondeado, golpear suavemente el matraz para desprenderlas de la superficie de plástico. Después añadir 5 ml de medio de crecimiento a la suspensión celular y, usando la misma pipeta, lavar vigorosamente cualquier célula restante de la parte inferior del recipiente de cultivo.
  5. Recoger las células suspendidas en un tubo de centrifuga de 15 ml y colocar en hielo. Tomar una muestra para el recuento y después centrifugar a  $100 \times g$  durante 5 minutos para obtener un sedimento de células. Mientras las células se están centrifugando, hacer un recuento de células viables (con la solución de azul de tripano) y calcular el número de células/ml y el número total de células.
  6. Retirar el sobrenadante de las células centrifugadas y volver a suspender el sedimento de células en suficiente cantidad del medio crioprotector que contiene DMSO al 10 % (DMSO se usa con mucha frecuencia a una concentración final del 5 al 15% para proporcionar una concentración final de células de 1 a  $2 \times 10^6$  células/ml).
  7. Etiquetar el número apropiado de viales criogénicos con la estirpe celular y la fecha. Después añadir de 1,5 a 1,8 ml de la suspensión celular que contiene DMSO a cada uno de los viales y sellar.
  8. Colocar los viales en el congelador de velocidad controlada durante la noche. Después de 24 horas, las células deberían transferirse a un congelador de nitrógeno líquido para el almacenamiento permanente.
  9. Registrar la información adecuada acerca de las células en los registros de repositorio celular. Detallar completamente en estos registros las condiciones de almacenamiento del cultivo, incluyendo la totalidad de la siguiente información: identidad del cultivo, nivel de pase o de duplicación de la población, fecha de congelación, medio de congelación y método utilizado, número de células por vial, número total de viales congelados inicialmente y el número restante, su ubicación, su viabilidad y resultados esperados de todos los ensayos de control de calidad realizados (esterilidad, micoplasma, especie, cariotipo, etc.). También es útil y debe incluirse siempre que sea posible información adicional del cultivo, en especial su origen, historia, parámetros de crecimiento, características especiales y aplicaciones.
- 35
- 40

Descongelación y recuperación de células:

- 45
1. Usando equipo de seguridad apropiado, retirar el vial de su ubicación de almacenamiento y comprobar cuidadosamente tanto la etiqueta como el registro de almacenamiento para asegurarse de que es el cultivo correcto. Colocar el recipiente en agua caliente, agitando suavemente hasta que esté completamente descongelado. La descongelación rápida (de 60 a 90 segundos a  $37^\circ\text{C}$ ) proporciona la mejor recuperación para la mayoría de los cultivos celulares; reduce o previene la formación de cristales de hielo dañinos dentro de las células durante la rehidratación.
  2. Puesto que algunos agentes crioprotectores pueden dañar las células tras la exposición prolongada, retirar los agentes tan rápida y suavemente como sea posible. Se usan varios enfoques dependiendo tanto de los agentes crioprotectores como de las características de las células:
    - a) La mayoría de las células se recuperan con normalidad si se les retira el agente crioprotector mediante un cambio de medio a las 6 a 8 horas de la descongelación. Transferir el contenido de la ampolla o vial a un matraz T-75 u otro recipiente adecuado que contenga de 15 a 20 ml de medio de cultivo e incubar con normalidad. Tan pronto como la mayoría de las células se hayan unido (por lo general de 3 a 4 horas), retirar el medio que contiene el agente crioprotector ahora diluido y reemplazar con medio fresco.
    - b) Para células que son sensibles a agentes crioprotectores, la retirada del medio viejo se consigue fácilmente mediante centrifugación suave. Transferir el contenido del vial o ampolla a un tubo de centrifuga de 15 ml que contiene 10 ml de medio fresco y centrifugar durante 5 minutos a  $100 \times g$ . Descartar el sobrenadante que contiene el agente crioprotector y volver a suspender el sedimento celular en medio fresco. Después transferir la suspensión celular a un recipiente de cultivo adecuado e incubar con normalidad.
- 55
- 60

65

Matriz de soporte

Los avances recientes en la biología y la ciencia de materiales han llevado la ingeniería de tejidos a la vanguardia de las nuevas técnicas de reparación de cartílago. La combinación de células autólogas, armazones diseñados específicamente, biorreactores, estimulaciones mecánicas y factores de crecimiento, ofrece vías prometedoras para la regeneración del tejido de cartílago.

Bioarmazones que imitan la matriz extracelular.

Las estrategias de ingeniería de tejidos actuales proporcionan armazones derivados de materiales tanto sintéticos (por ejemplo, ácido poliglicólico) como de origen natural (por ejemplo, colágeno) para formar la construcción célula-armazón. Los productos de armazón de tejido disponibles actualmente incluyen la submucosa de intestino delgado (Restore™, SIS porcina, DePuy Orthopaedics), (CuffPatch™, SIS porcina, Organogenesis), (SIS; Cook Biotech, Inc.), armazones de colágeno reformulados (Material compuesto de colágeno 3D, BD Biosciences), matrices de colágeno dérmico humano acelular (Graftjacket®, Wright Medical Technologies), dermis bovina fetal (TissueMend®, Stryker) y armazones de polímero sintéticos, principalmente poliésteres (por ejemplo, PGA, PCL y PLA).

Los armazones de ingeniería tisular que se han descrito recientemente incluyen armazones de colágeno, armazones sembrados con condrocitos, armazones de colágeno de tipo II sembrado con condrocitos articulares-GAG [Vickers et al, *Tissue Eng.* Mayo de 2006; 12 (5):1345-1355] y armazones compuestos que comprenden óxido de polietileno (PEO) y quitosano [Kuo YC et al; *J. Biomed Mater Res A.* 3 de Noviembre de 2008] Una forma alternativa descrita por Nettles DL et al., [*Tissue Eng* parte A julio de 2008; 14(7):1133-1140] es un gel inyectable de polipéptido similar a elastina (ELP) reticulable para su aplicación a la reparación de la matriz del cartílago.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de superficie de contacto. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y definidos químicamente. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como el hueso o el colágeno dérmico. Matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden estar alteradas en su composición, tal como en el calcio-aluminato-fosfato y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

En una realización, el armazón deriva de un material sintético. En otra realización, el armazón deriva de materiales de origen natural. Como alternativa, el armazón es una combinación de materiales sintéticos y de origen natural.

En una realización, y como se describe en los ejemplos, la matriz de soporte es una esponja de colágeno. La composición de la invención que incluye las células, polisulfato de pentosano opcionalmente en combinación con un polipéptido NC4, puede implantarse o infundirse o perfundirse en la esponja. Puesto que las esponjas pueden ser delicadas de implantar, la esponja se inserta opcionalmente en una jaula reabsorbible.

Composiciones

En todos los casos, las composiciones y formulaciones como se analizan en el presente documento son adecuadas para los polisacáridos y/o polipéptidos de la presente invención. En particular, las composiciones y formulaciones son adecuadas para el polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano, polisulfato de pentosano de calcio, polisulfato de pentosano de magnesio y/o polisulfato de pentosano de sodio solos. Las composiciones y formulaciones también son adecuadas para combinaciones de los compuestos analizados en el presente documento, por ejemplo, combinaciones de polisacáridos y/o polipéptidos y, en particular, combinaciones de dominio NC4 y polisulfato de pentosano y sus sales.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones que comprenden un polisacárido y/o polipéptido como se desvelan en el presente documento, en particular polisulfato de pentosano opcionalmente con dominio NC4, en una realización polisulfato de pentosano, polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, son adecuadas para su uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y, normalmente, comprenderán uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Son bien conocidos en la técnica farmacéutica vehículos o diluyentes aceptables para su uso terapéutico y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). La elección de vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión (liposomas), agente de recubrimiento o agente solubilizante adecuado.

Es bien sabido en la técnica que puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de entrega. Por ejemplo, pueden disolverse polisacáridos y/o proteínas que comprenden un dominio NC4 en solución salina. Como alternativa, estos compuestos pueden prepararse en una solución provista de un líquido-polvo de dos partes que se mezcla antes de su uso.

5 Con frecuencia se usan cápsulas de liberación lenta implantables (subcutáneas) para anticonceptivos como inyecciones de Implanon™ o Depo-Provera™ y serían útiles para la administración de una composición de la presente invención.

10 En otro ejemplo, la composición de la presente invención puede formularse para administrarse usando una mini-bomba implantada en la que la composición se administra normalmente por infusión continua en la ubicación deseada.

15 En una realización alternativa, pueden inyectarse o implantarse de otro modo composiciones de la invención por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarticular, intradiscal o intradérmica. En una realización adicional, la formulación se administra por vía subcutánea, intradérmica o intraarticular.

20 Las formulaciones subcutáneas e intradérmicas pueden contener también uno o más agentes adicionales tales como, por ejemplo, sustancias de carga de tejidos blandos, lidocaína (anestésico local), inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, antioxidantes y agentes antiinflamatorios (corticoesteroides).

25 Diversas formulaciones para la administración intradérmica de un fármaco pueden comprender uno o más de los siguientes ingredientes: albúmina, tampón, suero salino tamponado, solución salina tamponada y anestésico (preferentemente local).

30 La presente invención se extiende a terapias de combinación para su uso en el tratamiento de las enfermedades analizadas en el presente documento. En particular, en un ejemplo, la presente invención se extiende al uso de un polisulfato de pentosano y un polipéptido para su uso en el tratamiento de diversas afecciones degenerativas. Se ha de entender que estos agentes pueden administrarse al mismo tiempo o en un momento diferente. Por tanto, la terapia de combinación puede comprender los agentes activos que se administran al mismo tiempo, ya sea en una única formulación o en múltiples formulaciones administradas en el mismo o diferentes momentos. De igual modo, la terapia de combinación puede comprender los agentes activos que se administran en diferentes formulaciones en diferentes momentos. Las formulaciones podrían administrarse secuencialmente y pueden estar separadas por un periodo de tiempo que incluye horas, días, semanas y meses.

35 Las formulaciones de ejemplo adecuadas para la inyección en un animal, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea o intramuscular incluyen:

40 1) Un polisulfato de pentosano, en una realización, polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio junto con células progenitoras disueltas en agua estéril.

45 2) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, disuelto en solución salina estéril al 0,9 % (NaCl 150 mM); +/- albúmina humana (0,01 %-0,5 %); +/- anestésico local; por ejemplo, clorhidrato de bupivacaína (1,25-5 mg/ml); +/- tartrato de ácido de adrenalina (0,0045-0,0091 mg/ml); +/- lidocaína (0,5-2 %); +/- epinefrina (1:100.000-1:200.000).

50 3) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, disuelto en solución salina tamponada con fosfato; +/- albúmina humana (0,01-0,5 %); +/- anestésico local; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; tampón fosfato 10 mM; NaCl 150 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mM.

55 4) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, disuelto en tampón fosfato-citrato (50 mM) +/- perborato de sodio (0,03 %); +/- albúmina humana (0,01-0,5 %); +/- anestésicos locales.

60 5) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, disuelto en una solución de agua estéril que contiene carboximetilcelulosa (2,7 %) y manitol.

65 6) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, incorporado en hidrogeles de polialquilamida biocompatibles (por ejemplo, Bio-Alcamid® fabricada por Polymekon S.r.l. (Milán, Italia).

7) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, incorporado en gel Hylan B (por ejemplo, Hylaform® Plus).

8) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, incorporado en gel de ácido hialurónico estabilizado (por ejemplo, Restylane®).

5 9) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, incorporado en solución de ácido poli-L-láctico (por ejemplo, Sculptra®).

10 10) Un polisulfato de pentosano, en una realización polisulfato de pentosano de calcio y/o polisulfato de pentosano de sodio, junto con células progenitoras, incorporado disuelto en una solución de Krebs-solución de Ringer que contiene NaCl 118,1 mM; KCl 3,4 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mM; Glucosa 11,1 mM.

Las formulaciones de la presente invención también comprenden, adicionalmente, uno cualquiera o más de los siguientes:

15 un fármaco antiinflamatorio esteroideo (corticoesteroide), un inhibidor de calcineurina (por ejemplo, pimecrolimus, tacrolimus), un inhibidor de la fosfodiesterasa, un antihistamínico, un agente antimicrobiano, un antibiótico, un agente antibacteriano, una ceramida, un factor de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento transformantes  $\beta$ 1-3, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento similares a insulina I y II, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento nervioso), un agente mitógeno, un inhibidor de la metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, TIMP, Batimastat, Marimastat y Matlistatina B), un inhibidor de la proteasa, una proteína de la MEC, tretinoína (vitamina A), un antioxidante (vitaminas E y C), una citoquinina vegetal (cinerasa), un complejo de cobre-péptido, así como numerosos extractos de plantas, animales y minerales (es decir, de extracto de alquitrán de hulla).

30 Las formulaciones específicas de la presente invención comprenden una combinación con un fármaco antiinflamatorio esteroideo. Otra composición comprende un inhibidor de calcineurina. Otra composición comprende un antihistamínico. Otra composición comprende un agente antimicrobiano. Otra composición comprende un factor de crecimiento. Otra composición comprende un inhibidor de proteasa.

#### Preparación de composiciones para la administración

##### Liposomas

35 La encapsulación de proteínas dentro de liposomas se detalla, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. 5.662.931; 5.853.755; 4.485.054; 5.780.054; 5.653.974; 6.019.999; 6.027.726; 5.739.273; 5.264.221; 5.413.804; 5.374.715.

##### Polímeros

45 Los polisacáridos y/o polipéptidos de la presente invención, pueden encapsularse dentro de polímeros biodegradables sintéticos (o derivados) para la liberación controlada. Estos polímeros (y derivados) incluyen, por ejemplo: poli(ésteres); son ejemplos poli( $\epsilon$ -caprolactona) PCL, poli(ácido glicólico) PGA, poli(ácido L-láctico) PLA, poli(etilenglicol) PEG, poli(óxido de etileno) PEO. Los derivados de poli(éster) incluyen copolímeros de poli(éster), poli(orto-ésteres). Copolímeros de poli(éster); son ejemplos poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) PLGA, poli(ácido D-láctico) PDLA, poli(ácido L-láctico) PLLA, PLA-PEG, PLA/PEG dibloque, PLA/PEG/PLA tribloque. Poli(orto-ésteres); son ejemplos poli(ortoésteres) a base de 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano(DETOSU). Poli (anhídridos); son ejemplos el ácido sebácico (SA), p-(carboxifenoxi)propano (CPP), p-(carboxifenoxi)hexano (CPH), copolímeros de SA/PPP, poli(dímero de ácido graso-ácido sebácico), poli(anhídrido-imidas), poli(anhídrido-ésteres). Poli(amidas); son ejemplos poli(aminoácidos), poli(ácido glutámico), poli(ácido aspártico), poli(ácido láctico-co-lisina) PLAL, poli[N-(3-hidroxiopropil)-L-glutamina], poli(iminocarbonatos), poli(carbonatos) derivados de tirosina. Polímeros que contienen fósforo; es decir, poli(fosfacenos), poli(diclorofosfazenos), poli(organofosfazenos), poli[bis(carboxilatofenoxi)-fosfazeno], poli(fosfoésteres), poli(uretanos), un vehículo de hialuronano.

##### Acoplamiento

60 Puede acoplarse un polipéptido o polipéptidos y/o polisacárido o polisacáridos a una matriz de colágeno para su administración. La matriz de colágeno puede liberar un fármaco acoplado a una concentración eficaz constante. En consecuencia, pueden usarse eficazmente colágeno y otras matrices de proteínas de la MEC para administrar un polipéptido o polipéptidos y/o polisacárido o polisacáridos *in vivo*, por ejemplo, en un tejido o espacio que lo necesite. En una realización, la matriz de colágeno reticulado se administra por vía subcutánea.



## General

En general, la presente invención se refiere a y/o usa cantidades terapéuticamente eficaces y/o cantidades profilácticamente eficaces de las composiciones analizadas en el presente documento.

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el efecto deseado.

10 Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado, tal como la prevención o la inhibición de la apoptosis celular o el daño tisular.

## Polipéptidos

15 La referencia en el presente documento a "polipéptido" incluye polipéptidos individuales, mezclas de polipéptidos y también fragmentos biológicamente activos de polipéptidos.

20 Por "polipéptido sustancialmente purificado" los inventores se refieren a un polipéptido que se ha separado al menos parcialmente de los lípidos, ácidos nucleicos, otros polipéptidos y otras moléculas contaminantes a los que está asociado en su estado nativo. En una realización, el polipéptido sustancialmente purificado está en al menos un 60 % libre de otros componentes a los que está asociado de forma natural. En una realización adicional, el polipéptido sustancialmente purificado está en al menos un 75 % libre de otros componentes a los que está asociado de forma natural. En una realización adicional, el polipéptido sustancialmente purificado está en al menos un 90 % libre de otros componentes a los que está asociado de forma natural. Además, el término "polipéptido" se usa  
25 indistintamente en el presente documento con el término "proteína".

30 El % de identidad de un polipéptido se determina mediante análisis (programa GCG) por GAP (Needleman y Wunsch, 1970) con una penalización por creación de hueco = 5 y una penalización por extensión de hueco = 0,3. A menos que se indique lo contrario, la secuencia de consulta es de al menos 15 aminoácidos de longitud y el análisis por GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 15 aminoácidos. La secuencia de consulta puede ser de al menos 50 aminoácidos de longitud y el análisis por GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 50 aminoácidos. La secuencia de consulta puede ser de al menos 100 aminoácidos de longitud y el análisis por GAP alinea las dos secuencias a lo largo de una región de al menos 100 aminoácidos.

35 Con respecto a los polipéptidos/enzimas definidos, se apreciará que las cifras de % de identidad más altas que las proporcionadas anteriormente abarcarán realizaciones. Por tanto, en su caso, a la luz de las cifras de % de identidad mínimas, el polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 76 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,1 %, un 99,2 %, un 99,3 %, un 99,4 %, un 99,5 %, un 99,6 %, un 99,7 %, un 99,8 %  
40 o un 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO correspondiente nominada.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento biológicamente activo" se refiere a una porción del polipéptido definido que todavía mantiene la actividad antiartrítica o antiinflamatoria (la que sea pertinente). Dichos fragmentos biológicamente activos pueden determinarse fácilmente mediante delecciones en serie de la proteína de longitud completa y sometiendo a ensayo la actividad del fragmento resultante.

50 Pueden prepararse mutantes/variantes de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos/enzimas definidos en el presente documento mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico que codifica el polipéptido, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Dichos mutantes incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de restos dentro de la secuencia de aminoácidos. Puede hacerse una combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que el producto de proteína final posea las características deseadas.

55 En el diseño de mutantes de secuencia de aminoácidos, la ubicación del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la característica o características que se han de modificar. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) sustituyendo en primer lugar con elecciones de aminoácidos conservadores y después con selecciones más radicales dependiendo de los resultados conseguidos, (2) eliminando el resto diana o (3) insertando otros restos adyacentes al sitio localizado.

60 Las delecciones de secuencia de aminoácidos generalmente varían de aproximadamente 1 a 30 restos, de aproximadamente 1 a 10 restos y normalmente de aproximadamente 1 a 5 restos contiguos.

65 Los mutantes por sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de polipéptido eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen los sitios identificados como el sitio o sitios activos o de unión. Otros sitios de interés son aquellos en los que restos particulares obtenidos de diversas cepas o especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la

actividad biológica. Estos sitios, especialmente aquellos comprendidos dentro de una secuencia de al menos tres otros sitios conservados de forma idéntica, pueden sustituirse de una manera relativamente conservadora. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla A.

- 5 Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en los polipéptidos de la presente invención. Dichos aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido D-amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, D-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como D-metil aminoácidos, C-metil aminoácidos, N-metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general.

TABLA A. Sustituciones de ejemplo.

Resto original	Sustituciones de ejemplo
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; su
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; su
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
Her (H);	asn gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; reunió; ala; phe
Lys (K)	arg
Met(M);	leu phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; reunió; phe, ala

- 15 También se incluyen dentro del alcance de la invención polipéptidos de la presente invención que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo, mediante biotilación, bencilación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido de la invención.

- 20 Pueden producirse polipéptidos de la presente invención en una diversidad de maneras, incluyendo la producción y recuperación de proteínas naturales, la producción y recuperación de proteínas recombinantes y la síntesis química de las proteínas. En una realización, un polipéptido aislado de la presente invención se produce mediante el cultivo de una célula capaz de expresar el polipéptido en condiciones eficaces para producir el polipéptido y recuperar el polipéptido. Una célula que se cultiva es una célula recombinante de la presente invención. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, condiciones de medio, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno eficaces que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir un polipéptido de la presente invención. Dicho medio comprende normalmente un medio acuoso que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables y sales, minerales, metales apropiados y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo puede realizarse a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiado para una célula recombinante. Dichas condiciones de cultivo están dentro de la pericia de un experto habitual en la técnica.

35 Terapia génica

- Los polinucleótidos y polipéptidos pueden emplearse de acuerdo con la presente invención mediante la expresión de dichos polipéptidos en modalidades de tratamiento con frecuencia denominadas "terapia génica". Por tanto, por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética células de un paciente con un polinucleótido, tal como un ADN o ARN, para codificar un polipéptido *ex vivo*. Las células modificadas por ingeniería genética después pueden

proporcionarse a un paciente que se ha de tratar con el polipéptido. En esta realización, las células pueden modificarse por ingeniería genética *ex vivo*, por ejemplo, mediante el uso de un vector de plásmido retrovítico que contiene ARN que codifica un polipéptido útil para los métodos de la presente invención para transformar dichas células. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y su uso en la presente invención será evidentes a partir de los contenidos del presente documento.

Además, pueden modificarse por ingeniería genética células *in vivo* para la expresión de un polipéptido *in vivo* mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polinucleótido útil para un método de la presente invención puede modificarse por ingeniería genética para la expresión en un vector retrovítico o vector adenovítico u otro vector de replicación defectuosa (por ejemplo, vectores de poxvirus). Después puede aislarse la construcción de expresión. Una célula de empaquetamiento se transduce con un vector de plásmido que contiene ARN que codifica un polipéptido útil para un método de la presente invención, de manera que la célula de empaquetamiento produce ahora partículas víricas infecciosas que contienen el gen de interés. Estas células productoras pueden administrarse a un paciente para la modificación por ingeniería genética de células *in vivo* y la expresión del polipéptido *in vivo*. Estos y otros métodos para la administración de un polipéptido de la presente invención deben ser evidentes para los expertos en la materia a partir de los contenidos de la presente invención.

Los retrovirus de los que pueden derivar los vectores de plásmido retrovítico anteriormente mencionados incluyen, pero no se limitan a, el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus de la necrosis del bazo, el virus del sarcoma de Rous, el virus del Sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de la inmunodeficiencia humana, el adenovirus, el virus del sarcoma mieloproliferativo y el virus del tumor mamario. En una realización, el vector de plásmido retrovítico deriva del virus de leucemia murina de Moloney.

Dichos vectores incluirán uno o más promotores para expresar el polipéptido. Los promotores adecuados que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, el LTR retrovítico; el promotor de SV40; y el promotor de citomegalovirus humano (CMV). También pueden usarse promotores celulares tales como promotores eucariotas celulares incluyendo, pero no limitados a, la histona, la ARN polimerasa III y promotores de beta-actina. Los promotores víricos adicionales que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, promotores de adenovirus, promotores de timidina cinasa (TK) y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado será evidente para los expertos en la materia a partir de los contenidos en el presente documento.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido útil para un método de la presente invención se coloca bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, promotores adenovíricos, tales como el promotor tardío principal adenovítico; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el virus respiratorio sincitial (VRS); promotores inducibles, tales como el promotor MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; promotores de globina humana; promotores de timidina cinasa vírica, tales como el promotor de la timidina cinasa del herpes simple; LTR retrovíticos (incluyendo los LTR retrovíticos modificados descritos anteriormente en el presente documento); el promotor de  $\beta$ -actina; y promotores de la hormona de crecimiento humana. El promotor también puede ser el promotor nativo que controla el gen que codifica el polipéptido.

El vector de plásmido retrovítico se emplea para transducir estirpes celulares de empaquetamiento para formar estirpes celulares productoras. Los ejemplos de células de empaquetamiento que pueden transfectarse incluyen, pero no se limitan a, las estirpes celulares PE501, PA317, Y-2, Y-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, YCRE, YCRIP, GP+E -86, GP+envAM12 y DAN como se describen en Miller (1990) *Human gene Therapy*, 1:5-14.

El vector puede transducirse en las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en la técnica. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a, electroporación, el uso de liposomas y la precipitación con  $\text{CaPO}_4$ . En una alternativa, el vector de plásmido retrovítico puede encapsularse en un liposoma o acoplarse a un lípido y después administrarse a un hospedador.

La estirpe celular productora genera partículas de vector retrovítico infecciosas, que incluyen la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos. Dichas partículas de vector retrovítico pueden emplearse después para transducir células eucarióticas, *in vitro* o *in vivo*. Las células eucarióticas transducidas expresarán la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Las células eucariotas que pueden transducirse incluyen, pero no se limitan a, células mesenquimatosas, condrocitos, células madre embrionarias, células de carcinoma embrionarias, así como células madre hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales bronquiales.

Las terapias genéticas de acuerdo con la presente invención pueden implicar una presencia transitoria (temporal) del polinucleótido de terapia génica en el paciente o la introducción permanente de un polinucleótido en el paciente.

Pueden usarse terapias genéticas, como la administración directa de agentes analizados anteriormente, de acuerdo con la presente invención solos o en conjunción con otras modalidades terapéuticas.

65

Preparación y administración de composiciones farmacéuticas

La cantidad de polisulfato de pentosano opcionalmente con un polipéptido que se ha de administrar puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo. Las pautas de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos que se han de tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Se apreciará que el polisulfato de pentosano opcionalmente con un polipéptido puede administrarse en forma de una composición que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para la administración parenteral. Como alternativa, el vehículo puede ser adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente deberían ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Por otra parte, el polisacárido y/o polipéptido pueden administrarse en una formulación de liberación en el tiempo, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de entrega microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como vinilo acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y poliláctico, copolímeros poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la materia.

El polisulfato de pentosano opcionalmente con un polipéptido puede administrarse en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar una superficie para el crecimiento de hueso, cartílago, músculo, nervio, epidermis y/u otro tejido conjuntivo. La matriz puede estar en forma de biomateriales de matriz tradicionales. La matriz puede proporcionar la liberación lenta de las células, sobrenadante o factores solubles.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de superficie de contacto. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y definidos químicamente. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como el hueso o el colágeno dérmico. Matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden estar alteradas en su composición, tal como en el calcio-aluminato-fosfato y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

Pueden prepararse composiciones de la invención a partir de polisulfato de pentosano y polipéptido. Pueden identificarse polisacárido adicional y/o fragmentos de polipéptidos o péptidos mediante experimentación habitual a la luz de las presentes memoria descriptiva, reivindicaciones y figuras. Se describe un método para la identificación de

fragmentos de péptidos que tienen actividad estimulante, por ejemplo, en el documento US 5.399.342.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderán normalmente uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Son bien conocidos vehículos o diluyentes para su uso terapéutico en la técnica farmacéutica y se describen por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). La elección del excipiente, vehículo o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y a la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento o agente solubilizante.

Es bien conocido en la técnica que puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de administración.

15 De acuerdo con la presente invención también se incluyen formulaciones no invasivas. Por ejemplo, aunque las células progenitoras son susceptibles de ser administradas por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraarticular, el polisacárido polisulfatado puede administrarse por inhalación, por vía oral o por vía intranasal, en forma de supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo para espolvorear, mediante el uso de un parche cutáneo, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas, comprimidos masticables u óvulos, solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires, soluciones, jarabes o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes.

Para las administraciones bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o pastillas para chupar que pueden formularse de una manera convencional.

25 Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 % al 95 % de principio activo, en particular del 25 % al 70 %. Pueden proporcionarse cápsulas, comprimidos y píldoras para la administración oral a un paciente con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa o hidroxipropilmetil celulosa.

35 Se describen formulaciones intranasales y se describe la administración de colágeno artrítico de tipo II y colágeno artrítico de tipo IX, por ejemplo, en Lu et al (1999) *Different therapeutic and bystander effects by intranasal administration of homologous type II and type IX collagens on the collagen-induced arthritis and pristane-induced arthritis in rats*, *Clinical Immunology* Vol 90 págs. 119-127 (1999).

40 En otro ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para ser administrada usando una minibomba o por una vía mucosa, por ejemplo, en forma de una pulverización o aerosol nasal para la inhalación o la solución ingerible.

45 Cuando el agente se ha de administrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a antiácidos, al pH y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

50 En una realización, el polisulfato de pentosano de la invención se administra por una vía no invasiva. En una realización adicional, la vía no invasiva comprende la administración oral o la administración enteral, la administración nasal o por inhalación.

En una realización alternativa, las composiciones de la invención pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía subcutánea.

55 Para la administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para hacer la solución isotónica con la sangre. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas.

60 Después de la formulación, la composición inmunoprotectora puede incorporarse en un recipiente estéril que después se sella y se almacena a una temperatura baja, por ejemplo, 4 °C, o puede secarse por congelación. La liofilización permite un almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

65 En una realización de la presente invención se administran progenitor, en particular el condroprogenitor e incluso más en particular las células Stro-1<sup>bri</sup> y/o células de progenie de las mismas en forma de una composición. En una realización, dicha composición comprende un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los términos "vehículo" y "excipiente" se refieren a composiciones de materia que se usan convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª Ed., Mac Publishing Company (1980). Un vehículo puede también reducir los efectos secundarios indeseables del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el vehículo. En un ejemplo, el vehículo no produce ningún efecto adverso local o sistémico significativo en los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas para el tratamiento.

Los vehículos adecuados para la presente invención incluyen los utilizados convencionalmente, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialuronano y glicoles son vehículos líquidos preferidos, en particular (cuando son isotónicos) para soluciones. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

En otro ejemplo, un vehículo es una composición de medios, por ejemplo, en la que se cultiva o se suspende una célula. En un ejemplo adicional, una composición de medios de este tipo no induce ningún efecto adverso en un sujeto al que se administra.

Los vehículos y excipientes preferidos no afectan negativamente a la viabilidad de una célula.

En un ejemplo, el vehículo o excipiente proporciona una actividad tamponante para mantener las células y/o factores solubles a un pH adecuado para ejercer de este modo una actividad biológica, por ejemplo, el vehículo o excipiente es solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS representa un vehículo o excipiente atractivo porque interactúa con las células y los factores mínimamente y permite la liberación rápida de las células y factores, en un caso de este tipo, la composición de la invención puede producirse en forma de un líquido para la aplicación directa a la corriente sanguínea o en un tejido o una región que rodea o está adyacente a un tejido, por ejemplo, por inyección.

También pueden incorporarse o incluirse células progenitoras, en particular las condroprogenitoras y aún más en particular células Stro-1<sup>brj</sup> y/o células de progenie de las mismas, dentro de armazones que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no sean perjudiciales para el receptor. Estos armazones proporcionan soporte y protección para las células que se van a trasplantar en los sujetos receptores. Los andamios biodegradables naturales y/o sintéticos son ejemplos de dichos armazones.

Puede usarse una diversidad de diferentes armazones satisfactoriamente en la práctica de la invención. Los armazones incluyen, pero no se limitan a los armazones biológicos, degradables. Los andamios biodegradables naturales incluyen armazones de colágeno, fibronectina y laminina. Un material sintético adecuado para un armazón de trasplante de células debe ser capaz de soportar el crecimiento celular expansivo y la función celular. Dichos armazones también pueden ser reabsorbibles. Los andamios adecuados incluyen armazones de ácido poliglicólico, por ejemplo, como se describe por Vacanti, et al. *J. Ped. Surg.* 23:3-9 1988; Cima, et al. *Biotechnol. Bioeng.* 38:145 1991; Vacanti, et al. *Plast. Reconstr. Surg.* 88:753-9, 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

En otro ejemplo, las células pueden administrarse en un armazón de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company).

Las composiciones celulares útiles para la presente invención pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con una composición de la invención inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse juntas durante un periodo de tiempo antes de la administración.

En una realización, la composición comprende una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de células. Por ejemplo, la composición comprende de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células Stro-1<sup>brj</sup>/kg a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células Stro-1<sup>brj</sup>/kg o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células Stro-1<sup>brj</sup>/kg a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células Stro-1<sup>brj</sup>/kg. La cantidad exacta de células que se ha de administrar depende de una diversidad de factores, incluyendo la edad, el peso y el sexo del paciente y la extensión y la gravedad de la disfunción pancreática. Los mismos valores también son aplicables a las células progenitoras y a las células condroprogenitoras en sí.

En algunas realizaciones, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan a la circulación de un sujeto, sin embargo, eso permite a los factores secretados por las células entrar en la circulación. De esta manera, pueden administrarse factores solubles a un sujeto al permitir que las células secreten los factores a la circulación del sujeto. Una cámara de este tipo puede, igualmente, implantarse en un sitio en un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles, por ejemplo, implantados en o cerca de un órgano trasplantado.

En algunas realizaciones de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir un paciente antes del inicio de la terapia con composiciones celulares. En consecuencia, el trasplante con células Stro-1<sup>br</sup> alógenas, o incluso xenógenas, o la progenie de las mismas, puede tolerarse en algunos casos.

5 Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede conseguirse a través del uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede conseguirse mediante la entrega de las células en un dispositivo de encapsulado. Las células pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y el oxígeno necesarios para la célula y a factores terapéuticos a los que la célula todavía es impermeable, factores y células humorales inmunitarios. El  
10 encapsulante puede ser hipoalergénico, se sitúa fácilmente y de forma estable en un tejido diana y proporciona una protección adicional a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenia.

15 Usos y métodos de tratamiento

Los métodos, composiciones y usos de la presente invención son útiles para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades del sistema musculoesquelético, tales como la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD). También pueden emplearse de forma útil con respecto a la regeneración y reparación del cartílago.  
20

Los métodos, composiciones y usos de la presente invención también son útiles porque pueden regular la condrogénesis y la proliferación celular, y pueden usarse para producir, regular positivamente o estimular la producción de hialuronano (HA). Estos usos pueden emplearse en el tratamiento de enfermedades del sistema musculoesquelético, incluyendo la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD); o el tratamiento de afecciones que se benefician de una mayor producción de HA, tales como, por ejemplo, la osteoartritis de las articulaciones sinoviales, la oftalmología, la prevención de adherencias abdominales post-quirúrgicas, el tratamiento de la piel y la reparación y la restauración de la función de la matriz extracelular; o la inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.  
25  
30

Los usos adicionales de la presente invención incluyen la producción de una matriz extracelular adecuada para el trasplante en un defecto del tejido conectivo en un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Los métodos de la presente invención, por tanto, pueden usarse para tratar a un paciente, en algunas realizaciones un paciente humano, de una serie de enfermedades como se ha indicado anteriormente. Los métodos también pueden usarse en una base profiláctica para prevenir o minimizar la aparición de estas enfermedades.  
35

La presente invención se extiende también a las composiciones como se analizan en el presente documento para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades del sistema músculo-esquelético tales como la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD). También pueden emplearse de forma útil con respecto a la regeneración y la reparación del cartílago o el tratamiento de afecciones que se benefician de una mayor producción de HA, tales como por ejemplo, la osteoartritis de las articulaciones sinoviales, la oftalmología, la prevención de adherencias abdominales post-quirúrgicas, el tratamiento de la piel y la reparación y la restauración de la función de la matriz extracelular; o la inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.  
40  
45

Las composiciones como se analizan en el presente documento también pueden usarse en la producción de una matriz extracelular adecuada para el trasplante en un defecto del tejido conectivo en un sujeto que necesite un tratamiento de este tipo, y también para la regulación de la condrogénesis y la proliferación y/o la producción celular, regulando positivamente o estimulando la producción de hialuronano (HA).  
50

La presente invención también se extiende al uso de composiciones como se analizan en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades del sistema musculoesquelético, tales como la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis (OA) y la degeneración del disco intervertebral (DD). El uso también se extiende a la regeneración y la reparación del cartílago o el tratamiento de afecciones que se benefician de una mayor producción de HA, la osteoartritis de las articulaciones sinoviales, la oftalmología, la prevención de adherencias abdominales post-quirúrgicas, el tratamiento de la piel y la reparación y la restauración de la función de la matriz extracelular; o la inducción de la reparación y la restauración del cartílago o la neogénesis de la matriz.  
55  
60

El uso de composiciones como se analizan en el presente documento también se extiende a la fabricación de un medicamento para la producción de una matriz extracelular adecuada para el trasplante en un defecto del tejido conectivo en un sujeto que necesita un tratamiento de este tipo, y para la regulación de la condrogénesis y la proliferación y/o la producción celular, regulando positivamente o estimulando la producción de hialuronano (HA).  
65

La presente invención permite la administración de las composiciones de la presente invención para implantar células progenitoras en un paciente que posteriormente se inducen a aumentar la producción de HA y/o experimentar una transformación en un fenotipo condrogénico.

5 Serían ejemplos de dicha aplicación inyectar las composiciones de la presente invención en las articulaciones de individuos con lesiones de cartílago o de disco, o por vía sistémica para otros sitios menos accesibles, lo que permite que la preparación perfunda a los tejidos y células ejerciendo de este modo sus efectos biológicos singulares. Las aplicaciones podrían incluir cualquier tratamiento de individuos que pueden no tener la enfermedad clínica definida (con frecuencia OA o trastornos relacionados) pero han sufrido una lesión traumática en tejidos de las articulaciones a través del deporte o la actividad relacionada con el trabajo.

En sujetos mayores con OA o trastornos relacionados esta forma de tratamiento podría usarse en lugar de la terapia con HA intraarticular (viscocomplementación).

15 También podría servir como un método profiláctico después de la cirugía artroscópica o abierta donde fue necesaria la escisión/desbridamiento del cartílago o el menisco. Está bien establecido que con el tiempo dichos pacientes postquirúrgicos generalmente progresarán para presentar OA sintomática que requiere tratamiento médico. No es improbable que mediante la disminución de la degradación del cartílago también puedan mejorar los síntomas debido a la reducción en la producción de autoantígenos derivados de cartílago que promueven la inflamación.

20 Pueden someterse a ensayo adicionalmente composiciones de acuerdo con la invención que se ha demostrado que tienen actividad, para determinar la seguridad y eficacia en otros modelos animales, y después proceder a ensayos clínicos en seres humanos, si se desea. Naturalmente, para aplicaciones veterinarias, no se requiere ningún ensayo clínico en seres humanos. Aquellas composiciones que son seguras y eficaces en animales o seres humanos pueden administrarse a un sujeto adecuado para el tratamiento o, como alternativa, para la protección frente a las enfermedades analizadas en el presente documento. "Tratamiento y protección" incluye medidas tanto profilácticas como terapéuticas para prevenir el inicio y la aparición de enfermedades como se analizan en el presente documento.

30 Los métodos de tratamiento del presente documento se refieren a la defensa contra o a la inhibición de un síntoma, al retraso de la aparición de un síntoma, a la reducción de la gravedad del desarrollo de un síntoma y/o a la reducción del número o tipo de síntomas que padece un individuo, en comparación con la no administración de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención. En consecuencia, en toda la presente descripción, se entenderá que cualquier atenuación clínicamente o estadísticamente significativa de incluso un síntoma de una afección degenerativa musculoesquelética conforme al tratamiento de acuerdo con la presente invención, está dentro del alcance de la invención.

40 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente aspectos de la presente invención. Sin embargo, no son de ninguna manera una limitación de los contenidos o la divulgación de la presente invención como se indican en el presente documento.

#### Resultados y discusión

45 La presente invención ha demostrado que la adición de polisacáridos polisulfatados a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones a medios criogénicos tales como Profreeze® y DMSO al 7,5 % que contienen células progenitoras en números tanto altos como bajos, seguida de la congelación en fase vapor de nitrógeno líquido y la descongelación a temperatura ambiente o 37 °C, no tuvieron ningún efecto perjudicial sobre su viabilidad. Esto puede observarse mediante las figuras 1-3. De hecho, se observó una viabilidad potenciada a partir de estos experimentos, en particular en la figura 3 y también en la figura 4, que muestra que la viabilidad de las células progenitoras se potenció con respecto a las células progenitoras congeladas en los medios de crioconservación que no contenían el polisacárido polisulfatado.

55 La Figura 6 muestra claramente que las concentraciones de polisacárido polisulfatado por encima de 1 microgramo/ml redujeron la apoptosis en las células progenitoras humanas en aproximadamente un 50 % cuando estas células se incubaron con IL-4 e IFN-gamma que eran mediadores conocidos de la apoptosis.

60 También se ha demostrado que el polisulfato de pentosano estimula la proliferación de células progenitoras de una manera pendiente de la concentración. La estimulación marcada de la división celular, como se mide con el ensayo de escisión por deshidrogenasa mitocondrial WST-1 se observa en la figura 4 y a partir de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en el ADN en la figura 5 que se demostró en el intervalo de 1-5 microgramos/ml en cultivos en monocapa y micromasa de células progenitoras humanas, así como en una estirpe celular progenitora murina en la figura 10.

65 Al contrario que varios miembros de la súper familia BMP-TGF-beta (por ejemplo, BMP-2, BMP-7, BMP-8) y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos que promueven la diferenciación de células progenitoras a osteoblastos cuando se cultivan en medios osteogénicos, se descubrió por primera vez que el polisulfato de pentosano suprime la diferenciación de las células progenitoras a este fenotipo celular. Esto puede observarse en la



figura 7 y se muestra la regulación negativa de la célula progenitora con respecto a la osteogénesis.

Por otra parte, células progenitoras cultivadas en medios adipogénicos en presencia de polisulfato de pentosano mostraron diferenciación en adipocitos. Por tanto, el polisulfato de pentosano actúa como un regulador de la diferenciación de células progenitoras en adipocitos. Esto puede observarse en la figura 8.

En condiciones de cultivo no selectivas normales, la incubación de polisulfato de pentosano con células progenitoras favoreció invariablemente la diferenciación a lo largo de la vía condrogénica como se demuestra por el aumento de la síntesis de proteoglucano y colágeno de tipo II. Los proteoglucanos y colágeno de tipo II son productos biosintéticos reconocidos de condrocitos y se usan como marcadores fenotípicos de cartílago hialino. El efecto promotor condrogénico del polisulfato de pentosano se mostró en la estirpe celular de CMM murina C3H10T1/2 en la figura 9 y las células progenitoras humanas en la figura 11 cuando se cultivaron en monocapas.

Se proporcionó soporte adicional en cultivos de sedimento usando la estirpe celular murina ATDC5 en la que se observó un aumento del 25 % en la síntesis de proteoglucanos (PG) con respecto al cultivo de control (sin polisulfato de pentosano) a 2 microgramos/ml en la Figura 12.

Se proporcionaron pruebas adicionales de que el polisulfato de pentosano promovió la condrogénesis y la formación de cartílago mediante el examen de la expresión génica por estas células después de 6 días en cultivo de sedimento, donde la expresión de colágeno de tipo II, se reguló positivamente de una manera dependiente de la concentración por el polisulfato de pentosano. Esto puede observarse en la figura 13.

Curiosamente, la heparina, un polisacárido polisulfatado de origen natural no logró estimular significativamente la síntesis de proteoglucano en cultivo de sedimento a lo largo de todas las concentraciones examinadas. Esto puede observarse en la figura 14. La heparina muestra poca actividad a la concentración de 2,5 ugramos/ml, pero puede causar inhibición a concentraciones más altas.

Usando la estirpe de CMM murina C3H10T1/2 en un cultivo de sedimento de 7 días se demostró que el polisulfato de pentosano a 10 microgramos/ml aumentó la síntesis de proteoglucanos en más de un 80 % de los valores de control. Esto puede observarse en la Figura 15. Este hallazgo es coherente con los resultados obtenidos usando una estirpe de CMM murina C3H10T1/2 en cultivos de micromasa de más de 6 días que pueden observarse en la figura 16. Este método de cultivo de células progenitoras se describió originalmente por Denker et al (Andrew E. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. *Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential progenitor cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. Differentiation* (1999) 64:67-76 1999).

Además, después de nueve días en cultivos de micromasa se obtuvo una estimulación del 100 % a 1 microgramo/ml polisulfato de pentosano, lo que también se muestra en la figura 16. Las células progenitoras humanas también se diferenciaron a condrocitos en cultivos de micromasa cuando se incubaron en presencia de polisulfato de pentosano. Sin embargo, en los cultivos de 5 días se obtuvo una estimulación máxima de la síntesis de PG del 30 % con una concentración de polisulfato de pentosano de 2,5 microgramos/ml como se muestra en la figura 17. La coproducción de colágeno de tipo II con PG se confirmó en estos cultivos de micromasa usando la técnica de inmunotinción descrita por Denker et al (Andrew E. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. *Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential progenitor cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. Differentiation* (1999) 64:67-76 1999).

Como es evidente a partir de la Figura 18, cultivos de micromasa de células progenitoras humanas mantenidas en presencia de polisulfato de pentosano en el intervalo de concentraciones de 1-10 microgramos/ml durante 10 días proporcionaron una tinción del colágeno de tipo II intensa, consiguiéndose los niveles máximos con polisulfato de pentosano a 5 microgramos/ml.

En cultivos de micromasa similares realizadas con células progenitoras humanas y hialuronano (HA) se observó un nivel bajo de incorporación de <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> en los PG en la Figura 19A. Sin embargo, el sulfato de dextrano (DS) altamente cargado negativamente inhibió la síntesis de PG en el intervalo de 1-20 microgramos/ml (Figura 19B). Este fue un resultado sorprendente, ya que el DS tiene una densidad de peso y una carga molecular similares a las del polisulfato de pentosano y, por tanto, se esperaba que mostrase una actividad similar sobre las células progenitoras. Se cree que la conformación molecular y otros factores importantes para la unión eficaz al receptor y las interacciones de proteínas pueden desempeñar un papel.

Se notifica que el hialuronano ejerce efectos sobre las células progenitoras condrogénicas en cultivos de perlas de alginato (Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, Barry F. *Chondrogenic differentiation of human progenitor cells within an alginate layer culture system. In vitro Cell. Dev. Biol - Animal.* 38:457-466, 2002). En la figura 20 los efectos del polisulfato de pentosano solo y en combinación con hialuronano (Supartz™) sobre la proliferación de las células progenitoras humanas usando el ensayo de WST-1 se muestran para cultivos de 3 días y de 5 días. Los resultados de este experimento confirmaron la ausencia de cualquier efecto estimulante significativo del HA solo sobre la proliferación de las células progenitoras y también demostraron la ausencia de cualquier efecto sinérgico para las

combinaciones con polisulfato de pentosano. Por tanto, puede observarse que el polisulfato de pentosano es un agente condrogénico mejor que el HA. Además, al contrario que NC4, HA no se combina sinérgicamente con polisulfato de pentosano.

- 5 También se descubrió que una preparación humana recombinante del dominio no colagenoso de la cadena alfa-1 de colágeno de tipo IX, rhNC4, induce la condrogénesis y la producción de PG por las células progenitoras. Como es evidente a partir de la Figura 21, se observó una estimulación dependiente de la concentración de la síntesis de PG tanto en ausencia (medio de mantenimiento) como en presencia de insulina (medio de diferenciación) en células ATDC5, produciéndose los efectos máximos a 1 microgramo/ml. Este efecto estimulante de rhNC4 se demostró también en cultivos de sedimento de células ATDC5 pero en medios de mantenimiento el efecto óptimo se produjo a una concentración de 0,5 microgramos/ml.

15 Se observó que los efectos condrogénicos y mitogénicos de rhNC4 sobre las células murinas ADTC5 se potenciaron cuando la proteína se cocultivó con polisulfato de pentosano como puede observarse en las figuras 23 y 24. La combinación de rhNC4 y polisulfato de pentosano fue, al contrario que el HA y el polisulfato de pentosano, sinérgico, como se demuestra por una estimulación del 450 % de la síntesis de <sup>3</sup>H-ADN en medios de cultivo de diferenciación a concentraciones de 1 microgramo/ml de rhNC4 y 2 microgramos/ml de polisulfato de pentosano (Figura 23). En términos de estimulación de la síntesis de PG, 1-5 microgramos/ml de rhNC4 con 5 microgramos de polisulfato de pentosano pareció ser la combinación más eficaz (Figura 24).

20 Las figuras 21, 33 y 23 muestran el resultado de experimentos usando tanto un medio de diferenciación (MD) para las células progenitoras (ATDC5) que contienen un factor de crecimiento (en este caso insulina) como el medio de mantenimiento (MM) que no contiene un factor de crecimiento. La Figura 21 muestra el uso de NC4 solo, mientras que las figuras 33 y 23 muestran los efectos de la combinación del polipéptido y el polisacárido polisulfatado. Puede observarse que los compuestos de la presente invención promovieron la condrogénesis en ausencia del factor de crecimiento pero también tuvo un efecto positivo en la tasa de condrogénesis en presencia de los factores de crecimiento. Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse sin otros factores de crecimiento, pero también pueden usarse con otros factores de crecimiento para promover la condrogénesis adicionalmente.

30 Los estudios de la expresión del gen Runx 2 por las células ATDC5 cultivadas en presencia de rhNC4 y polisulfato de pentosano mostraron una regulación negativa progresiva de este marcador óseo con concentraciones crecientes (figura 25 y 26). Por el contrario, uno de los genes para la síntesis de HA (HAS3) y el receptor para HA (CD44) fueron regulados positivamente por estos compuestos (Figura 25 y 26). Fue de particular interés el hallazgo de la regulación positiva de Smad 2 y Smad 4 por el polisulfato de pentosano solo y el polisulfato de pentosano + rhNC4 a concentraciones que se demostró que estimulan la síntesis de PG. Se ha notificado que Smad 4 es una proteína intracelular importante para la transactivación del promotor de colágeno de tipo II en las células progenitoras cuando estas células son activadas por BMP (Hatakeyama Y et al. *Smad signaling in progenitor and chondroprogenitor cells. J Bone Joint Surg AM.* 85A Supl. 3, 13-8, 2003, Chen D, Zhao M, Munday GR, *Bone morphogenetic proteins. Growth Factors*, 22: 233-41, 2004). Aunque sin desear quedar ligado por teoría alguna, es posible, por tanto, que los efectos proliferativos/condrogénicos del polisulfato de pentosano y el NC4 sobre las células progenitoras puedan estar mediados a través de las acciones de los BMP, cuyos niveles están elevados en presencia de estos dos compuestos cuando se usan solos o en combinación.

#### 45 Métodos y protocolos experimentales

##### *Determinación del contenido de proteína de las muestras usando el ensayo de ácido bicinconínico (BCA),*

50 El contenido de proteína de todas las muestras se determinó usando el ensayo BCA (Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ y Klenk DC *Anal. Biochem.* 150, 76-85, 1985). Se disolvieron muestras de proteínas secadas por congelación directamente en H<sub>2</sub>O para proporcionar una solución 2,0 mg/ml. Se añadieron 20 µl de cada solución de muestra a un pocillo de placas de 96 pocillos. Justo antes del ensayo, se mezclaron 50 partes de reactivo 1 (NaOH al 0,4 %; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1,7 %; NaHCO<sub>3</sub> al 0,95 %; ácido bicinconínico al 1,0 %; Na<sub>2</sub>-tartrato al 0,16 %) con el reactivo 2 (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al 4 %). Se añadieron 200 µl de este reactivo de trabajo a la solución de muestra. Después de incubación a 37 °C durante 60 min se leyó la absorbancia A562 usando un lector de microplacas Thermomax. Se usaron albúmina de suero bovino (BSA) o gelatina altamente purificada (Gibco) a 0-10 µg/pocillo para construir una curva patrón. El contenido de proteína de las muestras se determinó a partir de esta curva patrón.

##### *Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE*

60 El método utilizado se basa en el descrito por Laemmli (Laemmli UK. *Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature.* 1970; 227:680-685). Brevemente, se mezclaron muestras 1:1 con 2x tampón de carga de muestra (Tris-HCl 0,07 M, SDS al 1,5 %, glicerol al 20 %, DTT 0,2 M y BPB al 0,1 %) para conseguir las concentraciones finales de entre 4,0-20 mg/ml. La mezcla se hirvió en un baño de agua durante 5 min. Se cargaron 20 µl de solución en los pocillos 8-16 % gel de Tris-glicina prefabricado (Norvex). Se cargaron marcadores de proteína de bajo intervalo de peso molecular preteñidos con SeeBlue (Norvex) en los pocillos en la

parte izquierda del gel y se realizó la electroforesis a 125 V durante 2 h. El gel se tiñó en solución de azul de Coomassie R250 (etanol al 40 %, ácido acético al 10 % y Coomassie R250 al 0,2 %) durante 30 min y se destiñó en una solución que contenía etanol al 10 % y ácido acético al 7,5 % durante 16 h. El gel se secó en un secador de Bio-Rad Gelair.

5 *Ensayo de glucosaminoglucano sulfatado (S-GAG) usando el colorante DMMB*

Se determinaron las concentraciones de glucosaminoglucano sulfatado (S-GAG) en las muestras usando un ensayo de unión de colorante colorimétrico modificado del descrito por Farndale et al. (Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. *Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethyl methylene blue. Biochem. et. Biophys. Acta.* 1986; 883:173-177).

15 El ensayo se basa en un desplazamiento metacromático en máximos de absorción de 690 nm a 535 nm cuando se forma un complejo entre una mezcla de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB) y el GAG sulfatado en la muestra o en una solución patrón. La solución de colorante se hizo mediante la adición de 16 mg de azul de 1,9-dimetilmetileno a 5 ml de etanol a 2 g de formiato de sodio y 2 ml de ácido fórmico en un volumen total de 1 litro a pH 3,5. Se transfirieron patrones (0-15 y 0-40 µg/ml:50 µl) de condroitina-6-sulfato (CS-C) o muestras (50 µl) a una placa de microtitulación. Se añadió la solución de colorante (200 µl) inmediatamente a cada pocillo y se midió la absorbancia a 540 nm, inmediatamente a medida que se formaba un precipitado en reposo. Se representó una curva patrón usando la absorción de muestras de concentración conocida de CS-C y el software del lector de placas. La concentración del S-GAG en las muestras desconocidas se determinó a partir de la curva patrón CS-C.

*ELISA de hialuronano (HA)*

25 Se recubrieron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos (Maxisorp®, Nunc) a 4 °C durante la noche con HA de cordón umbilical (Sigma Chemical Co) (100 µl/pocillo) disuelto en el tampón de recubrimiento. Después, las áreas no recubiertas se bloquearon con 150 µl/pocillo de BSA al 1 % (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 60 min a 25 °C. Después del lavado con PBS-Tween, se añadieron 100 µl de las muestras que se van a someter a ensayo o competidor patrón (HA Healon®: intervalo 19,53-10.000 ng/ml) junto con proteína de unión a HA conjugada con biotina (1:200). Después de la incubación durante 60 min a 25 °C, las placas se lavaron y después se añadió una peroxidasa-anti-biotina monoclonal de ratón (Invitrogen) (100 µl/pocillo; 1:4000) y la mezcla se incubó durante 60 min a 25 °C. Las placas se lavaron de nuevo y después se añadió un sustrato de peroxidasa (Invitrogen) (100 µl/pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 10-20 minutos para permitir que el color se desarrollase. La reacción se detuvo por adición de 50 µl de H2SO4 4 M. La relación de absorbancia a 492/690 nm se midió usando el lector multiplaca Titertek Multiskan M340.

*RT-PCR semicuantitativa de ARNm*

40 Se aisló ARN total a partir de células progenitoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el mini kit de RNA total Aurum (Bio-Rad, EE.UU.). El ARN se transcribió de forma inversa con el kit de síntesis de ADNc RevertAid™ H Minus First Stand (Fermentas, EE.UU.). Las Tablas 1 y 2 muestran las secuencias de cebadores y las condiciones utilizadas para la PCR. Los productos de la PCR se transfirieron a un gel de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio, y las densidades integradas se calcularon usando el software de análisis de imágenes Scion, normalizadas con el gen constitutivo de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para permitir comparaciones semi-cuantitativas en los niveles de ARNm. (L. Marchuk, P. Sciore, C. Reno, C.B. Frank, D.A. Hart. *Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage, Biochim Biophys Acta.* 1379 (1998) 171-177. R. Boykiw, P. Sciore, C. Reno, L. Marchuk, C.B. Frank, D.A. Hart. *Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments, Matrix Biol.* 17 (1998) 371-378).

50 Tabla 1

Cebadores para PCR con transcriptasa inversa murina					
Gen (murino)	Secuencia de cebador	T m	Ciclos	Tamaño del producto	Protocolo
GADPH	D: 5'CAC CAT GGA GAA GGC CGG GG 3' I: 5'GAC GGA CAC ATT GGG GGT AT 3'	55	28	418	RT130308
SOX-9	D: 5'CTG AAG GGC TAC GAC TGG AC 3' I: 5'GAG GAG GAA TGT GGG GAG TC 3'	58	28	406	RT040308
Agrecano	D: 5'AGG AGG TGG TAC TGC TGG TG 3' I: 5'TCT CAC TCC AGG GAA CTC GT 3'	55	28	448	RT130308
Colágeno de tipo II	D: 5'AGT CAA GGG AGA TCG TGG TG 3' I: 5'CGT CGT GCT GTC TCA AGG TA 3'	58	28	598	RT040308
ALPH	D: 5'GCC CTC TCC AAG ACA TAT A 3' I: 5'CCA TGA TCA CGT CGA TAT CC 3'	55	28	372	RT130308

Tabla 2 Cebadores utilizados para RT-PCR semi-cuantitativa

Gen (humano)	Temp. de hibridación (°C)	Tamaño del producto (pares de bases)	Secuencias (de 5 'a 3')
Agrecano	65	110	Directo: ACTTCGCTGGTCAGATGGA Inverso: TCTCGTGCCAGATCATCACC
Colágeno II	65	106	Directo: CAACACTGCCAACGTCCAGAT Inverso: CTGCTTCGTCCAGATAGGCAAT
SOX9	68	101	Directo: ACACACAGCTCACTCGACCTTG Inverso: GGAATTCTGGTTGGTCTCTCTT
hsp 70	60	590	Directo: TTTGACAACAGGCTGGTGAACC Inverso: GTGAAGGATCTGCGTCTGCTTGG
HAS1	65	348	Directo: CGGCCTGTTCCCCTTCTTCGTG Inverso: TCGTGTGCTACGCTGCGGACCA
HAS2	51	358	Directo: CACAGCTGCTTATATTGTTG Inverso: AGTGGCTGATTTGTCTCTGC
HAS3	55	317	Directo: CAGCCTCCTCCAGCAGTTCC Inverso: TAACCGTGGCAATGAGGAAG
HYAL1	51	208	Directo: AGCTGGGAAAATACAAGAACC Inverso: TGAGCTGGATGGAGAACTGG
HYAL2	55	448	Directo: GAGTTCGCAGCACAGCAGTTC Inverso: CACCCAGAGGATGACACCAG
HYAL3	65	500	Directo: CCGCCTCCAGTGCCCTCTTCC Inverso: AGCCAGCCCCAGTAACAGTG
MMP-1	68	84	Directo: CTGTTCAGGGACAGAATGTGCT Inverso: TCGATATGCTTACAGTTCTAGGG
MMP-2	56	~ 100	Directo: TCAAGTTCCCCGGCGAT Inverso: TGTTCAGGTATTGCACTGCCA
MMP-3	65	138	Directo: TTTTGGCCATCTCTTCCTTCA Inverso: TGTGGATGCCTCTTGGGTATC
MMP-9	56	~ 100	Directo: TGAGAACCAATCTCACCGACAG Inverso: TGCCACCCGAGTGTAAACCAT
MMP-13	65	96	Directo: TCCTTCTTGAGCTGGACTCATT Inverso: CGCTCTGCAAAGTGGAGGTC
iNOS humano	60	340	Directo: CAGTACGTTTGGCAATGGAGACTGC Inverso: GGTCACATTGGAGTGTAGAGCTTG
□5-Integrina	55	324	Directo: CATTTCCGAGTCTGGGCCAA Inverso: TGGAGGCTTGAGCTGAGCTT
□1-Integrina	55	452	Directo: TGTTCAGTGCAGAGCCTTCA Inverso: CTTCATACTTCGGATTGACC
Dominio extra de fibronectina A	56	143	Directo: CAT TCA CTG ATG TGG ATG TC Inverso: CAG TGT CTT CTT CAC CAT CA
Dominio extra de fibronectina B	56	129	Directo: CCG CCA TTA ATG AGA GTG AT Inverso: AGT TAG TTG CGG CAG GAG AAG
Fibronectina total	60	184	Directo: GAT AAA TCA ACA GTG GGA GC Inverso: CCC AGA TCA TGG AGT CTT TA
CD44	56	602	Directo: GATCCACCCCAATTCCATCTGTGC Inverso: AACCGCGAGAATCAAAGCCAA GGCC
ADAMTS1	60.4	~ 100	Directo: GAACAGGTGCAAGCTCATCTG Inverso: TCTACAACCTTGGGCTGCAAA
ADAMTS4	56	~ 100	Directo: CAAGGTCCCATGTGCAACGT Inverso: CATATGCCACCACCAGTGTCT
ADAMTS5	60.4	~ 100	Directo: TGTCCTGCCAGCGGATGT Inverso: ACGGAATTACTGTACGGCCTACA
GAPDH	53	370	Directo: TGGTATCGTGGAAGGACTCAT Inverso: GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC

*Separación de proteínas/polipéptidos de Peptacan usando resina de intercambio catiónico Dowex MAC3*

La resina Dowex MAC3 (100 gramos) (Sigma Chemical Co) se regeneró como la forma de hidrógeno durante 24 horas usando HCl al 4 %. Por medio de un filtro de vidrio sinterizado la resina se lavó minuciosamente (2 l de H<sub>2</sub>O, 3 veces) después se equilibró con acetato de calcio 0,1 M, se ajustó a pH 4,5. El Peptacan (10 gramos) se disolvió en acetato de calcio 0,1 M, pH 4,5 a una concentración de 5 mg/ml, después se mezcló con la resina y se agitó suavemente durante 1 h. La solución que contenía los S-GAG y las proteínas no unidos se separó de la resina por filtración y la resina se lavó con tampón de carga (10 veces el volumen de resina) hasta que no pudo detectarse nada de S-GAG usando el ensayo de Farndale et al. La resina se lavó adicionalmente varias veces, con agua Milli-Q y después se equilibró con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M. Las proteínas unidas a la resina se liberaron mediante una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M ajustada a pH 10,5 con NaOH. La resina se separó de nuevo por filtración a través de un embudo Buchner de vidrio sinterizado, se recogió el filtrado y se sometió a diafiltración usando una membrana TFF de 1 kDa (Millipore Australia Pty Ltd, Sydney, Australia) y después se liofilizó.

15 *Separación de proteínas/polipéptidos de Peptacan usando el método de precipitación de cloruro de cetilpiridinio (CPC)*

El cloruro de cetilpiridinio (CPC) es un tensioactivo hidrosoluble que forma complejos insolubles en agua fuertes entre su ion piridinio cargado positivamente y los grupos sulfato cargados negativamente presentes en los componentes de glucosaminoglucano sulfatado (S-GAG) de los Peptacan.

Estos complejos CPC-S-GAG insolubles en agua se han utilizado ampliamente durante los últimos 40 años por muchos investigadores para aislar y purificar S-GAG de extractos de tejidos o fluidos biológicos. Sin embargo, los investigadores razonaron que este principio también podría usarse para aislar las proteínas/polipéptidos presentes en los Peptacan, puesto que después de la precipitación y la retirada de los complejos CPC-S-GAG las proteínas de Peptacan quedarían en los licores de filtración. El procedimiento utilizado para la etapa de precipitación de CPC-S-GAG se basó en el método descrito por Oegema y Thompson (Oegema TR y Thompson RC. *Characterisation of a hyaluronic acid-dermatan sulfate proteoglycan complex from dedifferentiated human chondrocyte cultures*. *J Biol Chem*. 256:1015-1022; 1981) pero modificado mediante el uso de cloruro de calcio 2 M para disociar el complejo GAG-CPC y precipitar los S-GAG en solución acuosa con 4 veces el volumen acuoso de etanol. La solución acuosa que contenía las proteínas/polipéptidos de Peptacan, después de la retirada del complejo CPC-S-GAG se diafiltró ampliamente usando una membrana de ultrafiltración de 1000 Da de punto de corte (YC10) o un cartucho de ultrafiltración de flujo tangencial (TFF) de PM de corte similar (Millipore Australia Pty Ltd, Sydney, Australia). Sin embargo, en las últimas etapas de diafiltración la disolución de diálisis se reemplazó por ácido acético 0,001 M para evitar la precipitación de las proteínas. Las soluciones diafiltradas se liofilizaron para proporcionar las proteínas/polipéptidos en forma de un polvo de color blanco.

*Preparación de rhNC4 usando un sistema bacteriano.*

El gen de NC4 de colágeno IX humano sin el péptido señal 23 se construyó en el vector de expresión bacteriano pGAT-2 en marco con las secuencias para el marcador de fusión GST basándose en un método descrito anteriormente (Pihlajama T, et al. *Characterization of Recombinant Amino-terminal NC4 Domain of Human Collagen IX: Interaction with glycosaminoglycans and cartilage oligomeric matrix protein*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 24265-24273). La construcción de NC4 recombinante humano (rhNC4) se transfirió a una estirpe celular BL21 de *Escherichia coli* (DE3). La proteína de fusión se expresó en matraces de agitación mediante la inoculación (1:100) de la estirpe celular en el volumen final deseado de medio LB complementado con 100 microg/ml de ampicilina. Las células se cultivaron a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó el valor 0,6. La expresión se indujo por adición de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para proporcionar una concentración final de 0,5 mM. La incubación se continuó a 37 °C durante 4-6 horas o 16 horas. Después de la centrifugación, los sedimentos celulares se lavaron mediante 1x PBS tres veces y se volvieron a suspender con tampón de homogeneización [NaCl 0,3 M, IGEPAL CA-630 al 0,2 % (Sigma, Sydney, Australia), tampón fosfato de sodio 0,05 M (pH 7), lisozima 0,25 mg/ml], después se almacenaron congelados y después se homogeneizaron en hielo mediante ultrasonidos. El material insoluble se retiró por centrifugación a 17.000 g durante 40 min a 4 °C. La proteína de fusión precipitó en el sobrenadante mediante la adición de sulfato de amonio al 30 % de saturación. El precipitado se recogió por centrifugación a 23.000 g durante 30 minutos a 4 °C y se disolvió en 1x PBS (con IGEPAL CA-630 al 1 %). La solución se aclaró por centrifugación a 23.000 g durante 30 minutos a 4 °C y se aplicó a una columna de glutatión-Sefarosa 4 FF (Amersham Biosciences, Sydney, Australia) a 4 °C con un caudal de 250 µl/min. Con el fin de retirar la endotoxina, se aplicaron 50 volúmenes de columna (VC) de 1x PBS (que contenía Triton X-114 al 0,1 %) para retirar el material no unido y a esto le siguió el lavado con 20 VC de 1x PBS (estéril) (Reichelt P, Schwarz C y Donzeau M. *Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents*. *Protein Expression and Purification* 46: 483-488, 2006). Después de que se equilibrase con 10 VC del tampón de disociación de factor Xa (estéril), el NC4 recombinante (rNC4) se escindió del GST fusionado por digestión durante la noche con proteasa de Factor Xa (Amersham Biosciences o Promega) a temperatura ambiente. La solución de rhNC4 migró a través de la columna de glutatión-Sefarosa con la elución de tampón de unión 4 FF de Benzamidina Sefarosa (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) y se sometió a purificación adicional usando una columna 4 FF de Benzamidina Sefarosa (Amersham Biosciences). El rhNC4 de flujo continuo se concentró y se desaló por lavado con dH<sub>2</sub>O en un

concentrador de punto de corte 5K (Agilent Technologies). La purificación final se consiguió por cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna Superdex S-200. El tamaño y la pureza del producto se determinó por análisis por DTS-PAGE y transferencia Western. La concentración de rhNC4 purificado se determinó usando el Bradford (Sigma, Sydney, Australia) o los ensayos de proteínas BCA.

5

*Expresión de NC4 humano en levadura K. lactis-*

*(i) Aislamiento del gen del dominio NC4 del Colágeno  $\alpha$ 1(IX)*

10 El gen de NC4 de colágeno IX humano (número de acceso de GenBank NM\_001851) sin el péptido señal 23 se obtuvo mediante PCR de transcripción inversa con ARN extraído de condrocitos humanos de cartílago articular. Se sembraron condrocitos humanos en medio MEM-alfa complementado con FCS al 10 %. Cuando las células fueron confluentes, se tripsinizaron y se recogieron en forma de un sedimento celular por centrifugación. El ARN total se extrajo del sedimento celular con el RNeasy® Mini Kit (Qiagen Pty Ltd, Melbourne, Australia). Se realizó la PCR de transcripción inversa con SuperScript™ One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen, Melbourne, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores corriente arriba y corriente abajo eran KL-NC451 y KL-NC431 (Tabla 1), respectivamente. La síntesis de ADNc se realizó usando 1 ciclo de 55 °C durante 30 min seguido de 2 min, pre-desnaturalización a 94 °C y 40 ciclos de amplificación por PCR (desnaturalización: 94 °C durante 30 s; Hibridación: 55 °C durante 30 s; Prolongación: 72 °C durante 1 min). Los productos de la RT-PCR se separaron por gel de agarosa al 0,8 % y se purificaron con Gel de purificación SNAP™ (Invitrogen, Melbourne, Australia).

15

20

*(ii) Construcción del vector para la expresión del dominio NC4 del Colágeno  $\alpha$ 1(IX) en levaduras*

25

Se aplicó el sistema de expresión de *K. lactis* (New England Biolab, EE.UU.) para generar una construcción de ADN para la expresión del dominio NC4 del colágeno  $\alpha$ 1(IX) humano (hNC4) en levadura *Kluyveromyces lactis*. Se diseñó un grupo de cebadores oligonucleotídicos (Tabla 1) para amplificar un fragmento de aminoácidos 24-268 del hNC4 de longitud completa (número de acceso de NCBI NP\_001842), que omitió el péptido señal de 23 aminoácidos.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la construcción de vectores de expresión pKLAC1-NC4

Nombre	Cebadores
KL-NC451	5'- ACTCTCGAGAAAAGAGCTGTCAAGCGTCGC-3'
KL-NC431	5'- GTCAGATCTTTATCTCTCGTCGGTGGTCTG-3'
KL-NC454	5'- ACTCTCGAGAAAAGAGCTGTAAAGCGTAGACCAAGATTCC- 3'
KL-NC433	5'- GTCAGATCTTCATTATCTCTCGTCGGTAGTCTGGCTTGGAG TAAT  TCTGGCTGGCAGCTCATGGCAAGTTTCTCTCCTAGGTCTCA GTGG-3'
KL-NC438	5'- CTGAGATCTACCAGGTGGACCTCTTCCATCGGTAGTTTGAC- 3'
GAT2-GST53	5'- CTGAGATCTGGTGCTGGTGCTATGACTAAGTTACCTATACT AGGTTATTGG-3'
GAT2-GST33	5'- ACTGTCTGACTTAGTCATTAATGATCAGATTTTGGAGGATGA TCTCCACC-3'

30

El cebador 5' KL-NC451 contenía un sitio de escisión Xho I modificado por ingeniería genética y el cebador 3' KL-NC431 contenía un sitio de escisión Bgl II modificado por ingeniería genética. Con estos dos cebadores, el fragmento hNC4 sin el péptido señal se amplificó por PCR de transcripción inversa.

El cebador 5' KL-NC454 y el cebador 3' KL-NC433 contenían sitios de escisión de Xho I y Bgl II modificados por ingeniería genética, respectivamente. Diferentes del cebador KL-NC451 y el cebador KL-NC431, KL-NC454 y KL-NC433 proporcionaron una serie de mutaciones de genes que cambiaron el gen hNC4 de acuerdo con los codones preferidos de la levadura *K. lactis* pero conservaron la secuencia de la proteína hNC4 sin cambios.

5 Los productos de la PCR de hNC4 se digirieron por enzimas de restricción y se ligaron al vector de expresión pKLAC1 (Figura 1) en los múltiples sitios de clonación Xho I y Bgl II. Los recombinantes insertados positivos se secuenciaron para confirmar que el inserto del gen NC4 era correcto. Los recombinantes correctos se digirieron por la enzima de restricción Sac II y se transformaron en células GG799 de *K. Lactis* competentes. Se usó medio de base de levadura carbono (YCB) que contenía acetamida 5 mM como fuente de nitrógeno como medio selectivo. Solo después de que los fragmentos Sac II de los recombinantes con los genes NC4 y el gen *amdS* (gen *amdS* presente en pKLAC1) diana se hubieran integrado al ADN cromosómico de la levadura, las células sobrevivieron en este medio YCB selectivo.

15 El cebador 5' GAT2-GST53 y el cebador 3' GAT2-GST33 se diseñaron para obtener un gen de glutatión-S-transferasa (GST) a partir del vector bacteriano pGAT-2 con algunas mutaciones para la expresión en la levadura *K. lactis*. Este gen de GST, que tenía tres codones de parada de la traducción en el extremo 3', se construyó en los múltiples sitios de clonación Bgl II y Sal I del vector pKLAC1 para formar pKLAC1-GST.

20 El cebador 5' KL-NC454 y el cebador 3' KL-NC438 se diseñaron para un hNC4 recombinante que tenía una mutación que convertía el Glu<sup>267</sup> en Gly. Esta mutación proporcionó un sitio de escisión de trombina en el extremo C de hNC4. El hNC4 recombinante se ligó al vector pKLAC1-GST en los sitios de clonación Xho I y Bgl II, de modo que se obtuvo una proteína de fusión GST N-terminal. Después de la confirmación de la secuencia de ADN, el recombinante con el gen de la proteína de fusión NC4-GST se digirió con Sac II y se insertó en el ADN cromosómico de la célula GG799 de la levadura *K. lactis*, después se exploró mediante medio selectivo YCB para determinar la supervivencia de las colonias con los genes de NC4 y *amdS* integrados.

(iii) *Expresión del dominio NC4 del Colágeno  $\alpha 1$ (IX) en células GG799 de levadura K. lactis*

30 Se recolectaron células de cada colonia que contenía un hNC4 de expresión integrada de un área de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> por raspado con una punta de palillo de dientes o una pipeta estériles y se volvieron a suspender en 2 ml de medio YPGal (10 g de extracto de levadura, 20 g de Bacto™ Peptona, galactosa al 2 %) en un tubo de cultivo estéril. Los cultivos se incubaron con agitación (-250 r.p.m.) a 30 °C durante un mínimo de crecimiento de 2 días. Se realizó el análisis del sobrenadante del cultivo cada día para determinar el tiempo de crecimiento óptimo para conseguir la secreción máxima de NC4. Se inocularon 1:100 cultivos más grandes (por ejemplo,  $\geq 1$  l) para la purificación de proteínas con un cultivo iniciador cultivado durante la noche a 30 °C. Se centrifugaron muestras (1 ml de cada cultivo) durante 1 minuto a 10.000 g para sedimentar las células. El sobrenadante del cultivo se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo y se almacenó en hielo. Se aplicaron 30  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo no concentrado a SDS-PAGE (NuPAGE Gel Bis-Tris al 4-12 %, tampón MES, Invitrogen), seguidos de tinción con Coomassie (Kit de tinción con azul coloidal, Invitrogen) y/o transferencia Western.

(iv) *Purificación parcial de la proteína rhNC4 expresada a partir de GG799 de levadura K. Lactis*

45 Se filtraron cultivos de tres días con volúmenes > 1 l, que eran para usarse en la purificación de proteínas, con Celite-512 para retirar las células y los restos. Los filtrados acuosos transparentes se sometieron a diafiltración y se concentraron por aplicación a una membrana de filtración de flujo tangencial (TFF) de 10 kDa de punto de corte (Millipore Ltd, Sydney, Australia). Después de la diafiltración de 2X5 volúmenes de tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), la solución de medio de cultivo se concentró a 1-2 l y se almacenó a 4 °C durante la noche o se procedió inmediatamente con la precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se añadió (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido a la solución de medio de cultivo al 80 % de saturación (0 °C). El precipitado se recogió por centrifugación a 14.000, 30 min, 4 °C, y se disolvió en tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4). La concentración de proteína de hNC4 purificado se determinó usando los ensayos de Bradford o BCA (Sigma, Sydney, Australia). La purificación adicional de este material se realizó usando los mismos métodos como se han descrito en el presente documento para el rhNC4 preparado a partir de *E. coli*.

55 *Crioconservación de células progenitoras en presencia de diversas concentraciones de polisulfato de pentosano (PPS)*

60 Se recogieron células y se volvieron a suspender en medio de cultivo sin suero frío a 5,0 a 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml. Se añadió un volumen igual de medio completo Profreeze®-CDM enfriado a la suspensión celular enfriada que contenía 0, 10, 20, 50 y 100 microgramos/ml de PPS. La concentración de DMSO final resultante fue del 7,5 %, la concentración de PPS fue de 0, 5, 10, 25 y 50 microgramos/ml y la concentración final de células fue de aproximadamente 2,5 a 10 x 10<sup>6</sup> células/ml. La mezcla de células se dividió en alícuotas en ampollas de crioconservación (Nunc, Intermed, Dinamarca) y se crioconservaron en un recipiente de congelación C156 (Thermo Scientific, Melbourne, 21 Australia) a -80 °C a una velocidad de enfriamiento controlada de -1 °C/minuto. Después, las ampollas se transfirieron a almacenamiento en nitrógeno líquido (-196 °C).

*Descongelación de las muestras criopreservadas*

Las células criopreservadas se descongelaron rápidamente durante un minuto en un baño de agua a 37 °C y se transfirieron un tubo de polipropileno de 10 ml. Se añadieron aproximadamente 3 ml de medio adecuado gota a gota a las células con mezcla constante y se completó hasta un volumen final de 10 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación a 400 x g, 4 °C durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Para asegurar la retirada del DMSO residual, las células se lavaron en medio y se centrifugaron como anteriormente. Las células se volvieron a suspender en un volumen final de 10 ml y se sembraron en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> antes de la incubación en una incubadora humidificada a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 %.

*Enumeración de células después de la criopreservación en presencia de diversas concentraciones de polisulfato de pentosano (PPS).*

Se diluyeron partes alícuotas de suspensiones de una sola célula, obtenidas después de descongelar las células progenitoras de los viales criopreservados que contenían PPS, en un volumen igual de azul de tripano al 0,4 % (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los recuentos de células se determinaron usando un hemocitómetro (Neubauer Improved, Assitant, Alemania) y un microscopio óptico (Olympus CKX41, Japón).

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1. En general, puede observarse que la adición de PPS no tuvo un efecto adverso en la criopreservación de las células progenitoras.

Con la excepción de 30 minutos, el uso de PPS 50 µg/ml potenció la viabilidad de las células progenitoras en todos los puntos temporales. El uso de PPS 25 µg/ml ya sea potenció la viabilidad o no afectó negativamente a la viabilidad de las células progenitoras en todos los puntos temporales en lugar de los 30 minutos. El uso de PPS 10 µg/ml tuvo un efecto beneficioso en el punto temporal 0 y después a los 60 y los 90 minutos. El uso de PPS 5 µg/ml tuvo un efecto beneficioso sobre la viabilidad a los 60 minutos.

En conjunto, puede observarse que, en general, la adición de PPS no tuvo un efecto adverso y puede potenciar la criopreservación de las células progenitoras. Las ligeras diferencias en los valores pueden ser atribuibles al método utilizado para contar las células. Debido a que las células progenitoras tienden a agruparse, esto puede conducir a errores, lo que explicaría los valores menores aparentes con 5 microgramos de PPS, cuando la agrupación era normal.

*Efectos determinados por la concentración de polisulfato de pentosano (PPS) sobre la viabilidad de células progenitoras tras la criopreservación y descongelación usando el ensayo de MTT*

Se sembraron células progenitoras murinas (estirpes celulares C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) a diferentes densidades celulares en el intervalo de 1,68x10<sup>5</sup>-1,0x10<sup>6</sup> células en tubos de centrifuga de 2 ml con tapón a rosca que contenían DMEM + FBS al 10 %. En tubos separados se preparó una solución madre que contenía 2x las concentraciones requeridas de PPS disuelto en DMEM + FBS al 20 % y DMSO al 15 %. Estas soluciones madre se añadieron a los cultivos celulares de manera que la concentración final de PPS fue de la mitad de la concentración de la solución madre y la de FBS fue del 10 % y la de DMSO fue del 7,7 %. Durante varios experimentos independientes las concentraciones finales de PPS en las soluciones finales oscilaron entre 0,0-100 µg/ml (véanse las figuras para más detalles). Todas las concentraciones de PPS utilizadas se examinaron por triplicado. Las células y las soluciones de criopreservación que contenían el PPS se mezclaron suavemente durante 5 minutos y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de 3 días, los tubos se retiraron del nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Las células se centrifugaron a 200 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 900 µl de DMEM sin rojo de fenol y después se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos. Las células se volvieron a suspender en 500 µl de solución de MTT 1 mg/ml en DMEM y se incubaron a 37 °C durante 3 horas, después se centrifugaron a 6000 g durante 5 min. Se añadieron 300 µl de DMSO a cada tubo para disolver los cristales de colorante. Se transfirieron 90 µl x 3 de cada tubo a una placa de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 540 nm.

La Figura 2 muestra un gráfico de barras que muestra la viabilidad de diferentes números de células progenitoras ATDC5 suspendidas en medio criogénico que contenía DMSO al 7,5 % y diversas concentraciones de polisulfato de pentosano (PPS) después de haber sido sometido a un ciclo de congelación-descongelación. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de MTT.

La Figura 2 muestra que la viabilidad de las células progenitoras se potenció por la presencia de PPS en todas las concentraciones. A PPS 100 µg/ml la viabilidad se potenció en los recuentos de células de 0,25 millones, 0,5 millones y a 1,0 millón de células. Lo mismo se observa con PPS 250 µg/ml. Para PPS 500 µg/ml, la potenciación se observa para 0,25 millones y 0,5 millones de células. Para 1 millón de células, una concentración de PPS 500 µg/ml no pareció potenciar la viabilidad, pero no fue perjudicial para la viabilidad.



Por extrapolación de estos datos, puede suponerse que una dosis de 100 millones de células condroprogenitoras junto con 25-50 mg de PPS cuando se somete a un ciclo de congelación-descongelación en un medio crioprotector adecuado mantendría la viabilidad de las células a un nivel para la administración aceptable a un paciente que necesita dicha terapia.

5 La Figura 3 muestra los efectos de diferentes concentraciones polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la viabilidad de células progenitoras humana después de la crioconservación a  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la descongelación como se ha determinado usando el ensayo de MTT. Datos mostrados = Medias  $\pm$  DT \* =  $p < 0,05$  con respecto a los valores de control.

10 Cuando se crioconservaron 168.000 células, la presencia de PPS mejoró la viabilidad de las células, en particular a PPS 1 y 2,5  $\mu\text{g/ml}$ . Con 350.000 células, puede observarse que, en general, la viabilidad de las células progenitoras no se ve afectada negativamente por la presencia de PPS. En algunos casos, la viabilidad de las células se potencia después de la descongelación.

15 Por extrapolación de estos datos, puede suponerse que una dosis de 100 millones de células progenitoras humanas junto con 30 mg de PPS cuando se somete a un ciclo de congelación-descongelación en un medio crioprotector adecuado mantendría la viabilidad de las células a un nivel para la administración aceptable a un paciente que necesita dicha terapia.

20 *Efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la apoptosis de células progenitoras humanas inducida por la adición de una combinación de IL-4 IFN-gamma como se determina por citometría de flujo.*

25 Se sembraron en placas células progenitoras humanas en medio sin suero complementado con PPS a concentraciones de 0, 1, 2, 5 y 10 microgramos/ml. Se indujo la apoptosis de las células progenitoras por la adición de una combinación de 30 ng/ml de IL-4 y 30,000U/ml de IFN gamma. Después de 5 días de cultivo, las células se recolectaron por tripsinización y sus viabilidades evaluaron por tinción con Anexina V como se ha descrito anteriormente (Kortessidis A, A Zannettino, S Isenmann, S Shi, T Lapidot and S Gronthos. (2005). *Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. Blood* 105:3793-3801).

35 Los resultados de este experimento se muestran en la figura 6. Puede observarse que la apoptosis celular se reduce para todas las concentraciones de PPS observándose los mejores resultados para 10  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados indican que la adición de PPS en el medio de crioconservación reducirá apoptosis en la descongelación.

40 El experimento se realizó en una placa de 96 pocillos que contenía 50.000 células progenitoras/pocillo. Sin desear quedar ligado a teoría alguna se cree que la apoptosis y la activación de la cascada de proteínas de estrés es una consecuencia reconocida de la congelación-descongelación de las células y, por tanto, la capacidad de PPS para reducir significativamente este proceso debe ser de beneficio para el uso de estas células después de la crioconservación y descongelación como se requiere en la mayoría de los procedimientos médicos basados en células.

45 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) solo o en combinación con rhNC4 sobre la biosíntesis de proteoglucanos (medida como  $^{35}\text{S}$ -GAG) por las células progenitoras cultivadas en cultivos en monocapa*

50 Se sembraron células progenitoras murinas (estirpes celulares C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) en matraces de cultivo de plástico de 50 ml que contenían DMEM de alta glucosa/medio F-12 de Ham 1:1 (Invitrogen) complementado con FBS al 10 % (Sigma) y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Después de que se alcanzara la confluencia, las células progenitoras se liberaron por tripsinización y se recolectaron por centrifugación. Las células se inocularon en placas de 96 pocillos o de 24 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células o  $2 \times 10^5$  células por pocillo. Después de la incubación de 48 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5 % normalmente se establecieron monocapas confluentes. El medio se cambió después a medio definido, que contenía diferentes concentraciones de PPS con y sin rhNC4 y 5  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{35}\text{SH}_2\text{SO}_4$  (PerkinElmer, EE.UU.). Los experimentos se finalizaron en general después de 48 horas de incubación cuando se determinó la biosíntesis de proteoglucanos midiendo la incorporación de  $^{35}\text{SO}_4$  en los glucosaminoglucanos ( $^{35}\text{S}$ -GAG) como se describe a continuación.

60 (A) Placas de 96 pocillos: Los cultivos se sometieron a digestión proteolítica con papaína para liberar los glucosaminoglucanos. La solución madre de papaína utilizada contenía 2,5 mg/ml de papaína (Sigma), 7,9 mg/ml de cisteína-HCl (Sigma) en tampón de digestión por papaína (NaAc 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,0). Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de solución madre de papaína a cada pocillo. Se selló la placa usando láminas de plástico y se incubó a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Tras la finalización, se recogieron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de solución digerida por pocillo para el ensayo fluorométrico de ADN usando colorante Hoechst 33258 y el método descrito por Kim et al (Kim YJ, Sah RLY Doong J-YH, Grodzinsky AJ, *Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 3358. Anal Chem.* 1988; 174: 168-176).

65 Los  $^{35}\text{SO}_4$ -GAG en la solución restante (200  $\mu\text{l}$ ) se precipitaron con cloruro de cetil piridinio (CPC) (Sigma). En

resumen, a cada pocillo se le añadieron 20  $\mu$ l de CPC al 5 %, seguidos de 10  $\mu$ l de sulfato de condroitina A 1 mg/ml (CSA, Sigma) como coprecipitante. Los complejos de  $^{35}$ S-GAG-CPC se recogieron por filtración al vacío usando un recolector de células (Skatron 7021). Los filtros se secaron al aire y discos se perforaron en viales de centelleo. Después de la adición de 3 ml de líquido de centelleo y de la agitación con formación de vórtice la radiactividad de los complejos de  $^{35}$ S-GAG-CPC que estaban en las muestras se midió por recuento de centelleo (PerkinElmer, EE.UU.) y se registró como DPM/muestra. Después, los datos se normalizaron para determinar el ADN y se expresaron como  $^{35}$ S-GAGs/ $\mu$ g de ADN.

(B) Placas de 24 pocillos: Después de 48 horas de incubación en el medio definido, el medio por pocillo (que contenía proteoglicanos marcados con  $^{35}$ S solubles) se separó de las células y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml. Las células en monocapa que quedaban en los pocillos se separaron mediante tripsinización y después se separaron del sobrenadante (que contenía los proteoglicanos de la matriz) por centrifugación a 350 g durante 5 min. El sobrenadante se recogió y se combinó con el medio. Se transfirieron 200  $\mu$ l de la mezcla de medio y sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se sometieron a la digestión con papaína para liberar los glucosaminoglicanos. Después de la digestión con papaína, se añadieron 20  $\mu$ l de CPC al 5 % a cada pocillo para precipitar el  $^{35}$ S-GAG seguido de 10  $\mu$ l de CSA 1 mg/ml como vehículo. Los complejos de  $^{35}$ S-GAG-CPC se recogieron a través del filtro de fibra y la radiactividad de  $^{35}$ S-GAG se midió usando el analizador de centelleo líquido como se ha descrito anteriormente. Las células se extrajeron con el reactivo de RNA y se usaron alícuotas para determinar la expresión génica y/o se midió el contenido de ADN por el ensayo fluorométrico y los resultados se expresaron como  $^{35}$ S-GAGs/ $\mu$ g de ADN.

La Figura 4 muestra los efectos del polisulfato de pentosano sobre la proliferación celular progenitoras humanas.

Se cultivaron células progenitoras humanas primarias en placas de 24 pocillos en medio de crecimiento complementado con PPS a las concentraciones indicadas. En diversos intervalos de tiempo (día 1, 3, 6), el medio de crecimiento se retiró y se reemplazó con medio sin rojo de fenol que contenía la sal de tetrazolio WST-1 durante 2 horas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Se escinde WST-1 por la deshidrogenasa mitocondrial en células viables para producir un tinte de formazán que puede detectarse usando un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. La absorbancia a 450 nm para cada punto temporal se muestra para todas las concentraciones de PPS. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la proliferación el día 6 a concentraciones de PPS en exceso de 1  $\mu$ g/ml (\*p < 0,01, ANOVA). La Figura 4 muestra que la viabilidad de las células progenitoras se potenció con respecto a las células progenitoras congeladas en el medio de criopreservación que no contenía el polisacárido polisulfatado.

La Figura 9 muestra los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la biosíntesis por las células células progenitoras murinas (C3H10T1/2) de los proteoglicanos (PG) y el contenido de ADN cuando se cultivan en cultivos en monocapa. Los datos mostrados son medias  $\pm$  DT.

Puede observarse que en todas las concentraciones de PPS aumenta la biosíntesis de proteoglicanos. Esto demuestra que el uso de polisulfato de pentosano puede inducir la diferenciación, especialmente la condrogénesis en todos los intervalos de concentraciones. El mejor resultado se observa para 5-10  $\mu$ l/ml, siendo 10  $\mu$ l/ml el mejor con respecto a la síntesis de PG y siendo 5  $\mu$ l/ml y 10  $\mu$ l/ml los mejores con respecto al contenido de ADN.

La Figura 10 muestra un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la síntesis de ADN por las células progenitoras murinas (células C3H10T1/2) cultivadas en cultivos en monocapa durante 2 días como se determina por la incorporación de  $^3$ H-timidina en el ADN macromolecular.

La Figura 11 muestra un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS), sobre la biosíntesis de proteoglicanos (PG) como se determina mediante la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglicanos sulfatados ( $^{35}$ S-GAG) de los PG después de cultivos en monocapa de 2 días de células progenitoras humanas. Los datos se expresaron como radiactividad  $^{35}$ S-GAG como desintegraciones por minuto (DPM) normalizadas al contenido de ADN. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,005; \*\*\* = p < 0,0005.

La Figura 21 muestra un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis*, en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y en presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de proteoglicanos (PG) como se determina por la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en los glucosaminoglicanos sulfatados ( $^{35}$ S-GAG) de los PG después del cultivo de 3 días con células progenitoras murinas ATDC5. Los datos se expresaron como % de cambio con respecto a los cultivos de control que no contenían rhNC4. P < 0,05 fue estadísticamente significativo con respecto a los cultivos control.

La Figura 24 muestra los resultados para la combinación de PPS y NC4. Puede observarse que el efecto de PPS aumenta con la concentración. También puede observarse que este efecto se potencia en presencia de concentraciones crecientes de NC4.

La combinación de 0,5  $\mu$ l/ $\mu$ l de NC4 y 5  $\mu$ l de PPS mostró un aumento estadísticamente significativo en la síntesis de proteoglicanos. Además, la combinación de 1  $\mu$ l/ml de NC4 y 2  $\mu$ l/ml y 5  $\mu$ l/ml de PPS mostró un aumento

estadísticamente significativo en la síntesis de proteoglucanos. Además, la combinación de 2 µl/ml de NC4 junto con 1 µl/ml, 2 µl/ml o 5 µl/ml de PPS o la combinación de 5 µl/ml de NC4 junto con 1 µl/ml, 2 µl/ml o 5 µl/ml de PPS todos mostraron un aumento estadísticamente significativo en la síntesis de proteoglucanos.

- 5 El uso de 5 µl/ml de NC4 o 5 µl/ml de PPS mostró los mejores resultados siendo la mejor la combinación de 5 µl/ml de NC4 y 5 µl/ml de PPS.

*Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) solo o en combinación con rhNC4 sobre la biosíntesis de proteoglucanos (medida como <sup>35</sup>S-GAG) por las células progenitoras cultivadas en cultivo de sedimento*

10 Se sembraron células progenitoras murinas (estirpes celulares C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) en tubos de centrífuga de 2 ml con tapón de rosca estériles y el volumen total se completó hasta 1 ml con medio DMEM-alta glucosa que contenía FBS al 10 %. Después, las células progenitoras se centrifugaron a 500 g durante 10 min en un rotor oscilante a temperatura ambiente. Los tapones de rosca se aflojaron y los tubos se colocaron en una incubadora a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 %. Los gránulos se formaron en general a las 24 horas. El medio se cambió a diario en los dos primeros días, después una vez cada 2-3 días a partir de entonces. En el día 5 se retiró el medio y a cada tubo se le añadió 1 ml con medio DMEM-alta glucosa que contenía FBS al 10 %, <sup>35</sup>SH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0 µCi/ml y diversas concentraciones de PPS (0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 µg/ml) (Figura 12-15) o rhNC4 (0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 µg/ml) (Figura 22). Se usaron cultivos por triplicado para todas las concentraciones de fármacos. Los tapones de rosca se aflojaron y los tubos se colocaron en una incubadora a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 % durante 3 días. El día 6, se añadieron 200 µl de solución madre de papaína [papaína 2,5 mg/ml, L-cisteína 7,9 mg/ml en tampón de papaína (NaAc 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,0)] a cada tubo. Los tubos se taparon firmemente y se incubaron a 65 °C durante 2 horas. Después de la digestión con papaína, se transfirieron por separado 4 réplicas de 200 µl de solución digerida de papaína a una placa de microtitulación de 96 pocillos (200 µl/pocillo). La solución restante se usó para los ensayos fluorométricos de ADN que se realizaron por triplicado como se ha descrito anteriormente. La biosíntesis de <sup>35</sup>S-GAG se determinó como se describe para los cultivos en monocapa y los resultados se expresaron como <sup>35</sup>-S-GAG/µg de ADN.

30 La Figura 22 muestra un gráfico de barras de los efectos dependientes de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202P) expresado por *K. lactis*, en ausencia (medio de mantenimiento, MM) y en presencia de insulina (10 microgramos/ml) (medio de diferenciación, MD), sobre la biosíntesis de proteoglucanos (PG) en cultivos de sedimento de células ATDC5. Los datos se muestran como el % de los controles tomados como el 100 %.

35 Se realizaron experimentos similares usando heparina (Sigma, Sydney, Australia) en lugar de PPS. Estos resultados se observan en la figura 14. La heparina regula la diferenciación mediante la supresión de la condrogénesis de las células progenitoras.

40 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) solo o en combinación con rhNC4 sobre la biosíntesis de ADN (medida como incorporación de <sup>3</sup>H-timidina) por las células progenitoras cultivadas en cultivos de sedimento de 6 día*

45 Se sembraron células progenitoras murinas (estirpes celulares C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) a una densidad de 3x10<sup>5</sup> células en un tubo de centrífuga de 2 ml con tapón de rosca y completado hasta 1 ml con DMEM-Alta (+FBS al 10 %). Las células se centrifugaron a 500 g durante 10 min en una centrífuga oscilante a temperatura ambiente, después se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 % durante 24 horas. Se observó que se establecieron los sedimentos durante este tiempo. El medio se cambió cada día en los dos primeros días, después una vez cada 2-3 días a partir de entonces. El día 3, se retiró el medio, a cada tubo se le añadieron 640 microlitros de DMEM (+FBS al 10 %), 80 microlitros de 3H-timidina 50 mCi/ml y 80 microlitros de rhNC4 (0, 1, 2,5, 5, 10, 25 microgramos/ml). (Figura 23)

50 Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Después de 3 días (66 horas), el medio sobrenadante se retiró y se guardó para el ELISA de HA. Se añadieron 100 microlitros de colagenasa 1 mg/ml (disuelta en medio DMEM) a cada tubo de sedimento. Los tubos se incubaron a 37 °C en un agitador a 180-200 rpm durante 3,5 horas. La digestión por colagenasa se transfirió a una placa de 96 pocillos de manera que el contenido de cada tubo se dividió en 4 pocillos. A cada pocillo se le añadieron 200 microlitros de H<sub>2</sub>O y la placa se almacenó a -20 °C para su posterior análisis. Las digestiones con colagenasa se descongelaron y se recogió el ADN con un recolector de células y los discos de filtro se colocaron en un tubo de centelleo. Se añadió líquido de cóctel de centelleo (3 ml) y se agitó con formación de vórtice aproximadamente 1 min. La radiactividad de <sup>3</sup>H-ADN en estas muestras se determinó usando un contador de β-centelleo.

65 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) solo o en combinación con rhNC4 sobre la biosíntesis de proteoglucanos (medida como <sup>35</sup>S-GAG) por las células progenitoras cultivadas en cultivos de micromasa*

La técnica utilizada se basó en la descrita (Denker AE, Haas AR, Nicoll SB y Tuan RS. *Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential progenitor cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein2 in high density micromass cultures. Differentiation* (1999); 64: 67-76). En resumen, Se sembraron células progenitoras murinas (estirpes celulares C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia). Se aplicaron diez microlitros (10 µl) de una suspensión de las células progenitoras (1x10<sup>7</sup> células/ml en medio F12 de Ham + FBS al 10 %) a los pocillos individuales de una placa de 24 pocillos. Después de la incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 % durante 2-3 horas, se añadieron 900 µl de medio de Ham F12 (FBS al 10 %) y 100 µl de solución de PPS en el mismo medio lentamente dentro de los pocillos para proporcionar concentraciones finales de PPS en cada uno de 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 µg/ml solo o en combinación con rhNC4 (0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0 µg/ml). Cada concentración de fármaco se repitió por triplicado. Las células se mantuvieron en cultivo durante hasta 10 días. El medio con/sin fármaco se cambió cada 3 días, pero 24 horas antes de la finalización del experimento se añadieron 80 µl de <sup>35</sup>S-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µCi/ml para conseguir una concentración final de <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> de 5 µCi/ml. El día siguiente, las células en una de las placas se tripsinizaron con 150 µl/pocillo de tripsina al 2,5 % y se separaron del medio por centrifugación a 800 g durante 10 minutos, se lavaron con 500 µl de 1 x PBS y se almacenaron en nitrógeno líquido para la extracción y el análisis del ARN y/o el ADN. Los medios y los sobrenadantes se combinaron en un tubo para cada concentración de PPS utilizada. A los tubos se les añadieron, 200 µl de 5x solución de papaína [papaína 2,5 mg/ml, L-cisteína 7,9 mg/ml en tampón de papaína (NaAc 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,0)] y la solución se incubó a 65 °C durante 2 horas. Después de la digestión con papaína, se transfirieron cuatro partes alícuotas de 200 µl de solución digerida a una placa de 96 pocillos (200 µl/pocillo). El <sup>35</sup>S-GAG liberado por la etapa de digestión se separó del <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> libre mediante la adición de 20 µl de CPC al 5 % y 10 µl de CSA 1 mg/ml con agitación suave a 300 rpm a TA durante 20-30 minutos para precipitar los complejos <sup>35</sup>S-GAG CPC. Los precipitados se recogieron por filtrado a través de filtros de fibra de vidrio usando un recolector de células. Los filtros se secaron al aire y los discos se perforaron a viales de centelleo. Se añadieron 3 ml/vial de líquido de cóctel de centelleo y se agitaron con formación de vórtice durante 30-45 s. La radiactividad de <sup>35</sup>S-SO<sub>4</sub> incorporados los complejos <sup>35</sup>S-GAG-CPC se midió por recuento de centelleo.

#### *Tinción inmunológica de cultivos de micromasa de células progenitoras para el colágeno de tipo II*

Se establecieron cultivos de micromasa de células progenitoras en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de partida de 8x10<sup>4</sup> células/micromasa en 1 ml de DMEM (+ FBS al 10 %) con/sin diversas concentraciones de polisulfato de pentosano como se ha descrito anteriormente. En el Día 5 y el Día 10 de cultivo, se retiró el medio y los cultivos se fijaron con Histochoice MB (Amresco, Solon, OH, EE.UU.) durante 20-30 minutos a TA. Los cultivos fijados se lavaron dos veces en PBS (5 min cada vez); p se lavó en PBS dos veces (5 minutos cada vez); bl durante 20 min a TA, después se lavó en PBS durante 5 min. Las placas después fueron a la incubadora. Después de aclarar, primero con una corriente suave de PBS, seguida del lavado 3 veces (5 minutos cada vez) con PBS, los pocillos se bloquearon con P5 minutos. Para aclarar delG con una corriente suave de PBS después se lavó 3 veces (5 minutos cada vez) con PBS, a cada cultivo de micromasa se le añadió 200 µl de 1x (BCIP/Buffer + NBT) y las placas incubadas en la reacción se detuvo cuando se estableció primero el color púrpura en la sección mediante el lavado en agua corriente. Después se fotografiaron las placas y los pocillos con una cámara digital y las imágenes se analizaron usando el software Image J® (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) en un ordenador personal.

La Figura 16 muestra un gráfico de barras que muestra los efectos dependientes de la concentración del PPS sobre la síntesis de proteoglicanos por células progenitoras murinas (C3H10T1-2) en cultivos de micromasa durante 6 días y 9 días. El PPS estaba incluido en el medio (F12 de Ham + FCS al 10 %) y se cambió cada 48 horas. Se añadió <sup>35</sup>S-SO<sub>4</sub> 24 horas antes de la finalización del cultivo. Síntesis normalizada al contenido de ADN. \* P < 0,05, \*\* P < 0,005, \*\*\* P < 0,0005 con respecto a los controles.

Se observó estimulación altamente significativa de la captación de <sup>35</sup>S en el PG recién sintetizado por encima del intervalo de concentraciones de 1-20 microgramos/ml en esta estirpe celular. (Figura 16). Además, después de nueve días en cultivos de micromasa se obtuvo una estimulación del 100 % a 1 microgramo/ml de PPS (Figura 16).

La Figura 17 muestra gráficos de barras que muestran los efectos dependientes de la concentración del PPS sobre la síntesis de proteoglicanos por las células progenitoras humanas en cultivos de micromasa durante 5 días. Los datos se presentan como radioactividad <sup>35</sup>S-GAG y como un porcentaje del control tomado como el 100 %. \* P < 0,05 con respecto al control. Se observó un aumento de la síntesis de proteoglicanos en intervalos de concentraciones entre 0,5-10 µg/ml.

Las células progenitoras humanas también se diferenciaron en condrocitos en cultivos de micromasa cuando se incubaron en presencia de PPS. Sin embargo, en los cultivos de 5 días se obtuvo una estimulación máxima de la síntesis de PG del 30 % con una concentración de PPS de 2,5 microgramos/ml (Figura 17).

La Figura 18 muestra un gráfico de barras que muestra la estimulación dependiente de la concentración de polisulfato de pentosano (PPS) de la producción de colágeno de tipo II por las células progenitoras humanas en cultivos de micromasa de 10 días como se determina por la exploración y el análisis digital de los cultivos de micromasa inmunoteñidos mostrados en B. Se observó un aumento en la producción de Colágeno de Tipo II a

intervalos de concentraciones entre 0,5-10 µg/ml observándose los mejores resultados para 5 µg/ml.

Estos resultados indican que el PPS induce las células progenitoras a diferenciarse en condrocitos, como se evidencia por el aumento de la síntesis tanto de proteoglicanos como de colágeno de tipo II.

5 Se realizaron experimentos similares usando ácido hialurónico (SuperArtz (SKK, Tokio, Japón)) y polisulfato de dextrano (PM = 5000) (Sigma, Sydney, Australia) en lugar del PPS. Estos resultados se muestran en la figura 19 que muestra gráficos de barras que muestran los efectos dependientes de la concentración de (A) hialuronano (Supartz™) y (B) polisulfato de dextrano sobre la síntesis de proteoglicanos por las células progenitoras humanas  
10 en cultivos de micromasa durante 5 días. Los datos se presentan como radiactividad <sup>35</sup>S-GAG y como un porcentaje del control, tomado como el 100 % o como DPM/ug de ADN. \* P < 0,05 con respecto al control. Puede observarse que el HA pareció aumentar la síntesis de proteoglicanos, pero no fuertemente. Por el contrario, el sulfato de dextrano reguló negativamente la diferenciación de células progenitoras como se evidencia por una reducción dependiente de la concentración en la producción de proteoglicanos.

15 *Efectos de la concentración del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la biosíntesis de ADN (medida como incorporación de <sup>3</sup>H-timidina) por las células progenitoras cultivadas en cultivos de micromasa de 8 días*

20 Se sembraron diez µl de células progenitoras (7x10<sup>6</sup> células/ml) en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos. Después de la incubación a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 % húmedo durante 2-3 horas, se añadieron lentamente a los pocillos 900 µl de medio DMEM-alto (+ 10 % de FBS) y concentraciones indicadas de PPS disueltas en medio DMEM-alto. La concentración final de PPS fue de 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 µg/µl, respectivamente. Cada concentración de PPS se estableció por triplicado. Los cultivos se dejaron proceder durante 3 días. En el día 4, a cada pocillo de la placa de 24 pocillos se le añadieron 640 µl de DMEM-alto (+ FBS al 10 %),  
25 80 µl de solución 10x de PPS y 80 µl de solución 10 µCi/ml de <sup>3</sup>H-timidina para producir una concentración final de <sup>3</sup>H-timidina de 1 µCi/ml y concentraciones de PPS finales como se indican. Después, los cultivos se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 22 horas, se retiró el medio y se añadieron 200 µl de solución de colagenasa 1 mg/ml [tampón de colagenasa: NaCl 66,7 mM, KCl 6,7 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4,8 mM, HEPES 10 mM (pH 7,4)] a cada pocillo. La placa se incubó a 37 °C durante 2,5 horas para liberar las células. Cada media hora, la placa se agitó suavemente a mano. Después de la digestión con colagenasa, la solución de células y la digestión se centrifugaron a 500 g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante. Las células se mezclaron suavemente con 200 µl de tampón TE y se lisaron mediante congelación-descongelación dos veces. Después de la lisis, se añadieron 200 µl más de tampón TE a las células con mezcla. Se aplicaron partes alícuotas de lisado celular a una placa de 96 pocillos en forma de cuatro repeticiones (100 µl cada pocillo). El <sup>3</sup>H-ADN en el lisado celular se recogió usando filtros de fibra de vidrio y un recolector de células. Después, los filtros se secaron al aire y se perforaron en viales de centelleo. Se añadieron 3 ml/vial de líquido de cóctel de centelleo y se agitaron con formación de vórtice durante 30-40 s. La radiactividad de <sup>3</sup>H incorporada en el ADN de las células proliferantes se midió por recuento de centelleo.

40 Los resultados se muestran en la figura 5, que muestra un aumento de la proliferación de las células progenitoras en combinación de PPS. Puede observarse que todas las concentraciones de PPS aumentaron la proliferación observándose los mejores resultados a concentraciones de 1 y 2,5 µg/ml.

45 *Efectos de la concentración del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la biosíntesis de hialuronano (HA) por las células progenitoras mediante la medición de la incorporación de <sup>3</sup>H-glucosamina en HA*

50 Se establecieron células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) en cultivo en micromasa en placas de 24 pocillos usando el método descrito anteriormente, pero sembrando las células progenitoras a una densidad de 7x10<sup>5</sup> células/pocillo. Después de 24 horas en cultivo se cambió el medio y se reemplazó con medio de cultivo DMEM que contenía FCS al 10 % y gentamicina 25 µg/ml que contenía PPS (Bene-Arzneimittel, Munich, Alemania) a concentraciones de (0,0, 0,5, 1,0, 2,5 microgramos/ml) que había sido esterilizado a través de un filtro de 0,22 µm. Los cultivos se incubaron en CO<sub>2</sub> al 5 %/aire húmedo al 95 % a 37 °C durante 8 días con cambios de medio que contenía las concentraciones indicadas de PPS cada 3 días. El 8º día se añadió <sup>3</sup>H-glucosamina al medio de cultivo que contenía las concentraciones indicadas de PPS para proporcionar una solución que contenía 1,0 µCi/ml que se añadió a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 24 h  
55 adicionales. Tras la finalización de los cultivos el día 9, el medio se recogió en tubos tapados de 5 ml y se almacenó a 4 °C antes de la cromatografía por exclusión por tamaño como se describe a continuación.

*Aislamiento y cuantificación de <sup>3</sup>H-hialuronano (<sup>3</sup>H-HA) en medio de cultivo usando cromatografía de filtración en gel*

60 Se etiquetaron como A y B dos alícuotas de 0,5 ml de cada muestra de medio. Se añadieron 20 µl de ácido acético 1 M, pH 6,0 a todas las alícuotas. Se añadieron 50 µl de tampón de reacción (acetato de Na 20 mM y NaCl 0,15 M, pH 6,0) a la alícuota A y se añadieron 50 µl de hialuronidasa de Streptomyces 5 TRU (HIALASA) en tampón de reacción a la alícuota B. Todas las muestras se incubaron a 60 °C durante 3 h, seguido de la ebullición durante 5 min para inactivar la hialuronidasa añadida. Las muestras se almacenaron a -20 °C antes de la filtración en gel.

65

Se usó una columna de filtración en gel rellena previamente con Superdex-S200 para aislar e identificar el  $^3\text{H}$ -HA y los  $^3\text{H}$ -PG en medio de cultivo. Las muestras de medio se centrifugaron rutinariamente a alta velocidad en una microcentrífuga de laboratorio durante 10 minutos inmediatamente antes de cargarlas a la columna. Las muestras (200  $\mu\text{l}$  de cada una) se inyectaron en la columna a través del bucle de muestra y la columna se eluyó con tampón PBS (NaCl 0,15 M,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,05 M, pH 7,2) a un caudal de 0,2 ml/min. El eluyente de la columna se recogió en 1,0 ml/fracción para un total de 186 fracciones y la radiactividad se determinó usando un contador de  $\beta$ -centelleo.

Estos resultados se muestran en la Figura 27. El análisis del área bajo los perfiles cromatográficos antes y después de la digestión con la hialuronidasa de *Streptomyces* (HIALASE) para los cultivos de control que no contenían PPS demostró que el 14,3 % de la  $^3\text{H}$ -glucosamina se incorporó en el HA y el 85,7 % en las subunidades de PG. Como es evidente a partir de los perfiles mostrados en 27A el tamaño molecular del complejo de PG-HA agregado era más grande que el de los monómeros de PG que se liberan cuando el HA es digerido.

De las concentraciones de PPS examinadas solo 0,1 microgramos/ml y 1,0 microgramos/ml mostraron un aumento sustancial en los niveles de  $^3\text{H}$ -HA recién sintetizado en el medio de cultivo. La proporción de radiactividad presente en las fracciones volumen vacío post-digestión de monómeros de PG que es del 50,4 %, demuestra que el 49,6 % se incorporó en el HA para 1 microgramo/ml (Figura 27 C) y el 35,5 % para 0,1 microgramos/ml (perfil no mostrado). Con la menor concentración de PPS (Figura 27B) se encontró una radiactividad del 15,1 % en las fracciones de HA, mientras que con la mayor concentración de 2,5 microgramos/ml, solo se incorporó aproximadamente el 11 % de  $^3\text{H}$ -glucosamina en el HA. Aunque estos datos sugieren que la síntesis máxima de HA por las células progenitoras en cultivos de micromasa se produjo a la concentración de PPS de 1,0 microgramos/ml, los niveles de  $^3\text{H}$ -HA restantes en la matriz extracelular de micromasa todavía se ha de determinar. Puesto que estudios paralelos descritos en el presente documento han demostrado que el PPS estimula la diferenciación condrogénica de las células progenitoras y la formación de proteoglucanos del cartílago, la matriz extracelular que rodea las células puede representar una fuente más rica del HA recién sintetizado en forma de un componente del complejo de PG agregado. Sin embargo, este es el primer informe que demuestra que el PPS estimula la biosíntesis de HA por las células progenitoras cultivadas.

*Efectos de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202p) solo y en combinación con polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la biosíntesis de hialuronano (HA) por las células progenitoras midiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -glucosamina en HA*

Se establecerán células progenitoras murinas (estirpes celulares C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) en cultivos de micromasas como se ha descrito anteriormente o se sembrarán a  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos de cultivo y se dejarán que se fijen durante 24 h antes de la adición de compuestos. Se prepararán diversas concentraciones de preparaciones de rhNC4 solo y en combinación con PPS (Bene-Arzneimittel, Munich, Alemania) en medio de cultivo DMEM que contiene FCS al 10 % y gentamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  al doble de la concentración requerida en los cultivos, se esterilizarán a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y después se diluirán en serie para proporcionar concentraciones finales de los fármacos necesarios para cada experimento. Se añadirán alícuotas de cada una de las soluciones de ensayo a cada pocillo de las placas de cultivo de 24 pocillos. Se diluirá solución madre de  $^3\text{H}$ -glucosamina en medio de cultivo para proporcionar una solución 1,0  $\mu\text{Ci/ml}$  que se añadirá inmediatamente a cada pocillo. Las placas se incubarán durante otras 24 h. Tras la finalización del cultivo, el medio se recogerá en tubos tapados de 5 ml y se almacenará a -20 °C durante el análisis de  $^3\text{H}$ -HA. Las células se liberarán por tripsinización y se centrifugarán con el lavado. El HA marcado radiactivamente movilizado por tripsina y el lavado se analizará en cuanto al medio y las células después se usarán para la extracción de RNA y la evaluación de la expresión génica como se describe a continuación.

*Aislamiento y cuantificación de  $^3\text{H}$ -hialuronano ( $^3\text{H}$ -HA) en cultivos usando cromatografía de filtración en gel*

Se etiquetarán como A y B dos alícuotas de 0,5 ml de cada muestra de medio. Se añadirán 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético 1 M, pH 6,0 a todas las alícuotas. Se añadirán 50  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (acetato de Na 20 mM y NaCl 0,15 M, pH 6,0) a la alícuota A y se añadirán 50  $\mu\text{l}$  de hialuronidasa de *Streptomyces* 5 TRU (HIALASA) en tampón de reacción a la alícuota B. Todas las muestras se incubarán a 60 °C durante 3 h, seguido de la ebullición durante 5 min para inactivar la hialuronidasa añadida. Las muestras se almacenarán a -20 °C antes de la filtración en gel.

Se usarán columnas de filtración en gel rellenas previamente con ya se Superosa 6 o Superdex-S200 para aislar e identificar el  $^3\text{H}$ -HA en el medio de cultivo. Las muestras de medio se centrifugarán rutinariamente a alta velocidad en una microcentrífuga de laboratorio durante 10 minutos inmediatamente antes de cargarlas a la columna. Las muestras (200  $\mu\text{l}$  de cada una) se inyectarán en la columna a través del bucle de muestra y la columna se eluirá con tampón PBS (NaCl 0,15 M,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,05 M, pH 7,2) a un caudal de 0,2 ml/min. El eluyente de la columna se recogerá en 0,5 ml/fracción para un total de 46 fracciones y la radiactividad se determinará usando un contador de  $\beta$ -centelleo.

Este experimento mostrará una estimulación dependiente de la concentración de la síntesis de HA con efectos óptimos a lo largo del intervalo de 1-5 microgramos/ml de PPS solo y rhNC4 de 5-25 microgramos/ml. En

combinación, 2 microgramos/ml con 5-25 microgramos/ml de rhNC4 mostrarán sinergia.

*Efectos de la concentración de rhNC4 (lote PBA-1202p) solo y en combinación con polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la biosíntesis de hialuronano (HA) por las células progenitoras usando un ELISA*

5 Se sembrarán células progenitoras murinas (estirpes de células C3H10T1/2 o ATDC5) adquiridas de RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) o células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) a  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y se mantendrán en 1 ml de DMEM/medio F-12 de Ham (Invitrogen) complementado con FBS al 10 % (Sigma) y se incubarán a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %/aire húmedo al 95 % hasta que las células alcancen el 80 % de confluencia. Después, el medio se reemplazará con DMEM/F-12 de Ham que contiene diversas concentraciones de las preparaciones de rhNC4 solas y en combinación con polisulfato de pentosano (Bene-Arzneimittel, Munich, Alemania) y los cultivos se mantendrán a 37 °C, en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas adicionales. El medio de cada pocillo se separará de las células y se transferirá a un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml. Las células en monocapa que permanezcan en los pocillos se separarán mediante tripsinización y después se separarán del sobrenadante por centrifugación a 350 g durante 5 min. El sobrenadante se recogerá y se combinará con el medio. La mezcla de medio y sobrenadante combinados (200 µl) se someterá a ensayo para determinar el contenido de hialuronano usando el HA-ELISA como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante de la tripsinización de las células se hervirá para desnaturalizar e inactivar la enzima y también se someterá a ensayo el contenido de HA usando el ELISA. El HA de estas fracciones se considera que representa el contenido de HA de la matriz extracelular (MEC).

Los resultados de este experimento confirmarán los resultados que se encuentran en la figura 27. El ELISA demostrará la producción de HA por las células progenitoras en presencia de dosis bajas (incluyendo 1-5 microgramos/ml) de polisulfato de pentosano.

25 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la diferenciación de las células progenitoras humanas en un medio osteogénico usando ensayos de mineralización in vitro.*

30 Las condiciones necesarias para la inducción de las células progenitoras humanas para que desarrollen una matriz ósea mineralizada *in vitro* se han descrito anteriormente (Gronthos S, AC Zannettino, SJ Hay, S Shi, SE Graves, A Kortessidis y PJ Simmons. (2003). *Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci* 116:1827-1835). El medio osteoinductor consiste en medio MEM-alfa complementado con FCS al 2 % (v/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, fosfato sódico de dexametasona 10<sup>-7</sup>, penicilina 50 UI/ml, estreptomycin 50 µg/ml, piruvato de sodio 1 mM, 2-fosfato del ácido L-ascórbico 100 µM, L-glutamina 2 mM y tampón HEPES 10 mM.

35 Se sembraron células progenitoras humanas en placas de 96 pocillos a  $8 \times 10^3$  células por pocillo y se dejaron alcanzar el > 90 % de confluencia antes de la adición de medio osteoinductor que contenía concentraciones nominadas de PPS (0,0, 1,0, 5,0, 10 microgramos/ml). Las células se cultivaron a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % durante el periodo indicado. El medio de cultivo osteoinductor que contenía el compuesto recién preparado se cambió dos veces por semana durante un periodo de 4 semanas.

Los resultados de estos experimentos pueden observarse en la figura 7A. Esto demuestra que la presencia de PPS suprime la diferenciación en osteocitos, en particular a 1 y 10 microgramos de PPS/ml.

45 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la diferenciación de las células progenitoras humanas en un medio osteogénico – Análisis del contenido mineral in vitro*

50 Se evaluó el contenido de mineral total por pocillo en los cultivos anteriores mediante la medición de los niveles de calcio por ADN total en cada pocillo. Los cultivos de células se lavaron tres veces con PBS sin Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup> y se dejaron que se solubilizaran durante la noche en ácido clorhídrico 0,6 M (100 µl por pocillo). El mineral solubilizado en ácido 23 se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos y se hizo reaccionar con o-cresol-ftaleína-complexona (Thermal Electron Corporation, EE.UU.) para formar un colorante de color púrpura que se midió a 570 nm usando un lector de microplacas EL 808 Ultra. La intensidad del colorante púrpura es directamente proporcional a la concentración de calcio en cada pocillo. La concentración de calcio absoluta se extrapoló a partir de una curva patrón de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Después de esto, los cultivos solubilizados en ácido se aclararon tres veces con PBS sin Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup> y se incubaron en 100 µl de una solución de proteinasa K 100 µg/ml a 37 °C durante 2 horas. Las muestras digeridas se pipetearon vigorosamente y se transfirieron 50 µl de cada pocillo a un pocillo de una placa de ensayo no fluorescente, que contenía 150 µl de Hoechst 33258 diluido (2 µg/ml) en tampón de ensayo de ADN (NaCl 2 M y fosfato de sodio 50 mM). La absorbancia absoluta se determinó midiendo frente a una serie de patrones de ADN a 350 nm mediante un Espectrómetro de Luminiscencia LS55 (Perkin Elmer).

65 Los resultados de estos experimentos pueden observarse en la figura 7B. El hecho de que los cultivos de PPS parezcan todos iguales al medio indicaba que no había depósitos calcificadas presentes.

Normalmente, los depósitos mineralizados se tiñeron positivamente con el reactivo rojo de alizarina y se formaron a las 4 semanas del cultivo de las células progenitoras en condiciones osteoinductoras.

5 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la diferenciación de las células progenitoras humanas en un medio adipogénico usando ensayos adipogénicos in vitro*

Las condiciones requeridas para el desarrollo de lípidos a partir de células del estroma de médula ósea humana *in vitro* se han descrito anteriormente (Gimble J. *Marrow stromal adipocytes*. En: *Marrow stromal cell culture*. JN Beresford, Owen, M.E., ed. Cambridge University Press, Cambridge, págs.. 67-87 (1998)). En resumen, se sembraron células progenitoras humanas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $8 \times 10^3$  células por pocillo en medio completo de crecimiento MEM-alfa y se les permitió alcanzar el > 90 % de confluencia antes de la adición de medio inductor. Las células se cultivaron en medio adipogénico-inductor compuesto de MEM-alfa completo complementado con 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) 0,5 mM, indometacina 60 microM e hidrocortisona 0,5 microM en presencia de una titulación de PPS (0,0, 1,0, 5,0, 10 microgramos/ml). El medio inductor se cambió dos veces por semana durante un periodo de 4 semanas. Las células se tiñeron para determinar la presencia de lípidos usando Rojo de Aceite 'O'.

*Tinción de lípidos con Rojo de Aceite 'O'*

20 Se cultivaron células como se ha descrito anteriormente y se aclararon suavemente en 1 X PBS (pH 7,4) para evitar la degradación de la monocapa celular. Las células se fijaron en formol tamponado con fosfato durante 15 minutos a TA. El fijador se retiró posteriormente y el lípido se tiñó mediante la adición de 100 microlitros de Rojo de Aceite O recién filtrado (3 mg/ml; MP Biomedicals, Australia) durante  $\geq 2$  horas a TA. Las células se lavaron 3 veces con agua obtenida por OI y se contra tiñeron con hematoxilina de Mayer (modificación de Lillie). Las manchas de hematoxilina se aspiraron y sustituyeron por agua y los adipocitos positivos para Rojo de Aceite O se examinaron bajo un microscopio óptico y se fotografiaron con la cámara Olympus DP20-56 (Olympus, Japón).

Estos resultados se muestran en las figuras 8A y B. Puede observarse que el PPS regula la diferenciación de las células progenitoras en adipocitos observándose regulación positiva en todas las concentraciones.

30 *Efectos del polisulfato de pentosano de sodio (PPS) sobre la biosíntesis de proteoglicanos (medida como  $^{35}\text{S}$ -GAG) por las células progenitoras cultivadas en las esponjas de colágeno.*

Se inyectarán células progenitoras Stro-1<sup>+</sup> inmunoseleccionadas humanas (Mesoblast Ltd, Melbourne, Australia) preparadas en forma de una suspensión que contiene un promedio de 100.000 células en 100 microlitros de DMEM alta glucosa/medio F-12 de Ham 1:1 (Invitrogen) complementado con FBS al 10 % (Sigma) usando una micropipeta en el centro de bloques de esponjas de colágeno preparadas colocadas en los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos. Las esponjas de colágeno serán estériles Gelfoams (Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI) precortadas de antemano en cubos de 0,5 cm<sup>3</sup>. A cada pocillo se le añadirán 2 ml de medio + FBS y las placas se incubarán a 37 °C, en CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 % durante 48 horas. Después, el medio se reemplazará por DMEM de alta glucosa/medio F-12 de Ham 1:1 (Invitrogen) complementado con FBS al 10 % (Sigma) que contiene diversas concentraciones de PPS (0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0 µg/ml) durante 48 horas adicionales. Todas las concentraciones de PPS se cultivarán por triplicado. El medio se cambiará después por un medio definido, que contiene las concentraciones indicadas de PPS y 5 µCi/ml de  $^{35}\text{SH}_2\text{SO}_4$  (Perkin Elmer, EE.UU.). Los experimentos se darán por terminados después de 48 horas de incubación cuando se determinará la biosíntesis de PG mediante la medición de la incorporación de  $^{35}\text{SO}_4$  en el PG como ( $^{35}\text{S}$ -GAG) liberado en el medio y después de digestión con colagenasa de las esponjas como se ha descrito anteriormente.

Este experimento demostrará que la formación de cartílago dentro de la esponja se potencia en presencia de polisulfato de pentosano a concentraciones similares a las mostradas *in vitro* y descritas en el presente documento. El experimento confirmará que las dosis de 0,5-1,0 millones de células precursoras son números celulares adecuadas y que las concentraciones de 1-10 microgramos/ml de polisulfato de pentosano proporcionan un efecto beneficioso.

55 *Evaluación de la formación de cartílago de novo en un modelo animal de regeneración del disco y reparación de cartílago usando una formulación de células progenitoras y de polisulfato de pentosano (PPS).*

*Protocolo Animal*

60 Se realizarán dos cirugías espinales de dos niveles en los niveles cervicales C3/4 y espinal C4/5 de 12 ovejas adultas Merino/Leicester que se dividirán aleatoriamente en 2 grupos de 6. El procedimiento requerirá que los discos intervertebrales se retiren quirúrgicamente de estos niveles y que se implante un armazón biodegradable relleno de una esponja de colágeno que contiene las células progenitoras implantadas entre los cuerpos vertebrales previamente ocupadas por los discos. Aparte de las diferentes células inyectadas en las esponjas la única otra variable en el diseño del estudio será si las placas terminales de cartílago (PTC) se perforan mecánicamente antes de la inserción del implante. La duración del estudio será de 12 semanas desde el momento de la implantación hasta



el sacrificio.

Grupo A (N = 6)

5 Se cortarán a medida esponjas de gelatina estériles Gelfoam (Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI, EE.UU.) usando un molde preformado y después se inyectarán 100 microlitros de solución de Profreeze® usando una micro-pipeta. La esponja cargada después se insertará en la jaula biodegradable especialmente modificada que se fijará dentro de los espacios de los discos cervicales quirúrgicamente extirpados en los niveles indicados. Las jaulas se asegurarán en su lugar por medio de una placa vertebral comercial.

10

Grupo B (N = 6)

15 Se cortarán a medida esponjas de gelatina estériles Gelfoam usando un molde preformado y se cargarán con 100 microlitros de solución de Profreeze® que contiene células progenitoras (1 millón de células progenitoras ovinas) + 10 microgramos de PPS. La esponja cargada después se insertará en una jaula biodegradable que se fijará dentro de los espacios de los discos cervicales quirúrgicamente extirpados en los niveles indicados. Las jaulas se asegurarán en su lugar por medio de una placa vertebral comercial.

20 *Evaluación de los resultados experimentales*

se tomaron radiografías laterales de todas las columnas cervicales con anestesia de inducción en los siguientes puntos temporales: momento basal, Operación, 1, 2 y 3 meses después de la implantación de los artículos de ensayo y puntuación de la formación ósea usando el sistema de puntuación que se muestra en la Tabla 3.

25

Tabla 3

Puntuación	Descripción
0	ninguna fusión ósea
1	máximo hueco intervertebral en la dirección cráneo-caudal de más de 5 mm
2	máximo hueco intervertebral en la dirección cráneo-caudal de menos de 5 mm
3	fusión ósea completa. El máximo hueco intervertebral en la dirección cráneo-caudal se medirá directamente en las radiografías laterales usando una regla

Los animales también se controlarán durante todo el estudio de acuerdo con las directrices de ética animal para el cuidado de ovejas preparadas crónicamente usando el programa que se muestran en la Tabla 4.

30

Tabla 4: Observación de los animales después de la cirugía

Observación	Frecuencia/Día	Duración
Peso	x1	Entrada al estudio
Comportamiento, Postura y Actividad	x1	Duración del estudio
Dolor y malestar	x1	Duración del estudio
Observación del área de procedimiento para la determinar la irritación/infección local	x1	Mínimo de 3 días después de la cirugía
Reducción de la actividad/incapacidad para moverse	x1	Duración del estudio
Evaluación del consume diario de comida/agua	x1	Duración del estudio

*Análisis histológico*

35 Tras el sacrificio se diseccionarán las columnas vertebrales cervicales intactas de los animales y se cortarán los segmentos de movimiento C3/4 y C4/5 del resto de la columna vertebral usando una sierra de banda. Estos dos segmentos después se cortarán en el plano sagital en 2 secciones y se almacenarán en formol tamponada normal al 10 %. Estas secciones contendrán la jaula con 3 mm de los cuerpos vertebrales superior e inferior a cada lado. Después, se descalcificarán usando ácido fórmico y después se deshidratarán en concentraciones crecientes de etanol con agitación. Después del aclaramiento en xileno, los tejidos se incluirán en parafina, se cortarán y se teñirán con H & E, Azul de Alcian, Azul de Toluidina, tricrómico de Massons. Las secciones teñidas con azul de toluidina se usarán para el análisis histomorfométrico mediante el análisis de imagen cuantitativo para determinar la densidad óptica de distribución de proteoglicanos y las dimensiones de la matriz usando el software Image J® (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) en un ordenador personal.

45 Las secciones de parafina sin teñir también se usarán para el análisis inmunohistoquímico de componentes de la matriz. Se digerirán previamente con combinaciones de condroitinasa ABC (0,25 U/ml) en tampón de Tris-acetato 20 mM, pH 8,0 durante 1 hora a 37 °C, hialuronidasa testicular bovina 1000 U/ml durante 1 hora a 37 °C en tampón fosfato de pH 5,0, seguido de tres lavados en Tris-HCl 20 mM pH 7,2 NaCl 0,5 M (TBS) o proteinasa-K (DAKO

S3020) durante 6 min a temperatura ambiente para exponer los epítomos antigénicos. Los tejidos después se bloquearán durante 1 h en suero de cerdo normal al 20 % y se sondarán con una serie de anticuerpos primarios a proteoglicanos y colágenos grandes y pequeñas (Tabla 5). También se procesarán secciones de control negativo ya sea omitiendo el anticuerpo primario o sustituyendo un anticuerpo primario emparejado con un isotipo irrelevante para determinar el anticuerpo primario de interés auténtico. Se usarán para esta etapa anticuerpos de control IgG (DAKO Código X931) o IgM (DAKO Código X942) de ratón emparejado con un isotipo (DAKO) comerciales (según sea apropiado). Los productos DAKO X931 y X942 serán anticuerpos IgG<sub>1</sub> de ratón monoclonal (clon DAK-GO 1) e IgM monoclonal (clon DAK-GO8) dirigidos contra glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que no está presente ni es inducible en tejidos de mamíferos. Se usará peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpos secundarios para la detección usando diclorhidrato de 3,3'-diaminobencideno al 0,05 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03 % en TBS, Nova RED, nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/yodonitrotetrazolio violeta (NBT/BCIP/INT) o Nueva fucsina como sustratos. Los portaobjetos teñidos se examinarán por microscopía de campo brillante y se fotografiarán usando un sistema de cámara digital fotomicroscopio Leica MPS 60.

15 Tabla 5. Anticuerpos primarios frente a epítomos de proteína de núcleo de proteoglicano y colágeno

Epítomo de anticuerpo primario	Clon (isotipo)	Referencias
<b>Proteoglicanos grandes</b>		
Agrecano	AD 11-2A9 (IgG)	a
Versicano	12C5 (IgG)	b
<b>Colágeno</b>		
Tipo I	I8H5 (IgG <sub>1</sub> )	b, c
Tipo II	II-4CII (IgG <sub>1</sub> )	b, c
Tipo IV	CIV-22 (IgG <sub>1</sub> )	b, c
Tipo VI	Policlonal de conejo	B, c
Tipo IX	Monoclonales de ratón D1-9 (IgG <sub>1</sub> ), B3-1 (IgG <sub>2b</sub> )	d

(a) Melrose, J., Little, C.B. y Ghosh, P. *Detection of aggregatable proteoglycan populations by affinity blotting using biotinylated hyaluronan*. *Anal Biochem* 256, 149-157 (1998). Melrose, J., Smith, S. y Ghosh, P. *Differential expression of proteoglycan epitopes by ovine intervertebral disc cells*. *J Anat* 197 (Pt 2), 189-198 (2000).

(b) Melrose, J., Smith, S., Ghosh, P. y Taylor, T.K. *Differential expression of proteoglycan epitopes and growth characteristics of intervertebral disc cells grown in alginate bead culture*. *Cells Tissues Organs* 168, 137-146 (2001). (c) Shen, B., Melrose, J., Ghosh, P. y Taylor, F. *Induction of matrix metalloproteinase-2 and -3 activity in ovine nucleus pulposus cells grown in three-dimensional agarose gel culture by interleukin-1beta: a potential pathway of disc degeneration*. *Eur Spine J* 12, 66-75 (2003).

(d) Ye, X.J., Terato, K., Nakatani, H., Cremer, M.A. y Yoo, T.J. *Monoclonal antibodies against bovine type IX collagen (LMW fragment): production, characterization, and use for immunohistochemical localization studies*. *J Histochem Cytochem* 39, 265-271 (1991).

#### Estadísticas

20 El ensayo de *t* de Student se usará para comparaciones por pares como se indica. La significación estadística se proporcionará con *P* menor que 0,05. Se usará un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para comparaciones múltiples como se indica. La significación estadística entre los grupos se determinará usando el ensayo de la diferencia de significación menor proyectada de Fisher con *P* menor que 0,05.

25 Este experimento demostrará que, con respecto al control, el uso de polisulfato de pentosano y células progenitoras dará como resultado una mayor (más abundante) producción de cartílago en el espacio del disco.

30 Además, en los espacios de los discos extirpados con placas terminales cartilaginosas perforadas que tenían una superficie de contacto con las esponjas de colágeno que contenían células progenitoras además de PPS, se observará una infiltración potenciada de células progenitoras transmitidas por la sangre endógenos acompañada de una curación más completa de los defectos del cartílago producidos mecánicamente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende células progenitoras seleccionadas entre células condroprogenitoras y células progenitoras mesenquimatosas junto con un polisulfato de pentosano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un medio de crioconservación.
2. La composición de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un medio de vehículo, tal como un medio de cultivo y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la célula progenitora es una célula condroprogenitora.
- 15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la célula progenitora es una célula Stro-1<sup>bn</sup> y/o una célula de progenie Stro-1<sup>bn</sup>.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el polisulfato de pentosano es la sal de sodio de polisulfato de pentosano (NaPPS), la sal de magnesio de polisulfato de pentosano (MgPPS) y/o la sal de calcio de polisulfato de pentosano (CaPPS).
- 20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la composición comprende aproximadamente  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  células progenitoras y 25-50 mg de polisulfato de pentosano; o  $1 \times 10^8$  células progenitoras y 25-50 mg/ml de polisulfato de pentosano.
- 25 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la composición comprende uno de:
- (i) de aproximadamente 1000 a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células;
- (ii) de aproximadamente 500.000 a aproximadamente  $2 \times 10^8$  células;
- (iii) de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $2 \times 10^8$  células;
- 30 (iv) de 500 ng/ml a 10 mg/ml de polisulfato de pentosano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (v) polisulfato de pentosano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una concentración de aproximadamente 500 ng/ml/millón de células-2000 µg/ml/millón de células; o
- (vi) polisulfato de pentosano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una concentración de aproximadamente 1 µg/ml/millón de células-2000 µg/ml/millón de células.
- 35 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la composición comprende adicionalmente uno o más de los siguientes componentes:
- sales orgánicas y/o inorgánicas;
  - tampones

40 - proteínas tales como BSA o transferrina;

  - factores de crecimiento y citocinas, incluyendo factor de crecimiento similar a insulina, insulina, factores de crecimiento similares a fibroblastos; súper familia BMP-TGF-beta tales como BMP-2, BMP-7, BMP-8 o TGF beta y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, IGF, FGF, EGF, PDGF, VEGF;
  - sueros animales incluyendo FBS, ternero recién nacido, todas las demás especies de mamíferos;

45 - agentes de crioconservación;

  - crioprotectores, incluyendo sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, trehalosa, sacarosa y otros azúcares o dimetilacetamida;
  - hidratos de carbono;
  - vitaminas/cofactores;

50 - hormonas

  - antibióticos
  - factores de fijación;
  - aminoácidos;
  - expansores del plasma como dextrano;

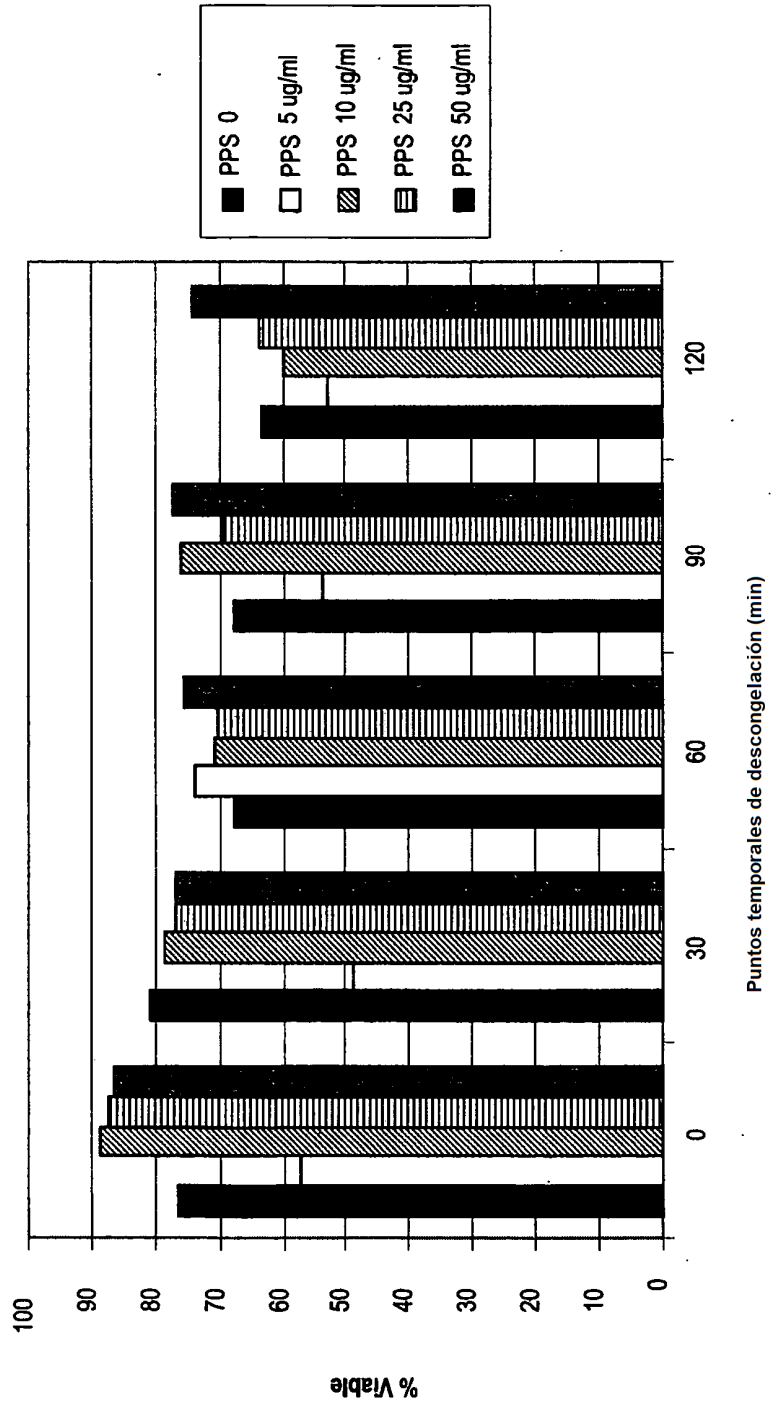
55 - plasma tanto humano como de otras especies de mamíferos;

  - sustituto del plasma;
  - hialuronano y/o ácido hialurónico, tanto natural como reticulado.
- 60 9. La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la composición comprende adicionalmente NC4 o un fragmento biológicamente activo del mismo que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

10. Un método *in vitro* de potenciación de la crioconservación de células progenitoras, que comprende exponer la composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior a un proceso de crioconservación.
- 5 11. Uso de un polisulfato de pentosano para potenciar la crioconservación de células progenitoras seleccionadas entre células condroprogenitoras y células progenitoras mesenquimatosas.
12. Un método *in vitro* de regulación de la proliferación de células progenitoras, que comprende exponer el polisulfato de pentosano o un fragmento molecular biológicamente activo del mismo a una célula progenitora seleccionada de entre una célula condroprogenitora y una célula progenitora mesenquimatosas.
- 10 13. Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para la regulación de la proliferación de células progenitoras seleccionadas de entre células condroprogenitoras y células progenitoras mesenquimatosas.
- 15 14. Un método *in vitro* de regulación de la diferenciación de células progenitoras mediante la exposición de un polisulfato de pentosano a una célula progenitora seleccionada de entre una célula condroprogenitora y una célula progenitora mesenquimatosas o una célula progenitora de médula ósea, que incluye la diferenciación en condrocitos, la diferenciación en osteoblastos o la diferenciación en adipocitos.
- 20 15. Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para la regulación de la diferenciación de células progenitoras seleccionadas entre células condroprogenitoras y células progenitoras mesenquimatosas, que incluye la diferenciación en condrocitos, la diferenciación en osteoblastos o la diferenciación en adipocitos.

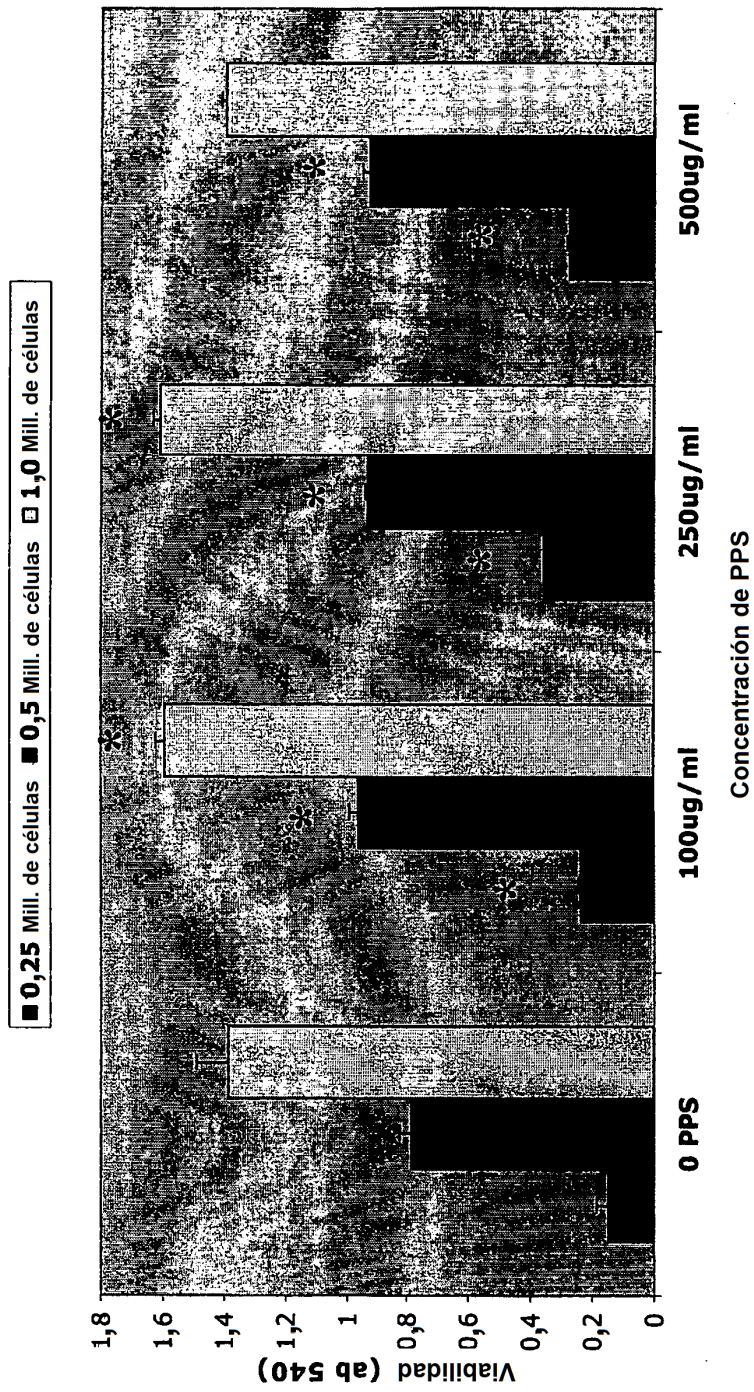
# Figura 1

Los efectos del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la viabilidad de células progenitoras humanas normales después de la congelación/descongelación usando el ensayo de exclusión con colorante azul de tripano  
 Los datos muestran el porcentaje de viabilidad de las células progenitoras M111 descongeladas - congeladas en presencia de PPS

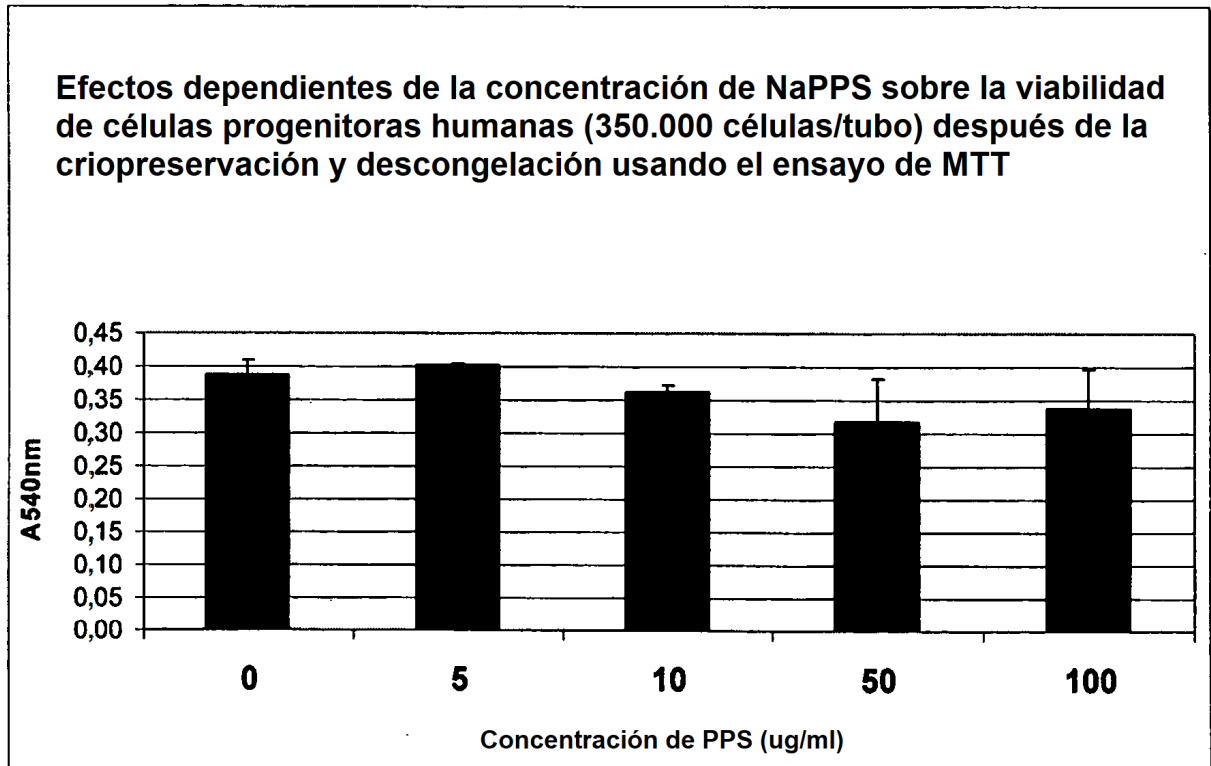
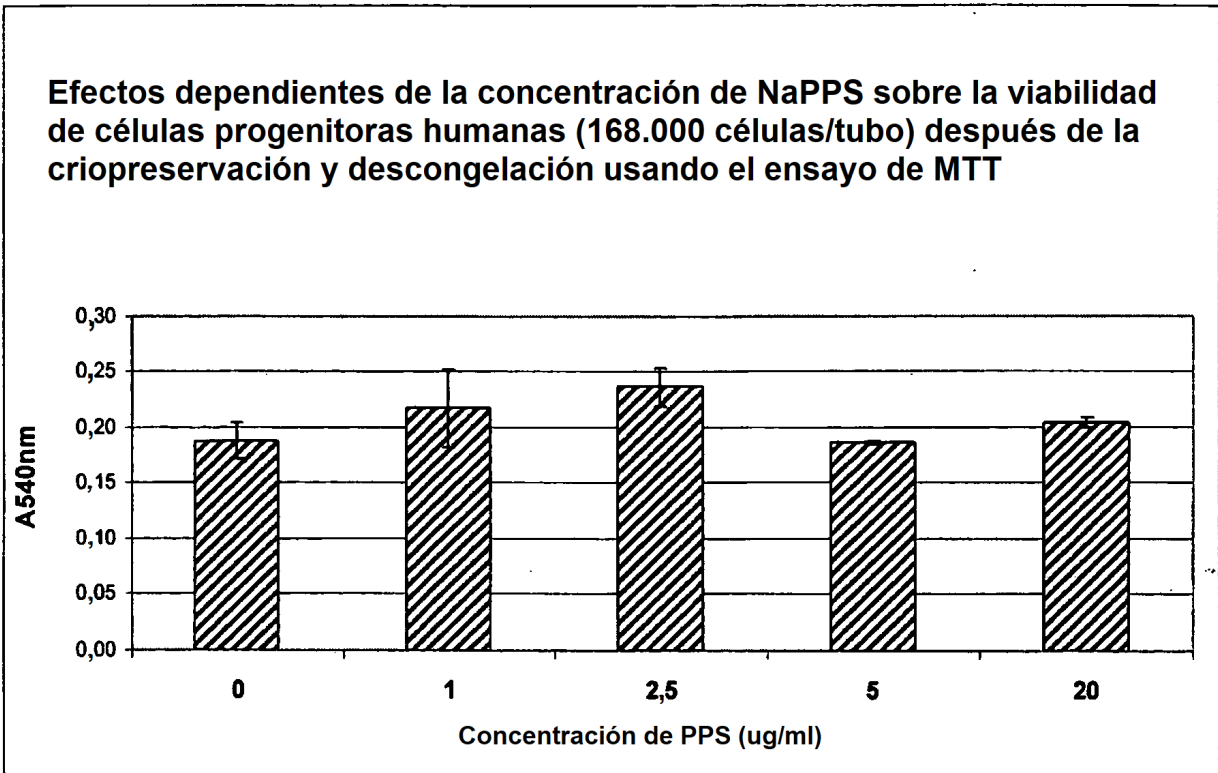


**Figura 2**

Viabilidad de células progenitoras ATDC5 después de la congelación (-180) y la descongelación en ausencia y en presencia de polisulfato de pentosano de sodio (PPS) como se determina mediante el ensayo de MMT después de 24 horas en cultivo



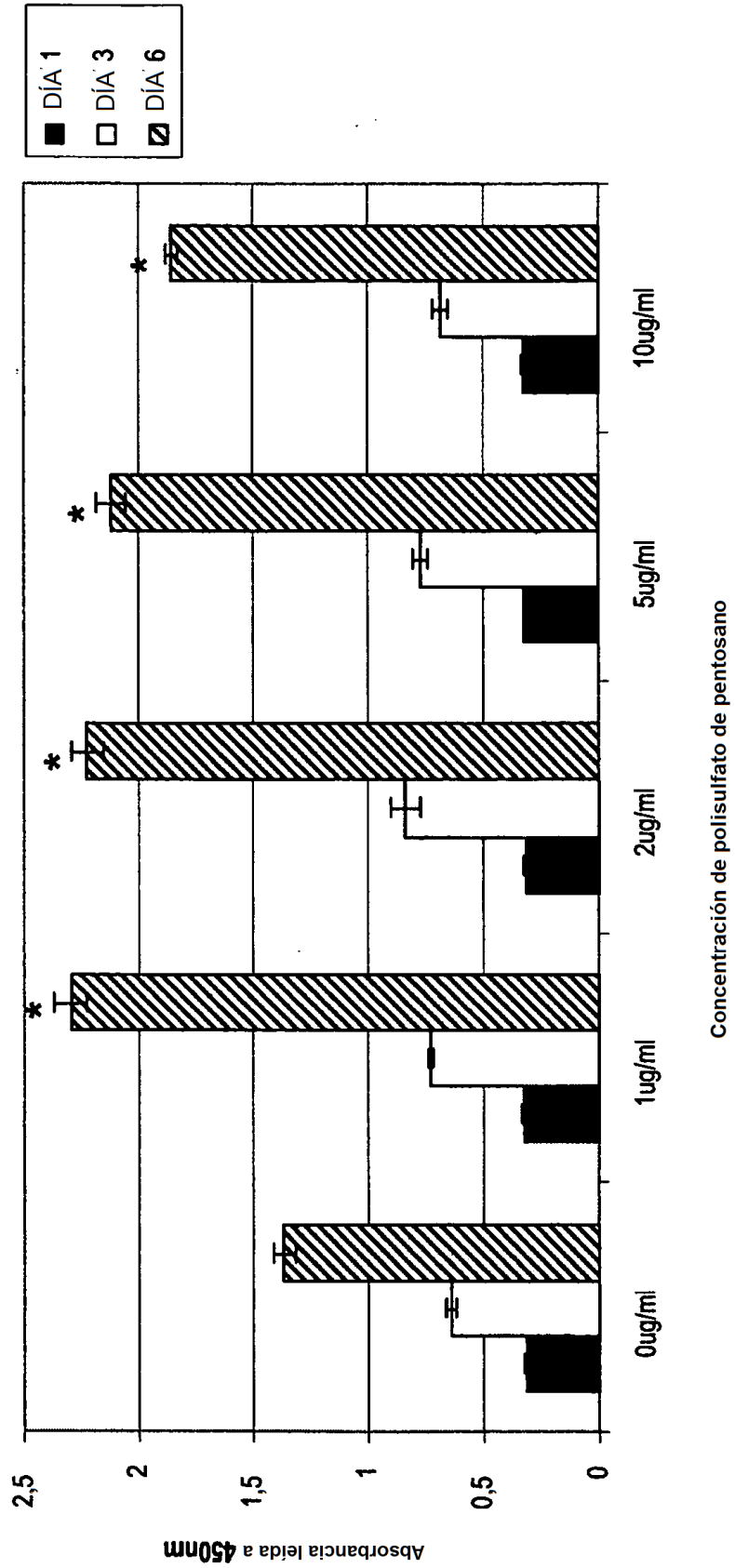
\* Mayor con respecto a células congeladas/descongeladas en ausencia de PPS (P<0,005)



**Figura 3**

# Figura 4

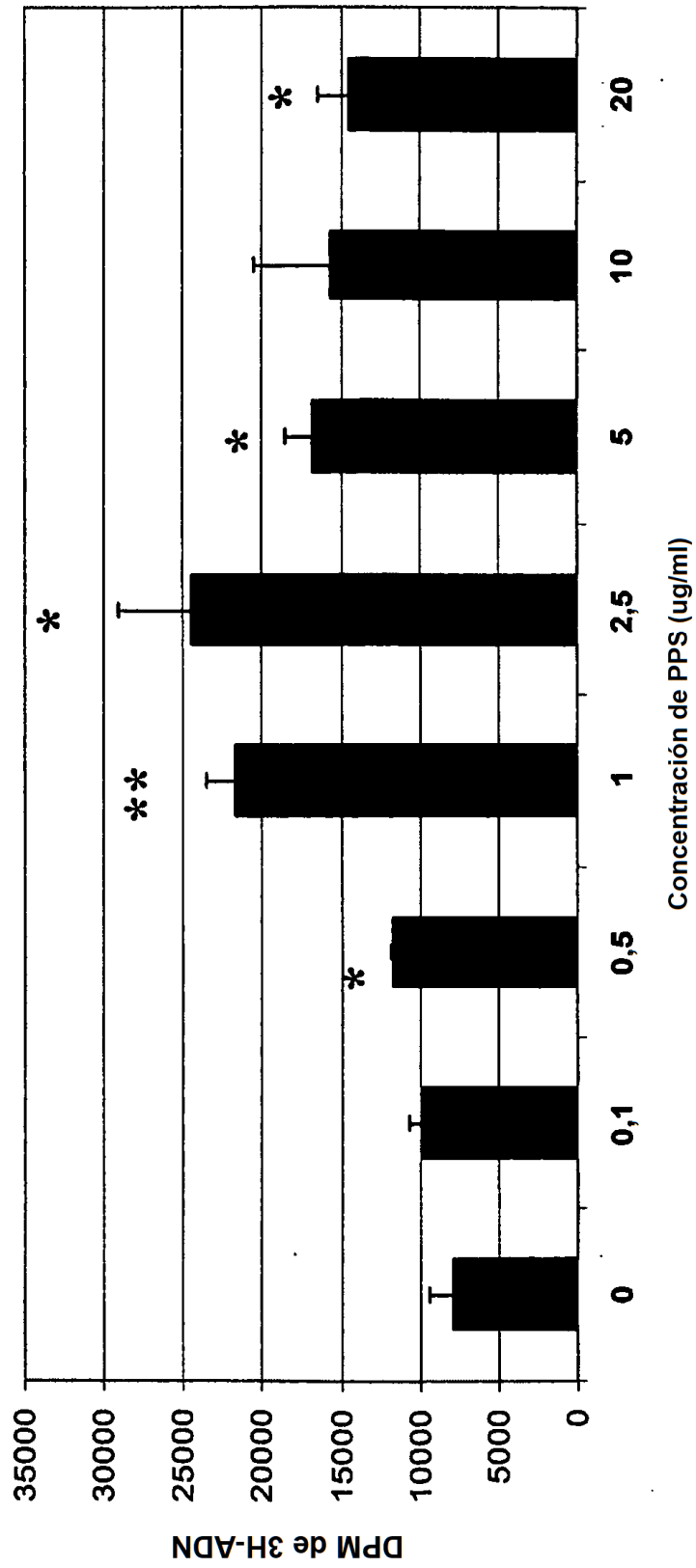
Los efectos del polisulfato de pentosano sobre la proliferación de células progenitoras humanas en cultivos en monocapa usando el ensayo de escisión por deshidrogenasa mitocondrial WST-1. Datos mostrados = medias  $\pm$  ETM para ensayos por cuadruplicado





**Figura 5**

Efectos de la concentración de polisulfato de pentosano (PPS) sobre la replicación de células progenitoras humanas en cultivos de micromasa de 4 días como se determina mediante la incorporación de 3H-timidina en el ADN



Los efectos del polisulfato de pentosano sobre la apoptosis de células progenitoras humanas inducida por la adición de una combinación de IL-4 30 ng/ml e IFN-gamma 30.000 U/ml. Después de un cultivo de 5 días se determinó la viabilidad de las células progenitoras mediante tinción con Anexina V y análisis por Citometría de Flujo

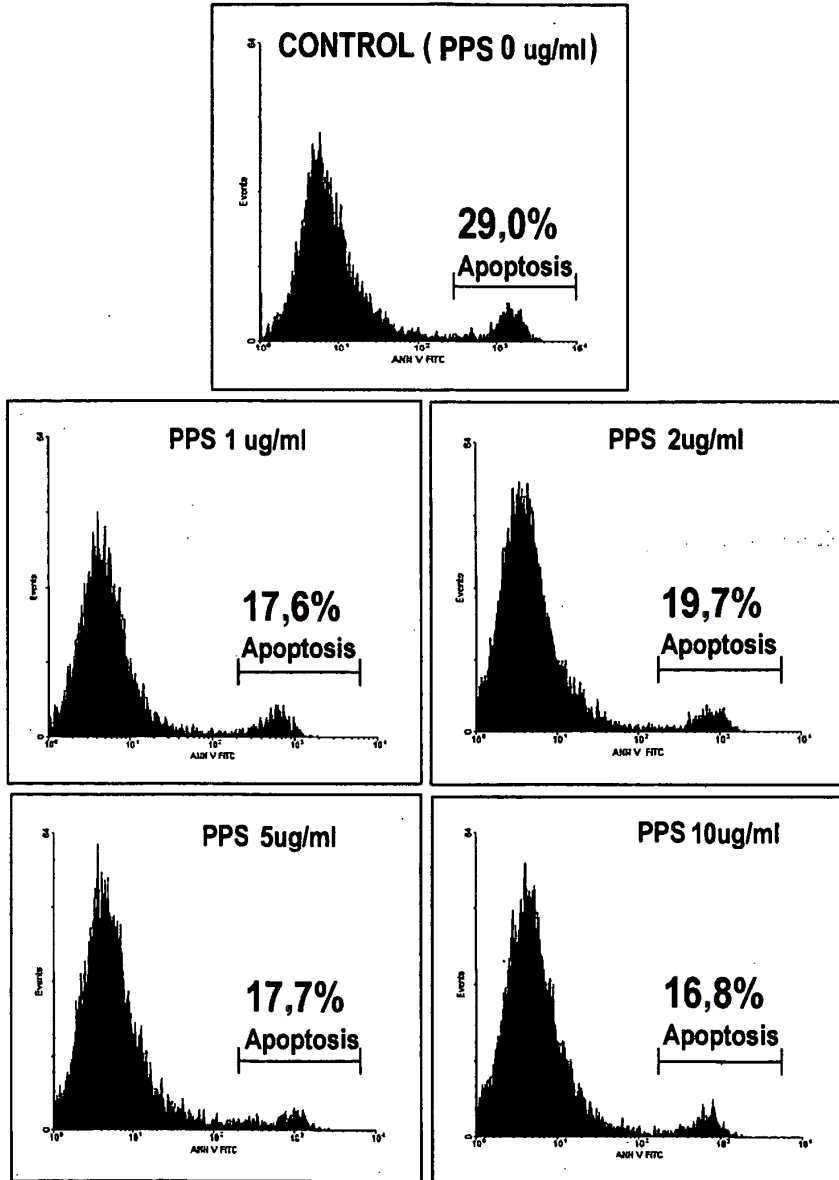
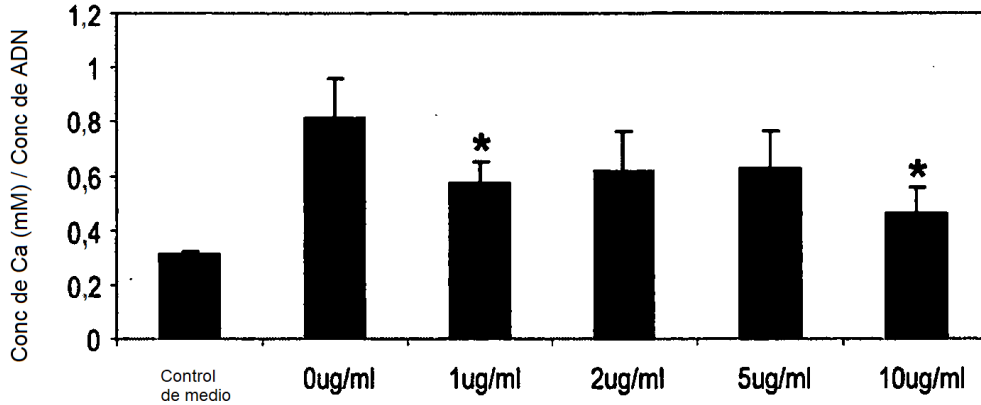


Figura 6

Los efectos del polisulfato de pentosano sobre la diferenciación de células progenitoras humanas (M111sP4) Diferenciación de hueso usando condiciones de cultivo en medio osteogénico y el ensayo de mineralización de cresolfaleína complejona. Datos = Medias  $\pm$  ETM

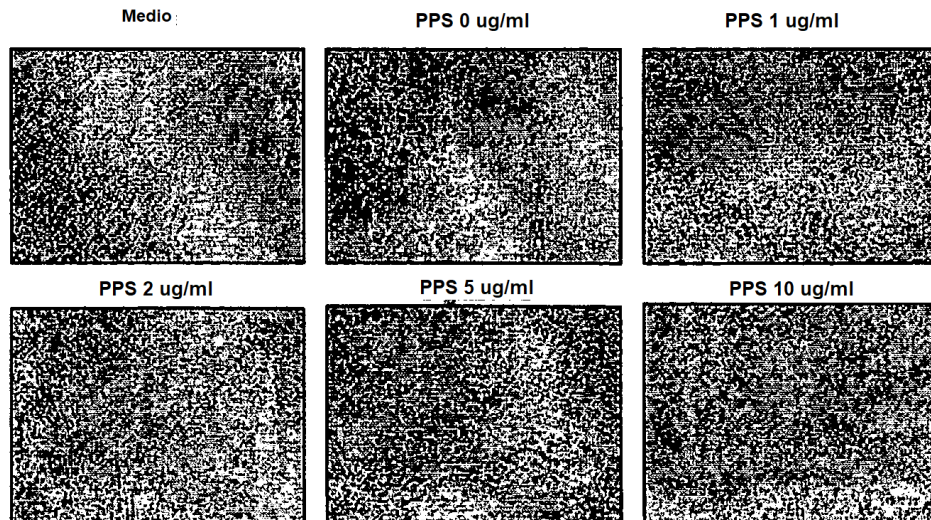
Producción mineral in vitro de M111s P4 +/- PPS (con respecto a la Conc de ADN)

**A**



**B**

Producción mineral in vitro de M111 P4 +/- PPS -  
Fotomicrografías de cultivos osteogénicos

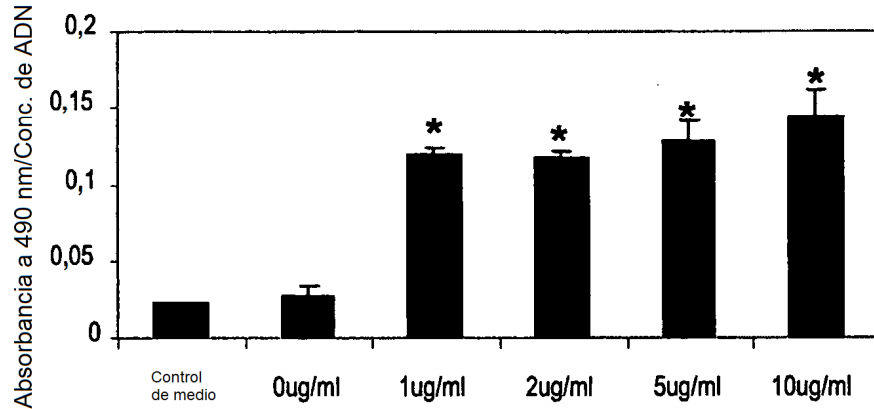


Aumento 20x

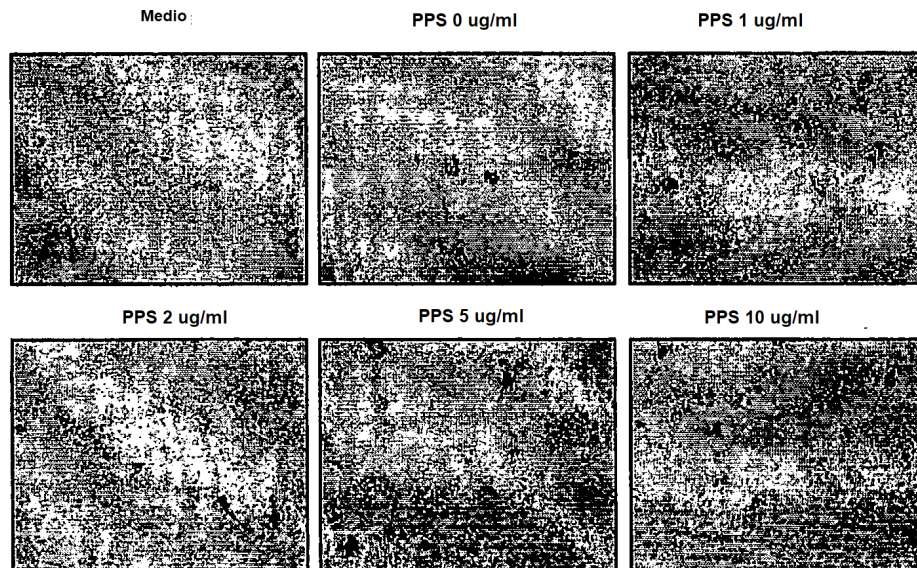
**Figura 7**

Los efectos del polisulfato de pentosano sobre la diferenciación de células progenitoras humanas (M111sP4) en adipocitos usando condiciones de medio de cultivo adipogénico y el ensayo de colorante Rojo de Aceite O. Datos = Medias  $\pm$  ETM

**A** Formación de adipocitos in vitro (tinción con Rojo de Aceite O) de células M111 P4 - Cultivadas con PPS – (Con respecto al ADN)

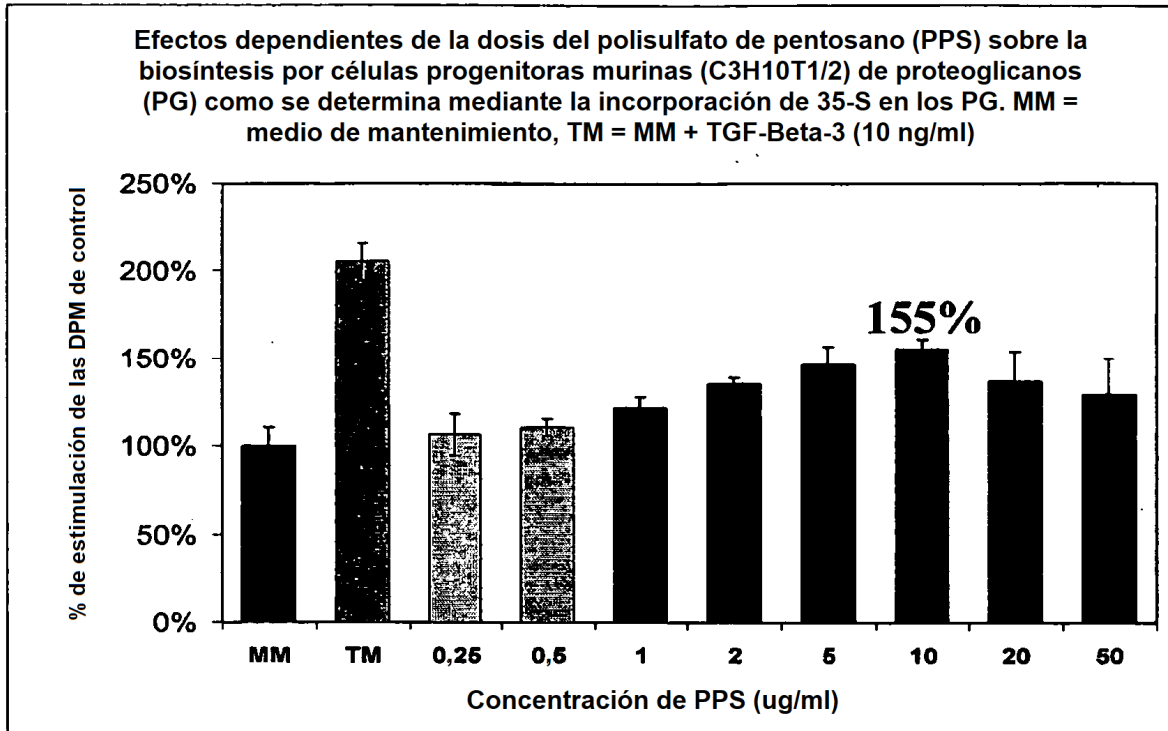


**B** Formación de adipocitos in vitro (tinción con Rojo de Aceite O) de células M111 P4 - Cultivadas con PPS – Fotomicrografías de cultivos de adipocitos

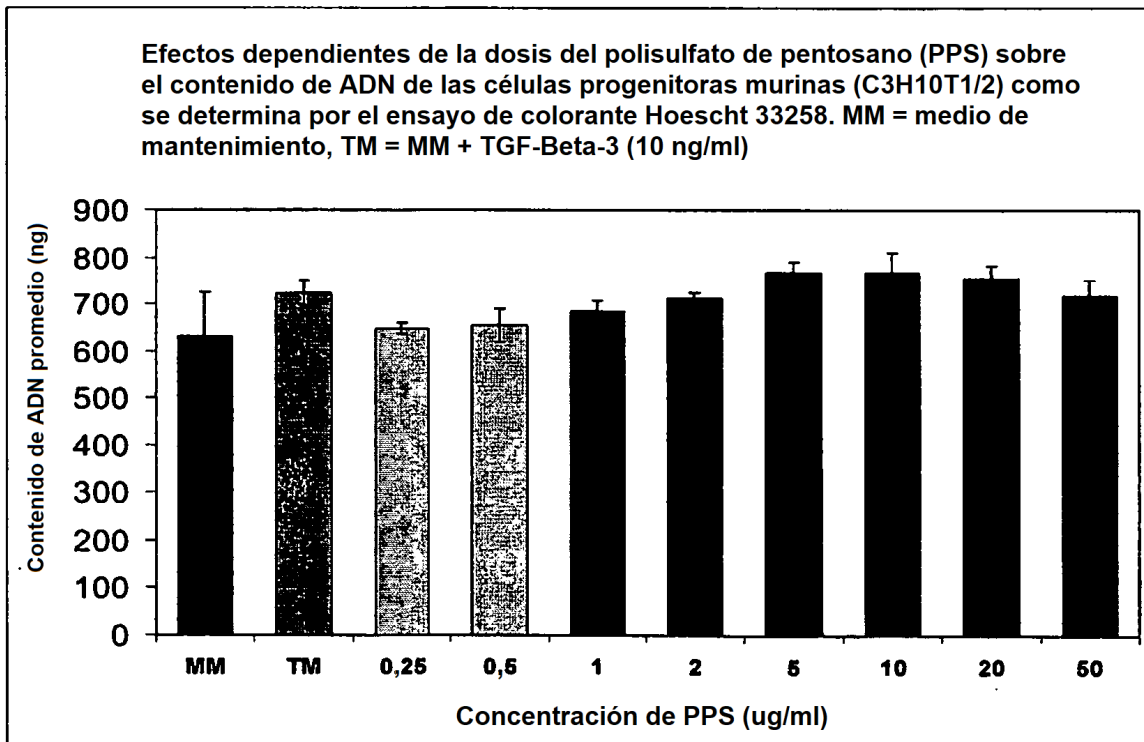


Aumento 20x

**Figura 8**



### SÍNTESIS DE PG

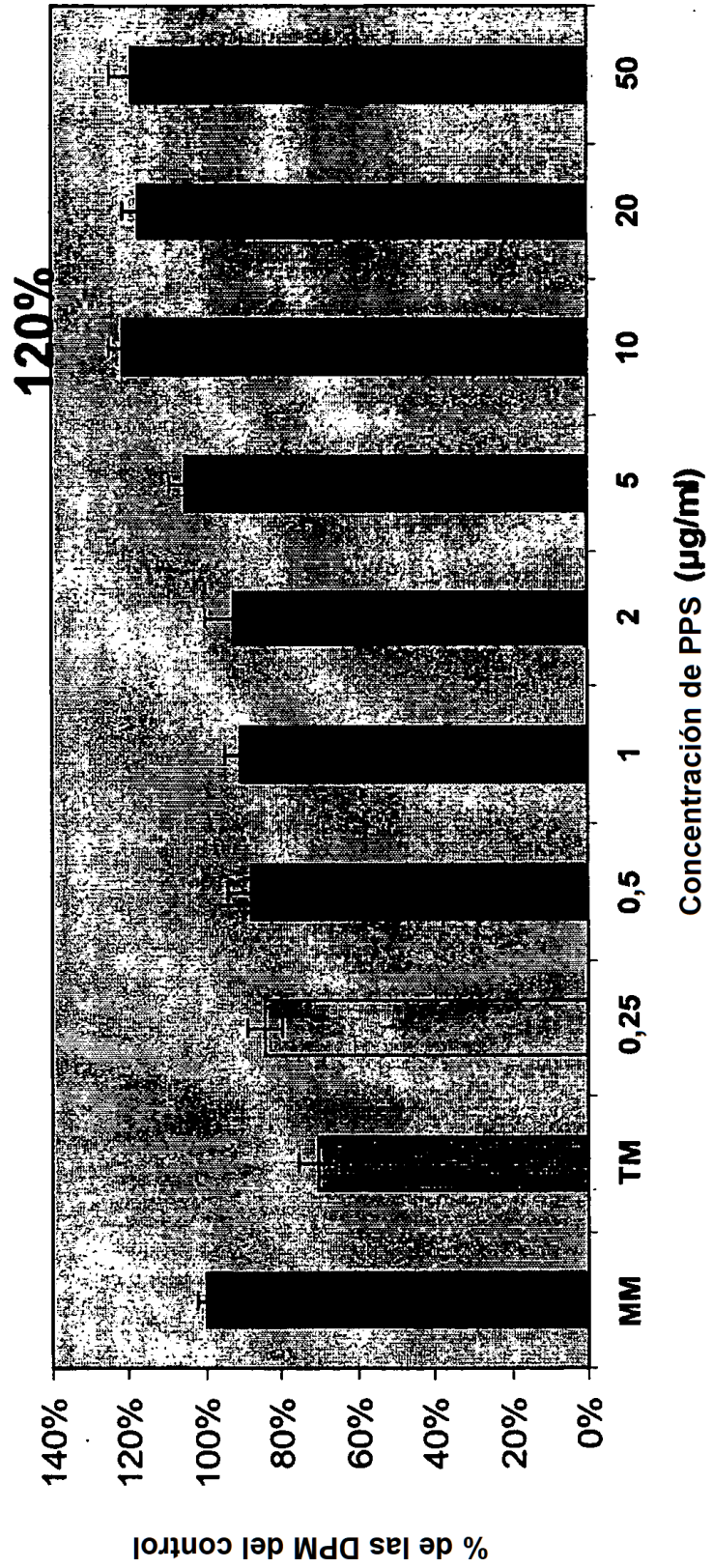


### CONTENIDO DE ADN (Números de células)

Figura 9

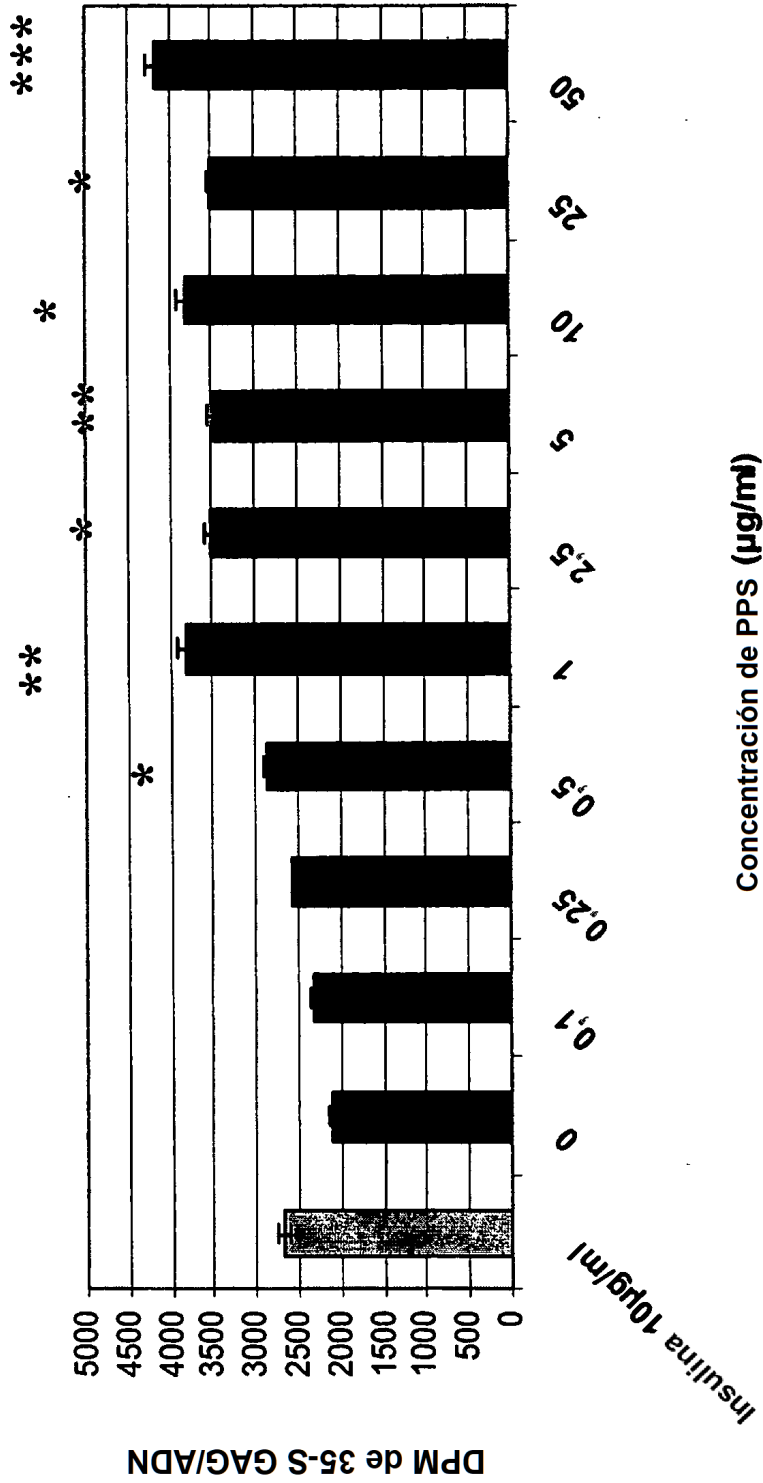
**Figura 10**

Efectos dependientes de la dosis del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la proliferación de las células progenitoras murinas (C3H10T1/2) como se determina por la incorporación de 3H-Timidina en el ADN. MM = medio de mantenimiento, TM = MM + TGF-Beta-3 (10 ng/ml)



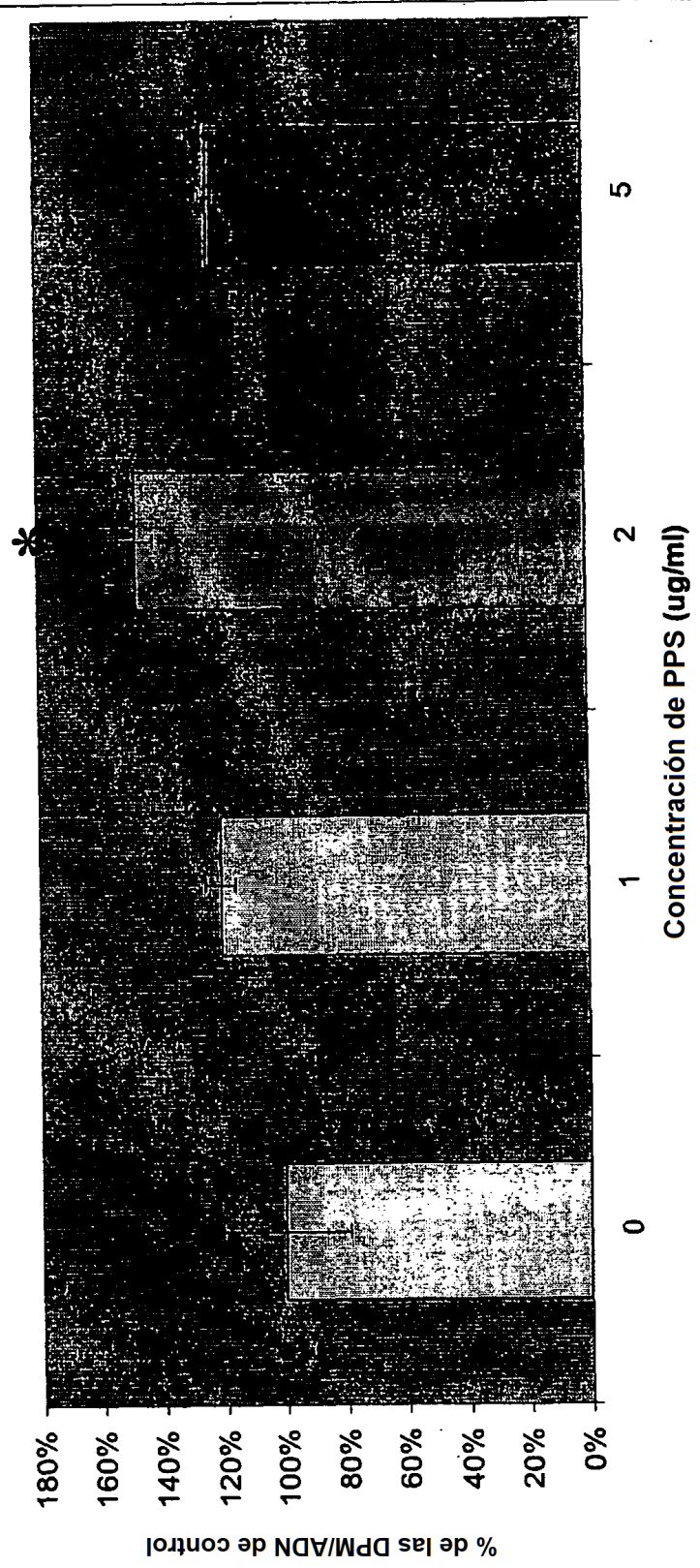
**Figura 11**

Efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano sobre la biosíntesis de 35S-GAG por las células progenitoras humanas en cultivos en monocapa durante 2 días



## Figura 12

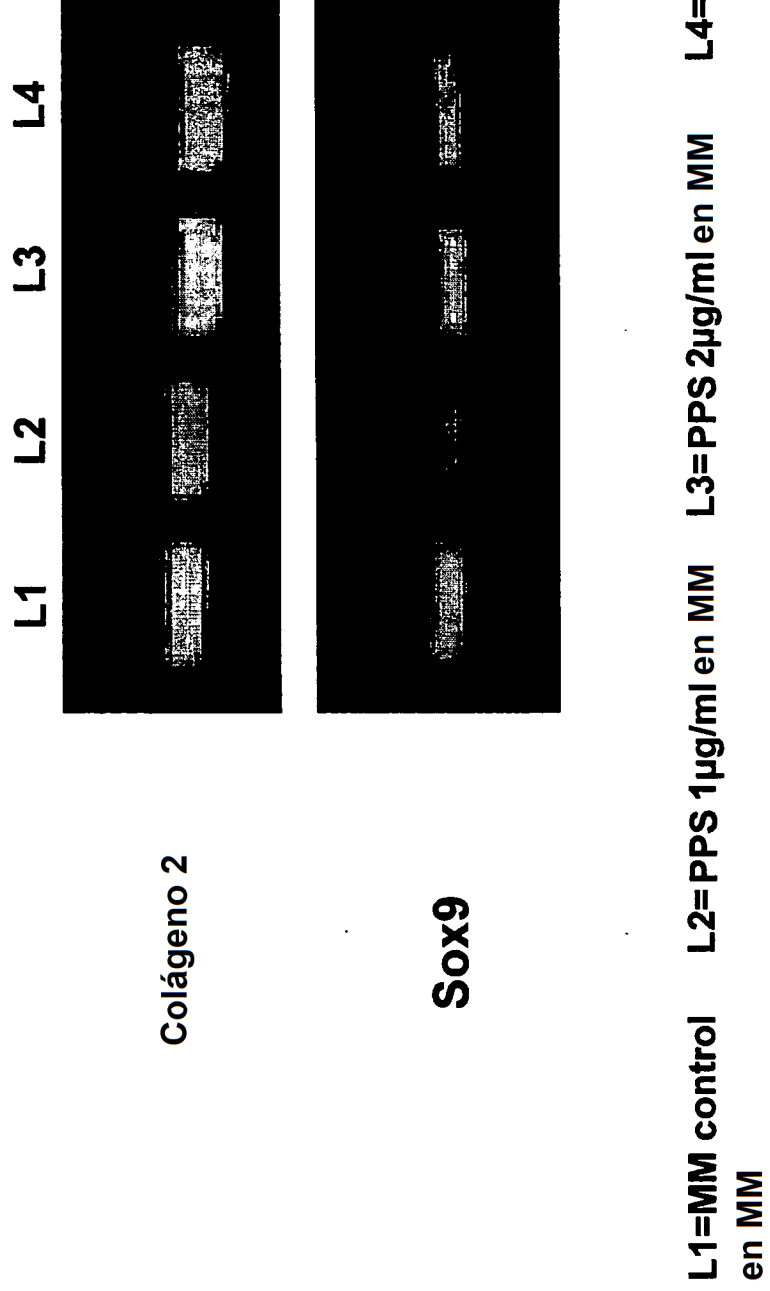
Efectos dependientes de la concentración del polisulfato de pentosano (PPS) sobre la biosíntesis por las células progenitoras murinas (ATDC5) de proteoglicanos (PG) en cultivo de sedimento + medio de mantenimiento como se determina mediante la incorporación de <sup>35</sup>S en PG/ug de ADN.





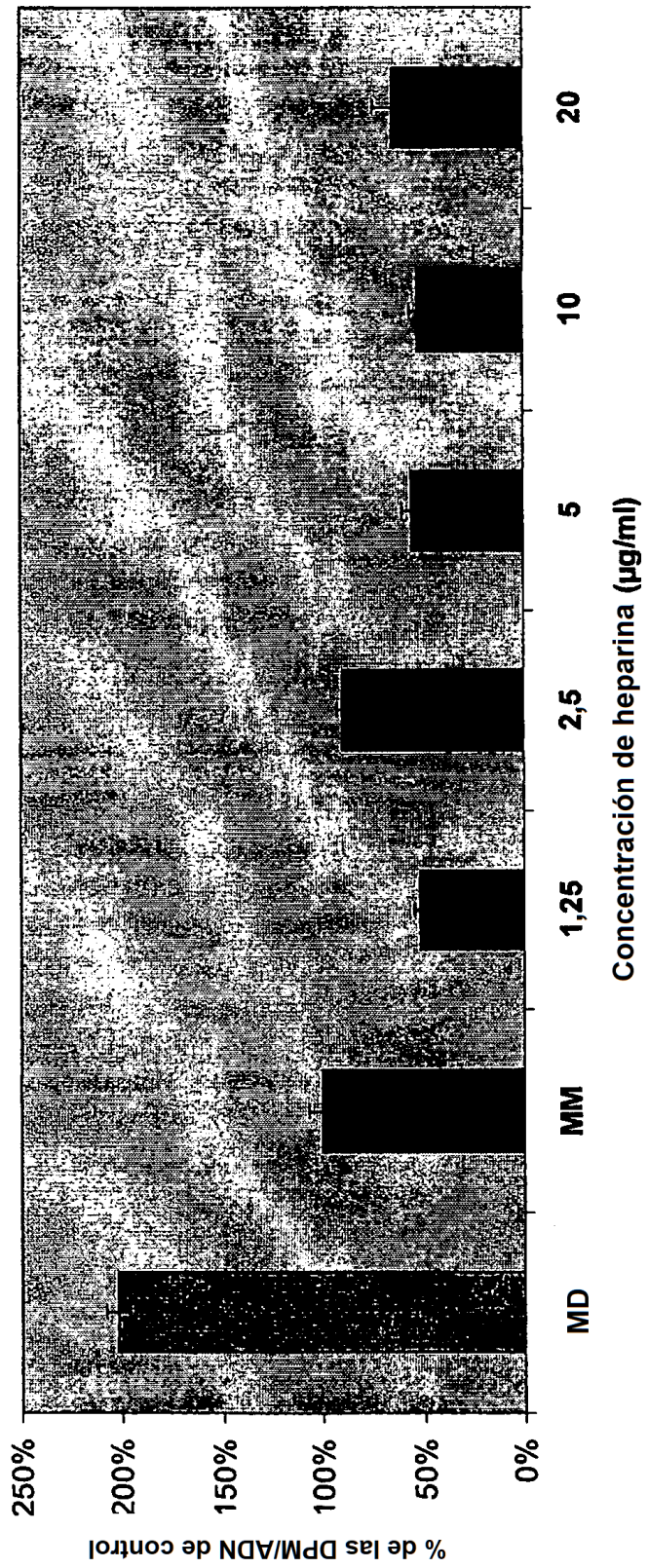
## Figura 13

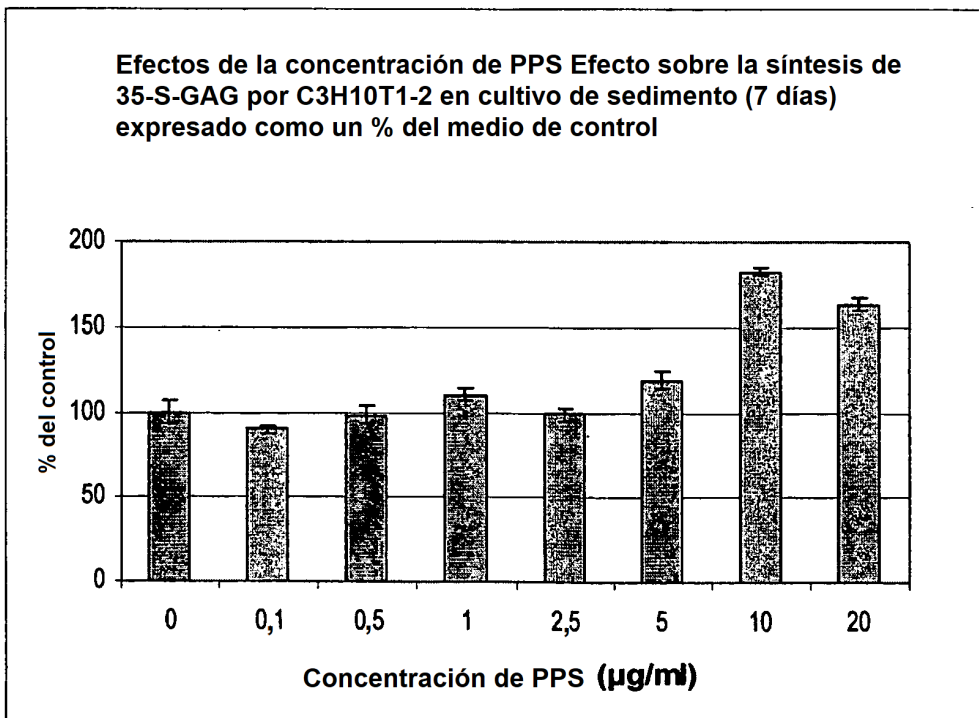
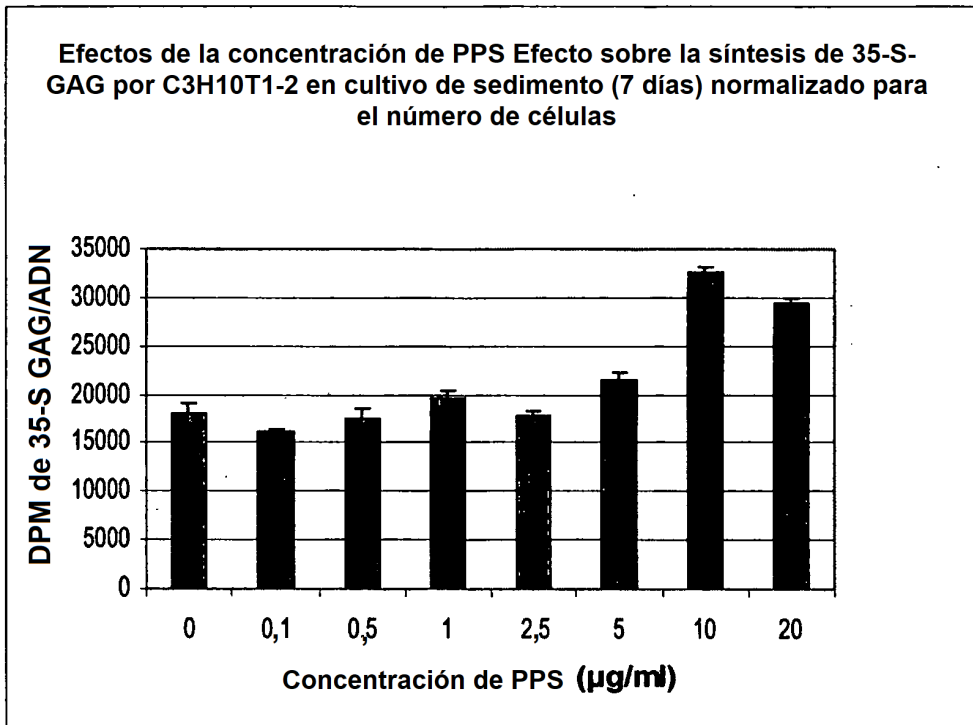
Expresión génica por las células ATDC5 en cultivo de sedimento de 6 días con tratamiento de diversas concentraciones de PPS en Medio de Mantenimiento (MM)



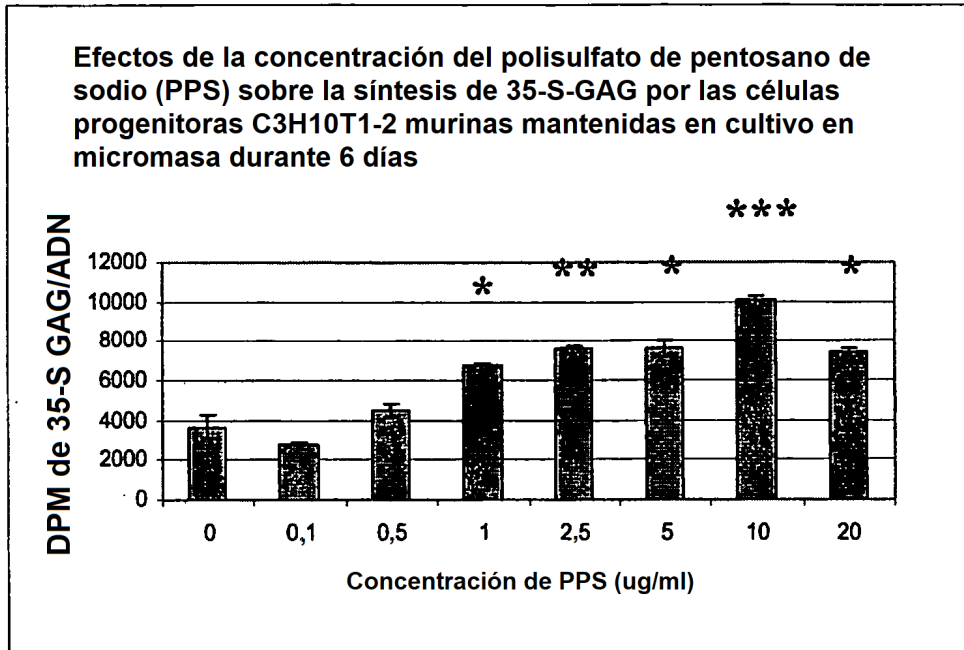
## Figura 14

Efectos dependientes de la dosis de la heparina sobre la biosíntesis por las células progenitoras murinas (ATDC5) de proteoglicanos (PG) en cultivo de sedimento como se determina por la incorporación de  $^{35}\text{S}$  en el PG/ug de ADN. MM = medio de mantenimiento, DM = en MM + Insulina (10 ug/ml)

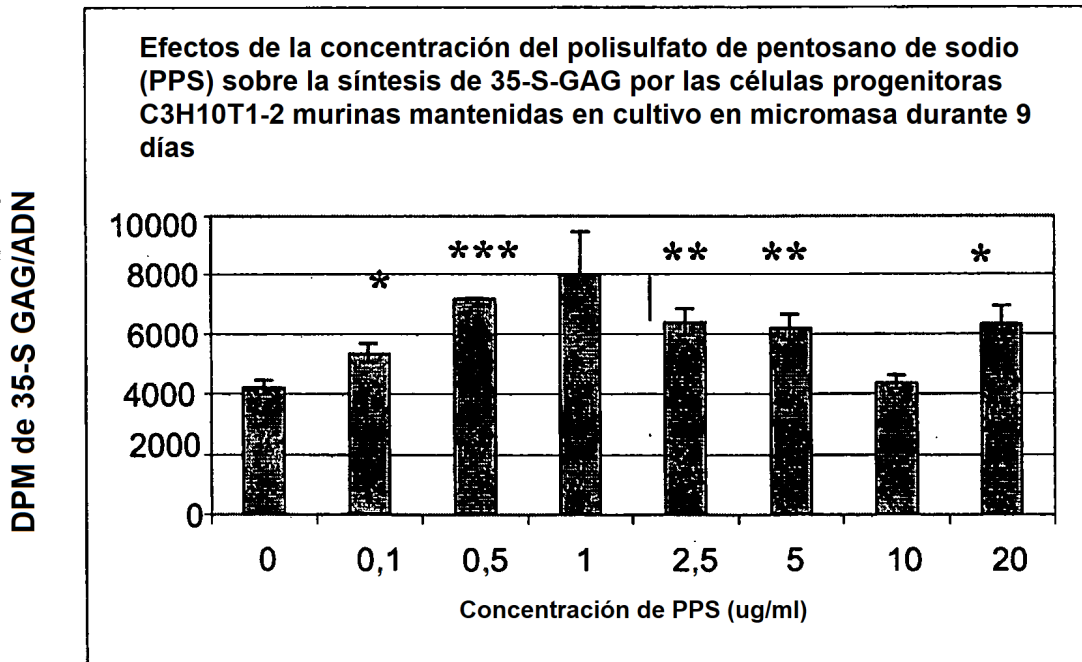




**Figura 15**



Síntesis el Día 6.



Síntesis el Día 9.

Figura 16

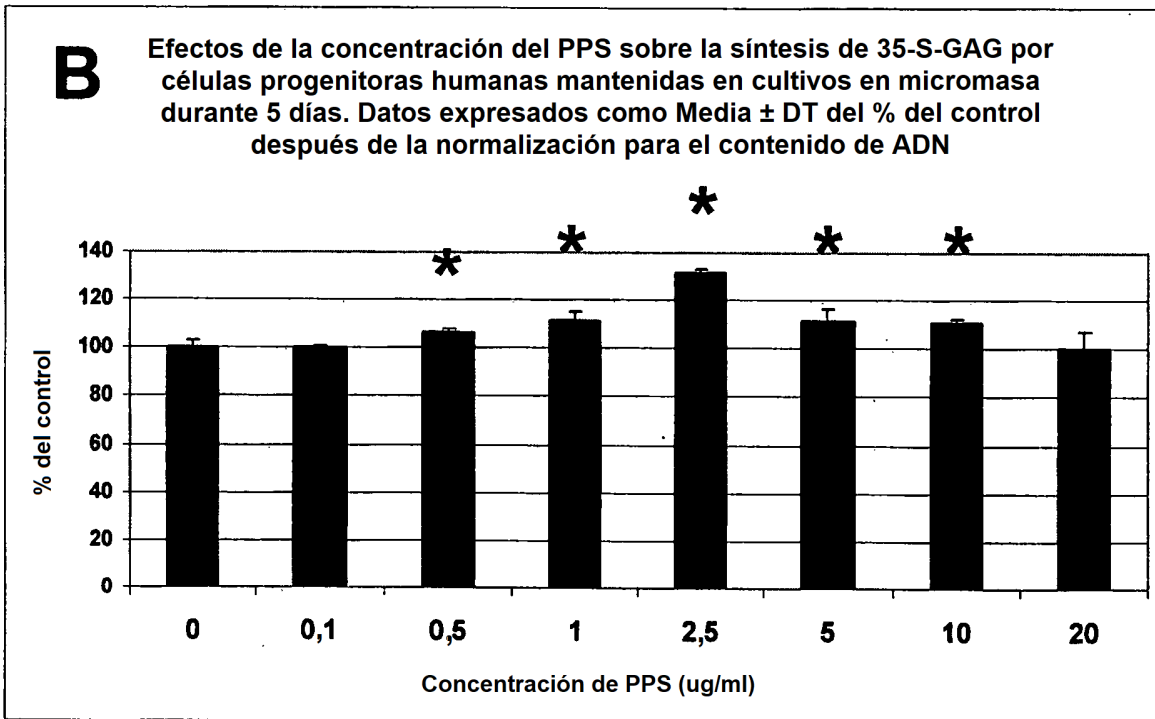
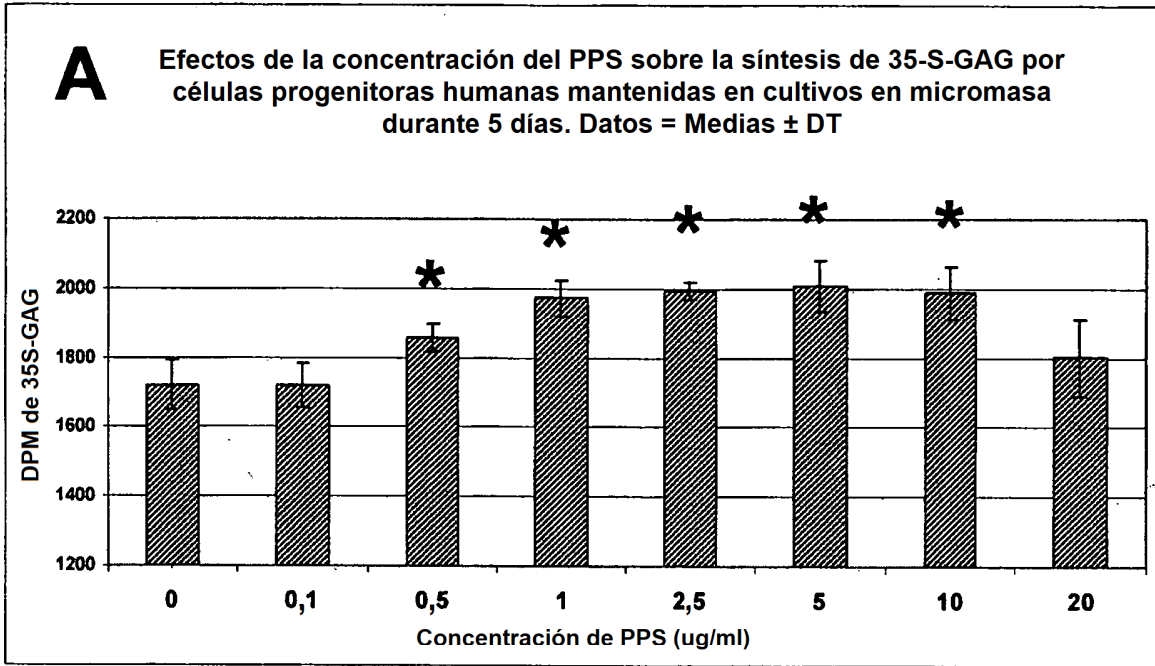
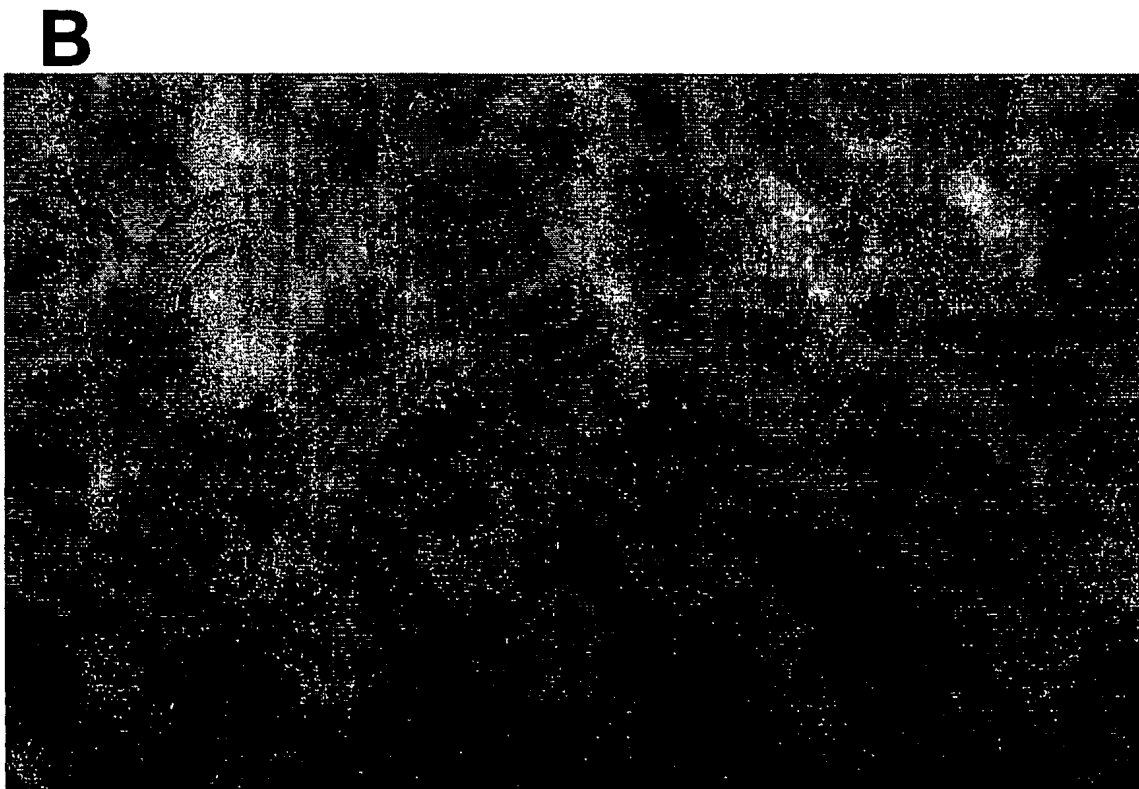
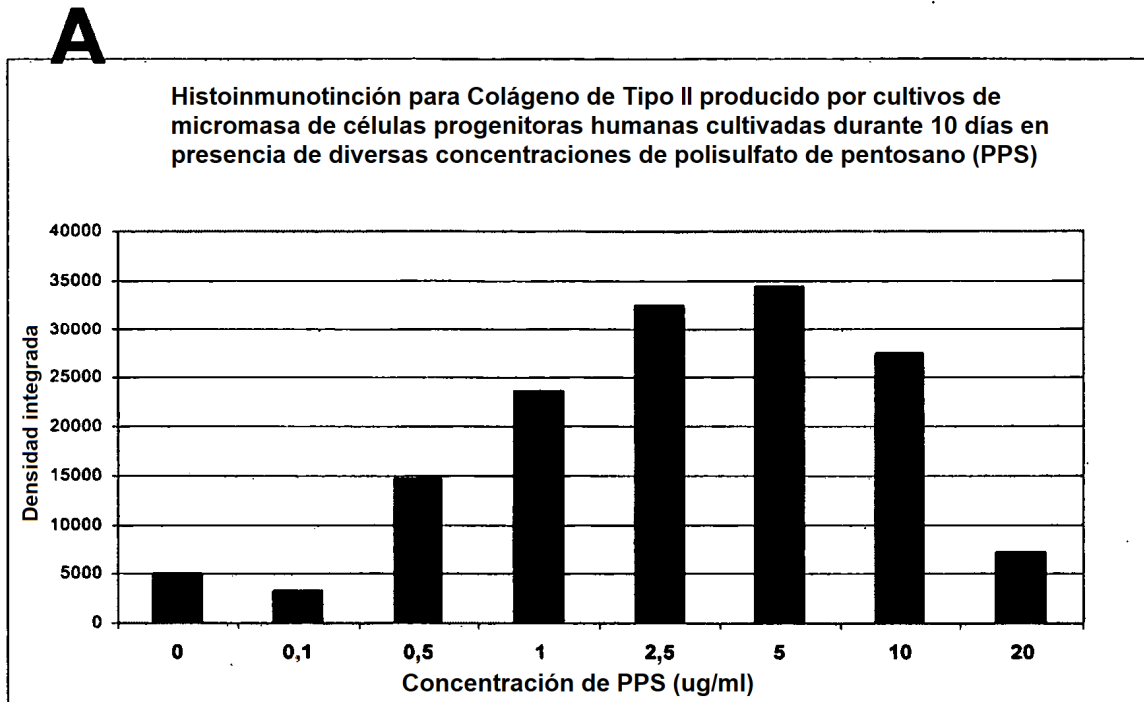
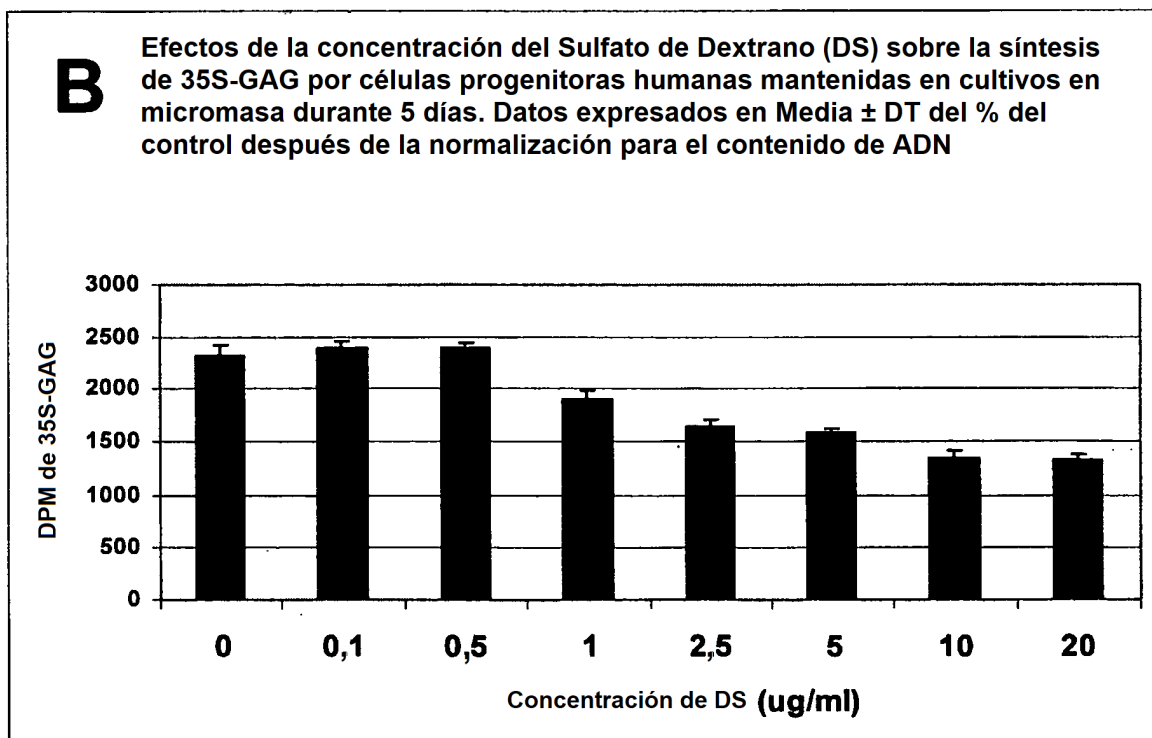
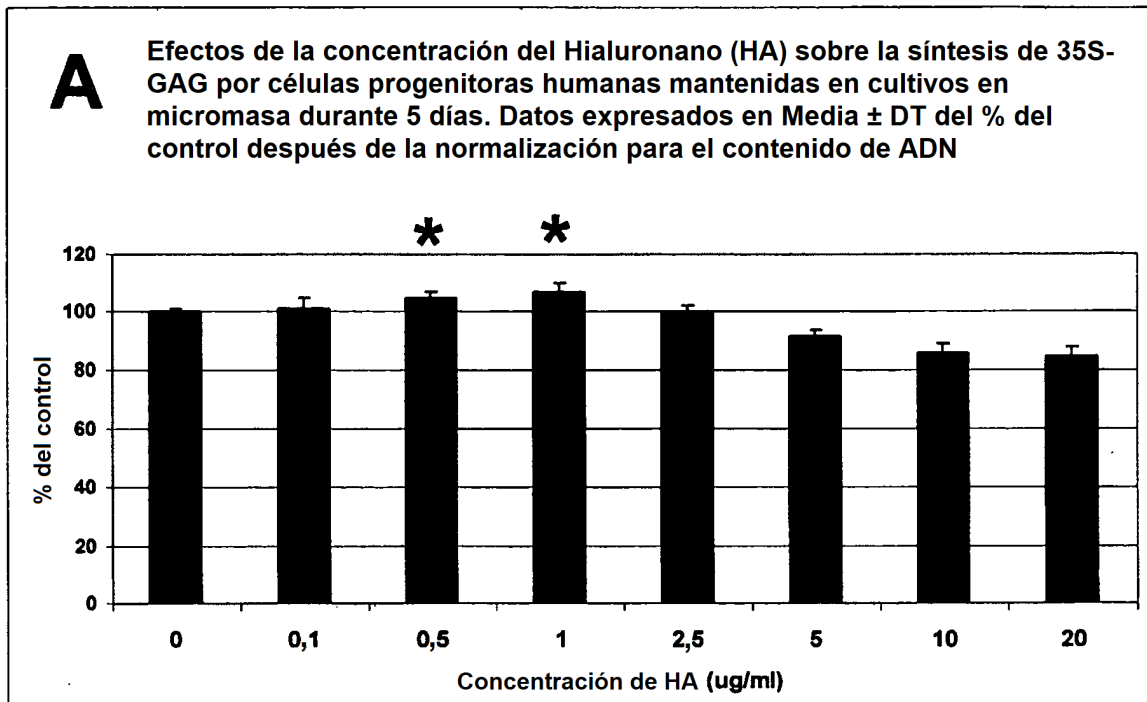


Figura 17



**Figura 18**

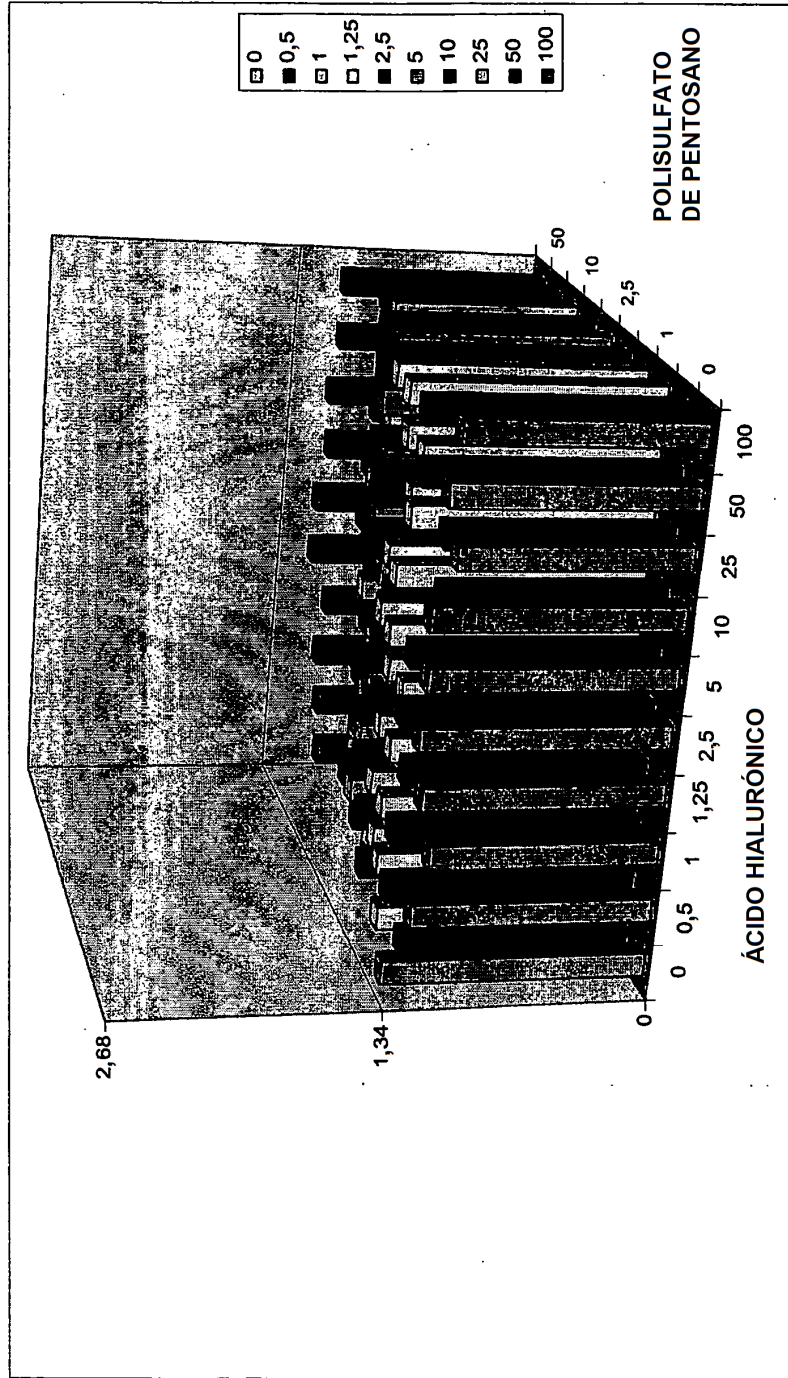


**Figura 19**

### Figura 20

Los efectos el polisulfato de pentosano y el ácido hialurónico solos y en combinación sobre la proliferación de células progenitoras humanas normales en cultivos en monocapa usando el ensayo de escisión de deshidrogenasa mitocondrial WST-1

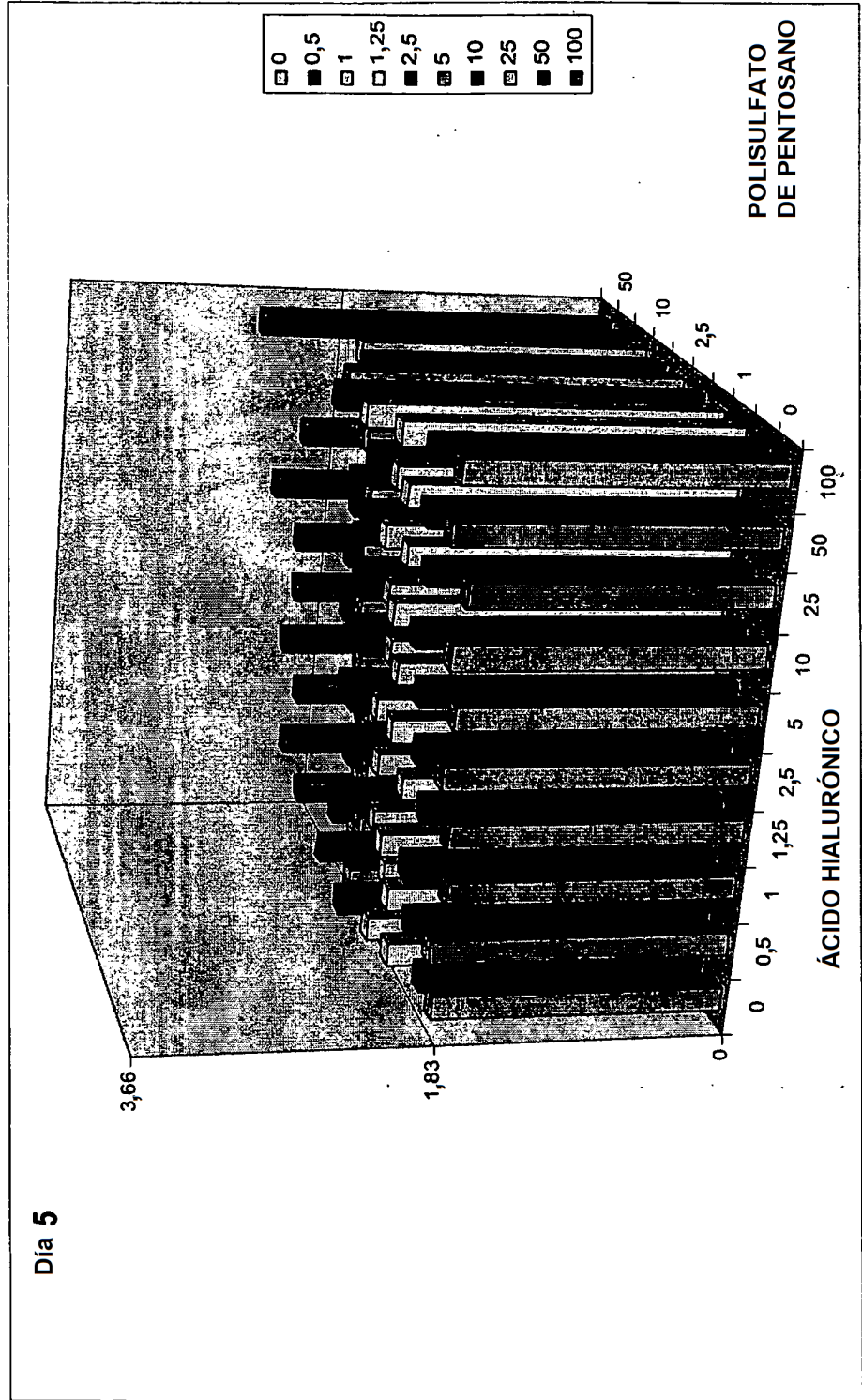
Día 3





### Figura 20 (cont)

Los efectos el polisulfato de pentosano y el ácido hialurónico solos y en combinación sobre la proliferación de células progenitoras humanas normales en cultivos en monocapa usando el ensayo de escisión de deshidrogenasa mitocondrial WST-1



## Figura 20 (cont)

Los efectos el polisulfato de pentosano y el ácido hialurónico solos y en combinación sobre la proliferación de células progenitoras humanas normales en cultivos en monocapa usando el ensayo de escisión de deshidrogenasa mitocondrial WST-1

AUMENTO EN NÚMERO DE VECES  
ENTRE EL DÍA 3 Y EL DÍA 5

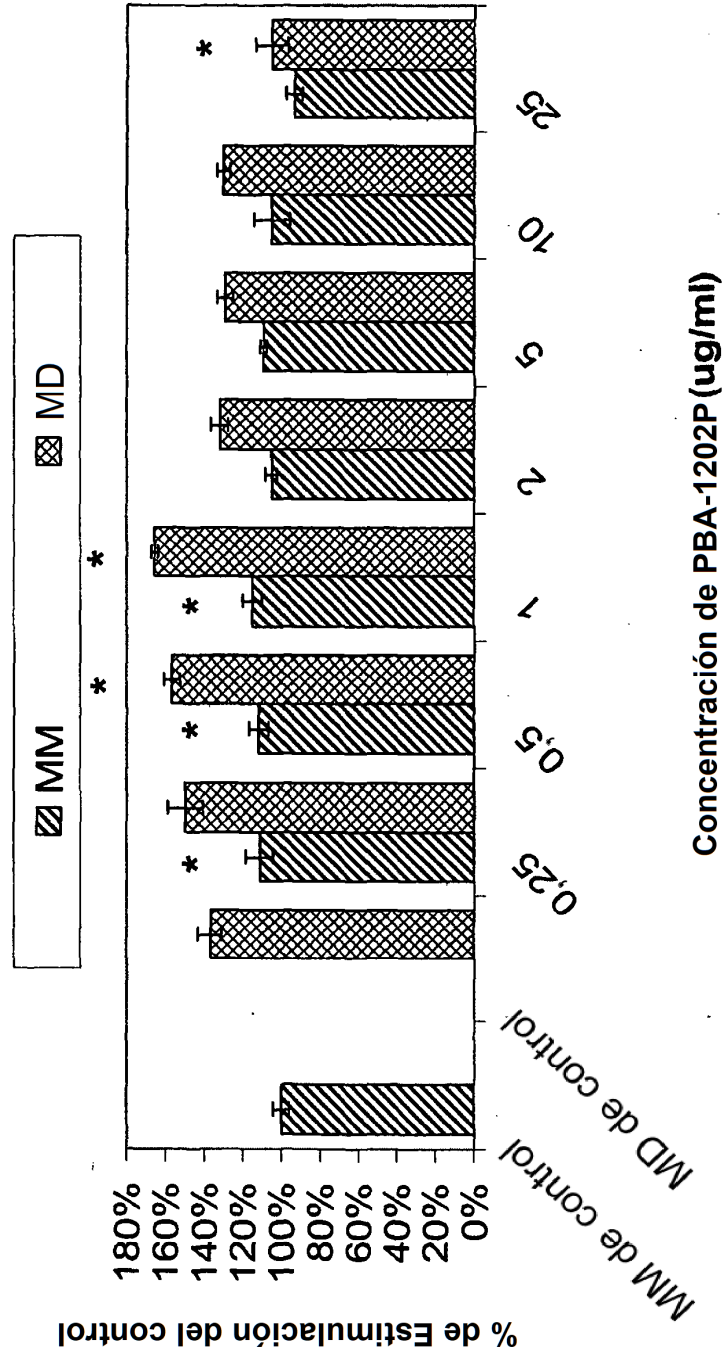
PPS

	0	0,5	1	1,25	2,5	5	10	25	50	100
0	1,367027	1,548069	1,572297	1,508635	1,522537	1,502618	1,535914	1,614484	1,632636	1,660059
0,5	1,549488	1,508876	1,560079	1,545529	1,540284	1,594191	1,798056	1,762891	1,612277	1,588902
1	1,579163	1,577823	1,629972	1,574172	1,698446	1,584639	1,632116	1,651837	1,72907	1,658346
1,25	1,789258	1,584628	1,62107	1,649523	1,714708	1,576569	1,628595	1,801045	1,697402	1,773875
2,5	1,779931	1,848244	1,705617	1,753231	1,82839	1,856705	1,660392	1,683915	2,068846	1,839103
5	1,811285	1,596678	1,618922	1,623561	1,817339	1,785522	1,715203	1,755084	1,724094	1,956152
10	1,714555	1,654457	1,728899	1,680408	1,843235	1,749089	1,767347	1,782298	1,763858	1,777877
25	1,887239	1,670588	1,701167	1,616021	1,769157	1,723982	1,691715	1,832902	1,740039	1,949161
50	1,781377	1,722955	1,718569	1,780917	1,924024	1,795398	1,795477	1,694828	1,632392	1,891473
100	1,791899	1,877337	1,77907	1,9375	1,726356	1,744098	1,961135	1,800952	1,606155	2,155804

HA

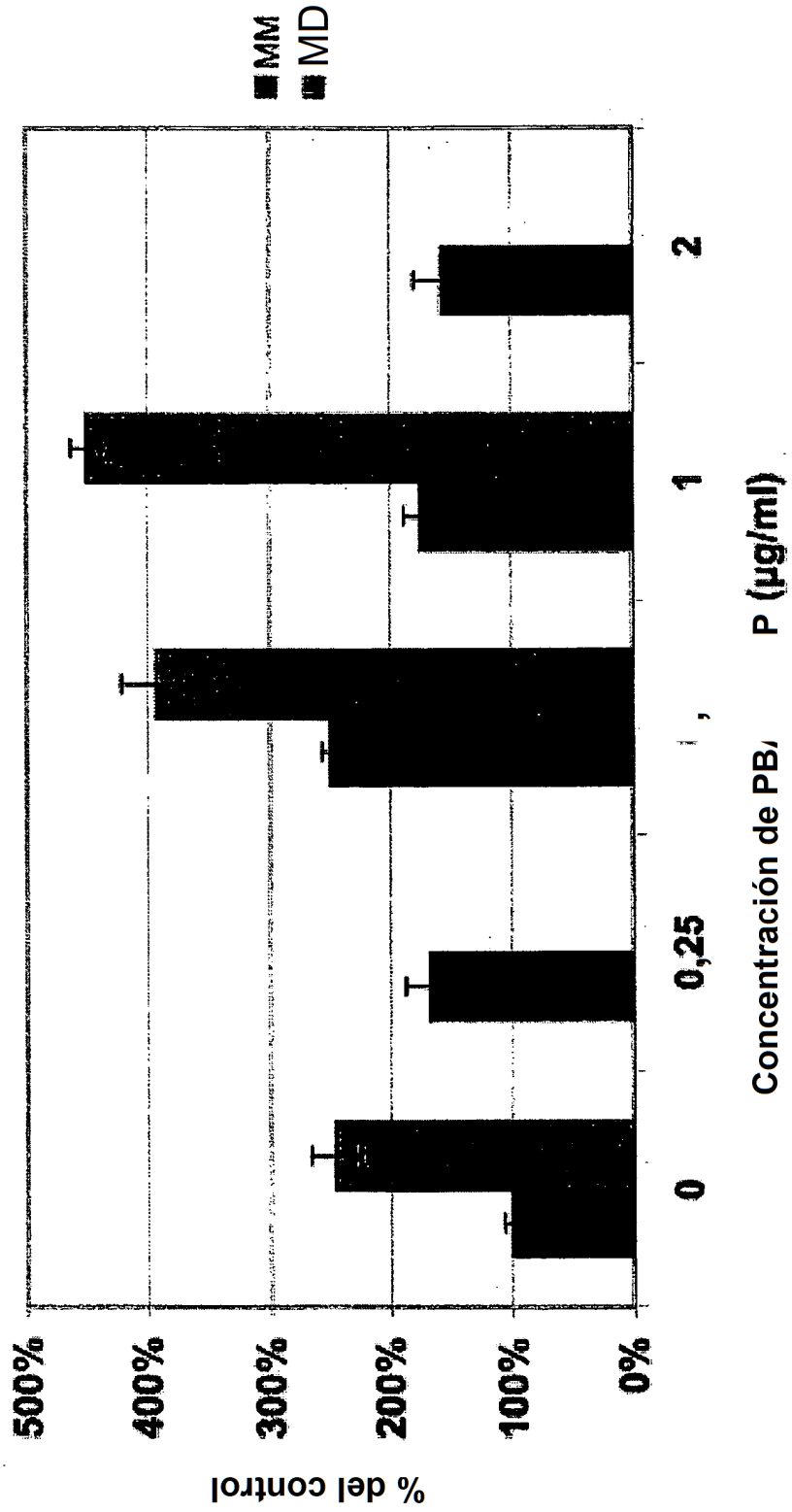
**Figura 21**

% de Estimulación por rhNC4 (lote PBA-1202P) de la síntesis de 35S-GAG por células progenitoras ATDC5 cultivadas en ausencia (MM) o presencia (MD) de 10 ugamos/ml de insulina. \* = P < 0,05 con respecto al control



### Figura 22

Efectos dependientes de la concentración de PBA-1202 sobre la biosíntesis de 35S-proteoglucanos por las células ATDC5 mantenidas en un cultivo de sedimento en presencia de medio de mantenimiento (MM) o medio de diferenciación (MD) durante 48 horas



**Figura 23**

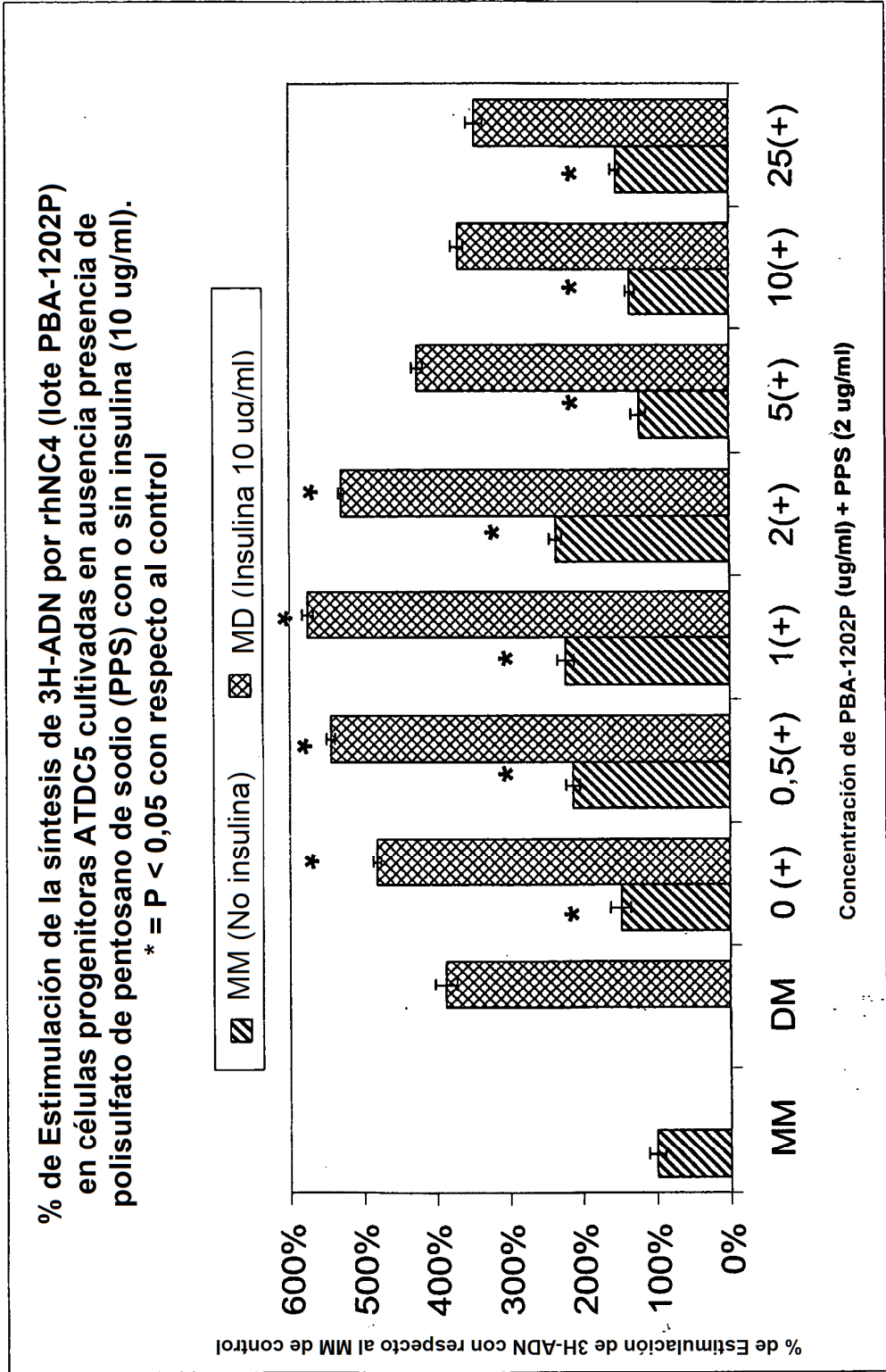
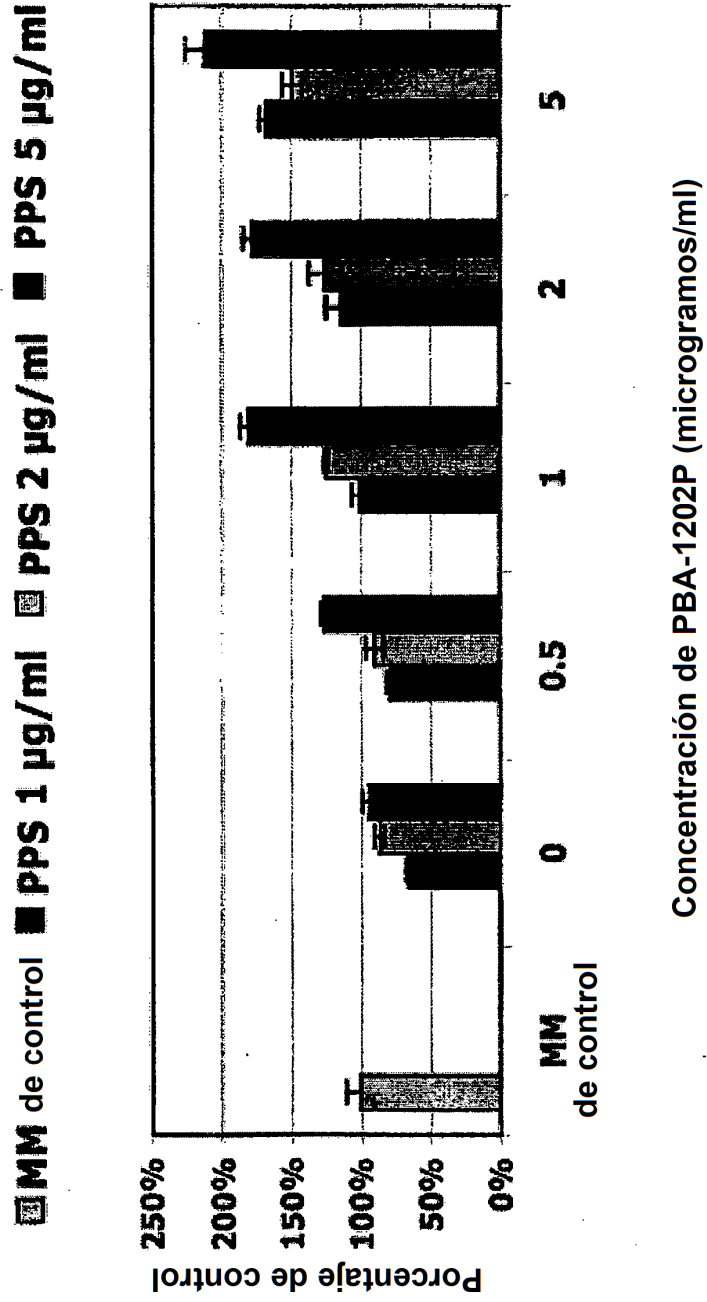


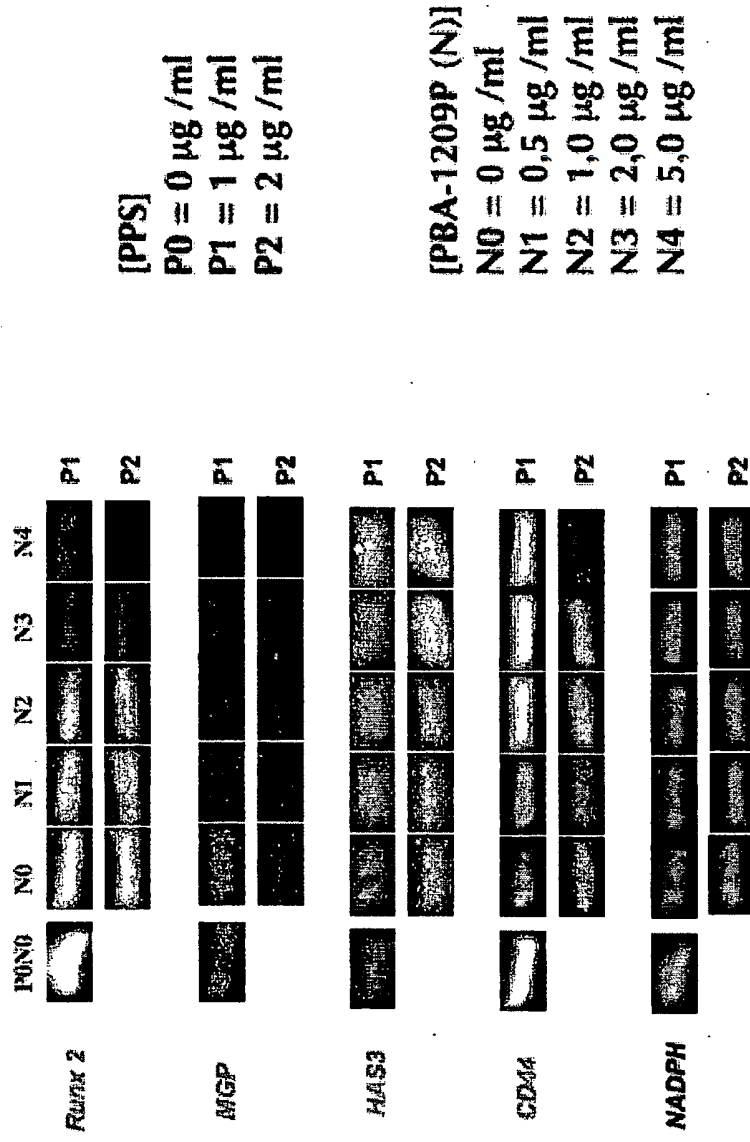
Figura 24

Efectos del PPS solo y en combinación con PBA-1202P sobre la síntesis de 35S-PG (DPM)/microgramos de ADN por las células ATDC5 de ratón en cultivos en monocapa expresados como porcentaje de medio de mantenimiento de control (MM)



## Figura 25

Detección por PCR de transcripción inversa de la expresión de los genes Runx-2, MPG, HAS3 y CD44 en células ATDC5 cultivadas durante 2 días con combinaciones en serie de PPS y PBA-1202P.



**Figura 26**

Detección por PCR de transcripción inversa de la expresión de los genes Runx 2, Smad 2 y Smad 4 en células ATDC5 cultivadas durante 2 días con combinaciones en serie de PPS y PBA-1202P.

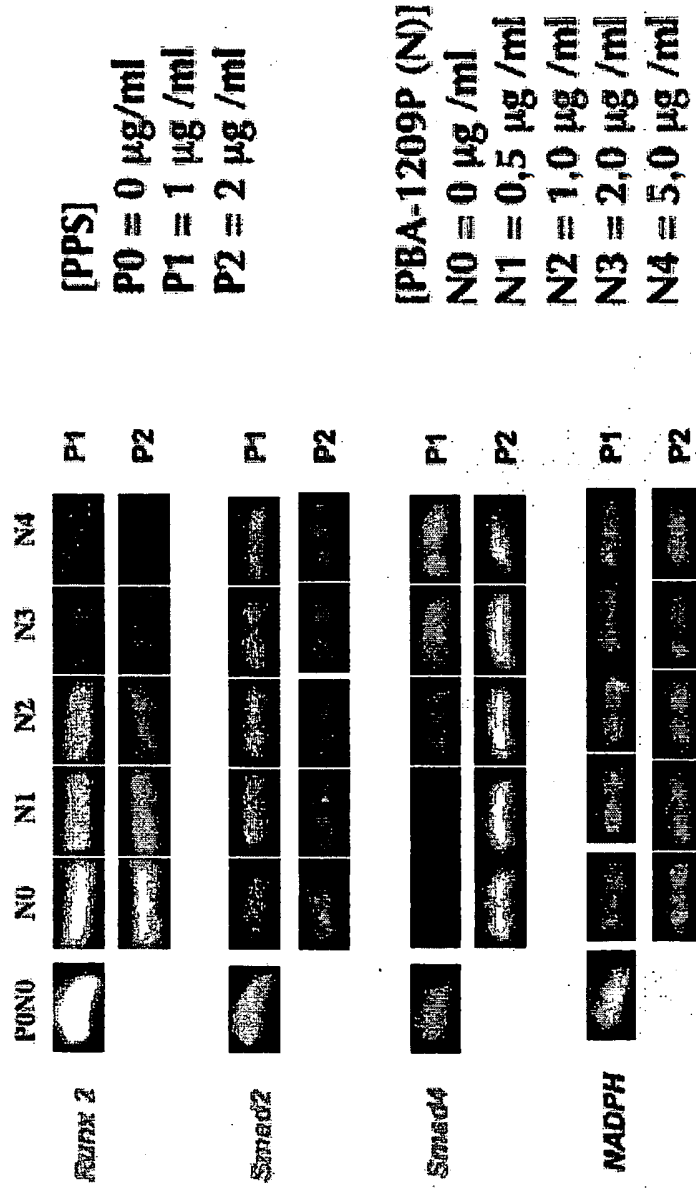




Figura 27

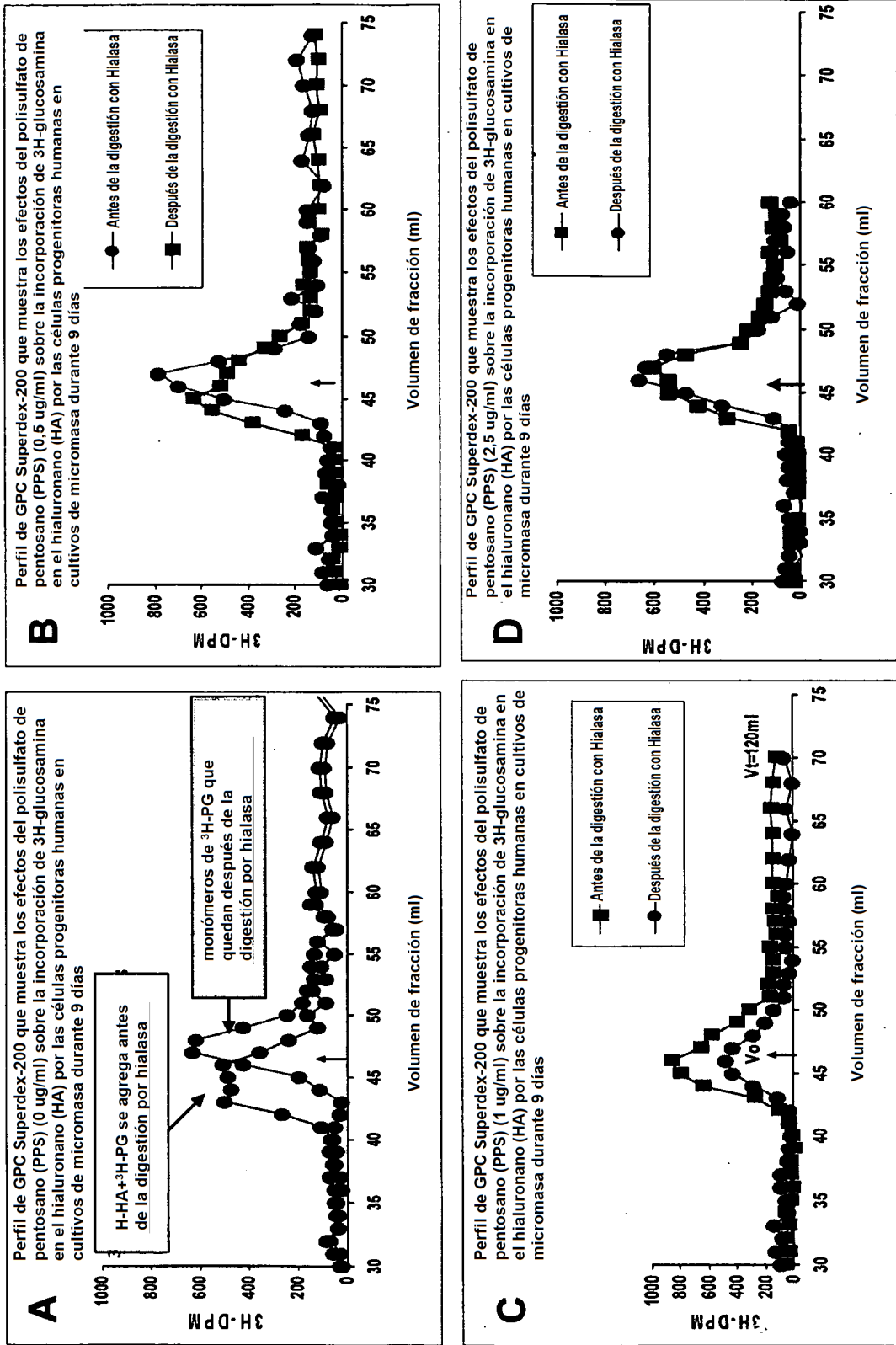
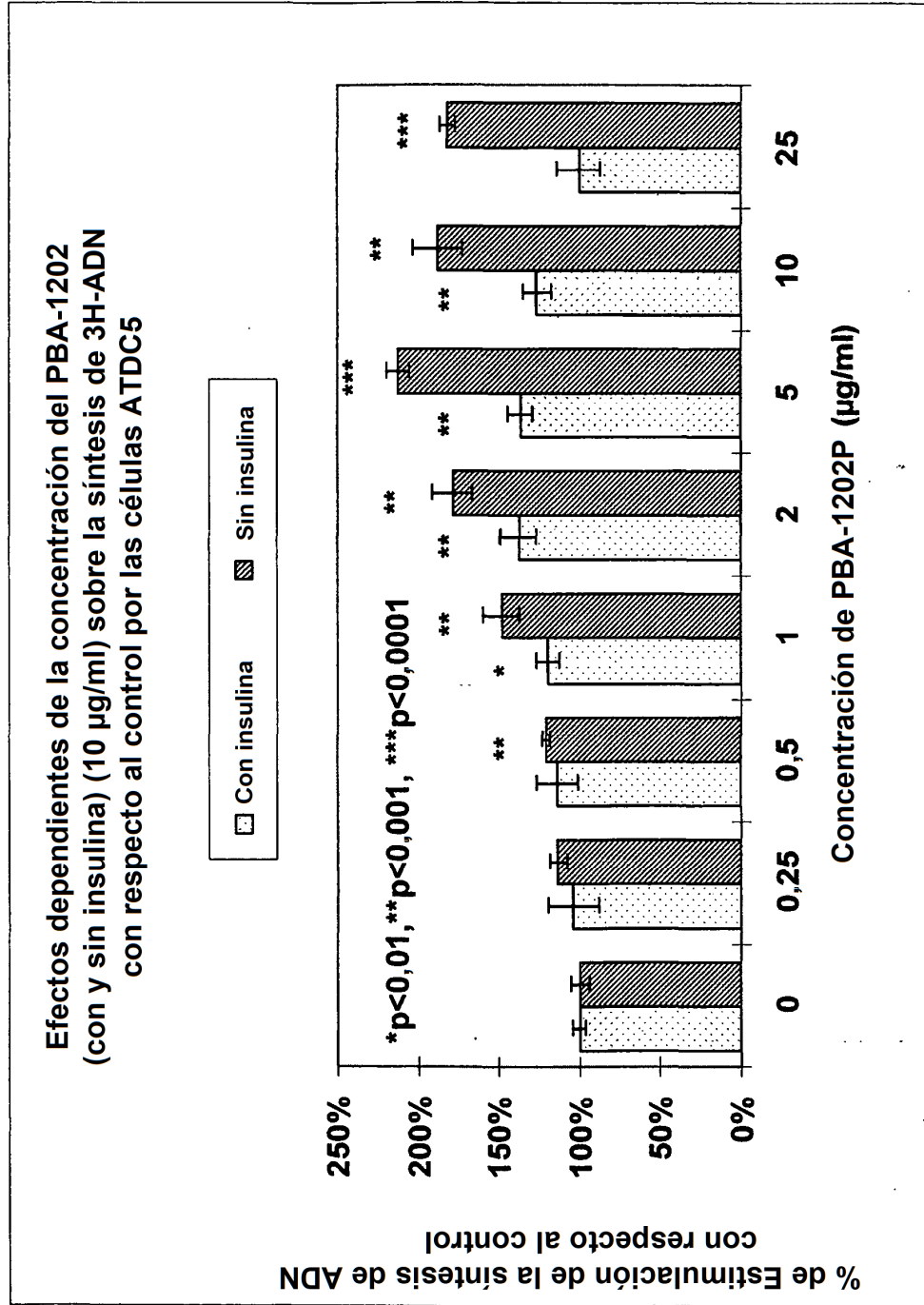
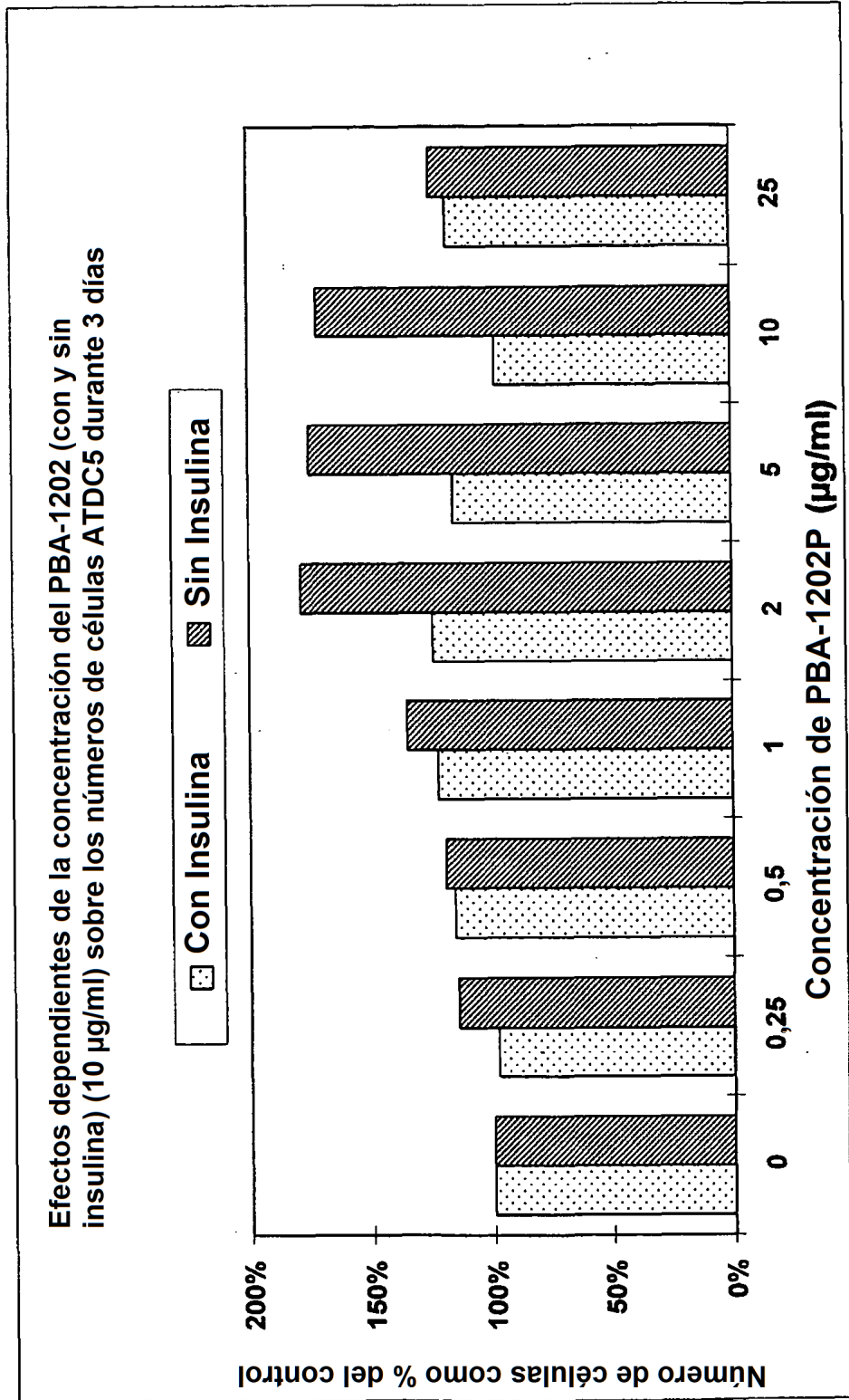


Figura 28



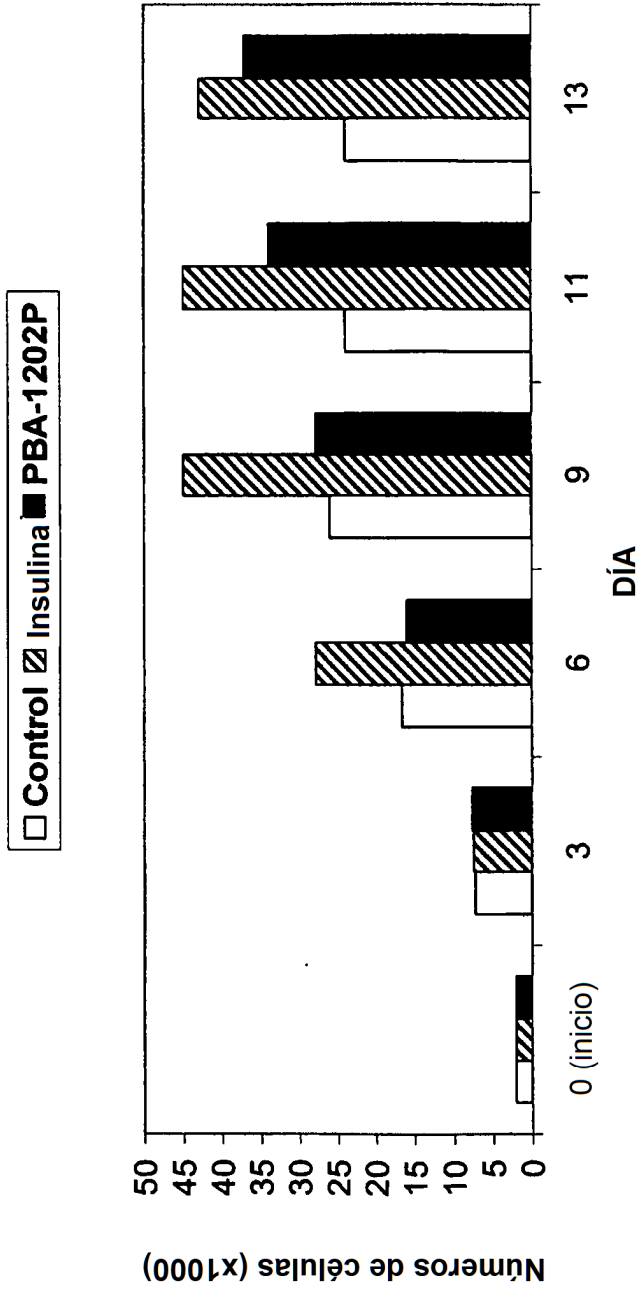
**Figura 29**

Efectos dependientes de la concentración del PBA-1202 (con y sin insulina) (10 µg/ml) sobre los números de células ATDC5 durante 3 días



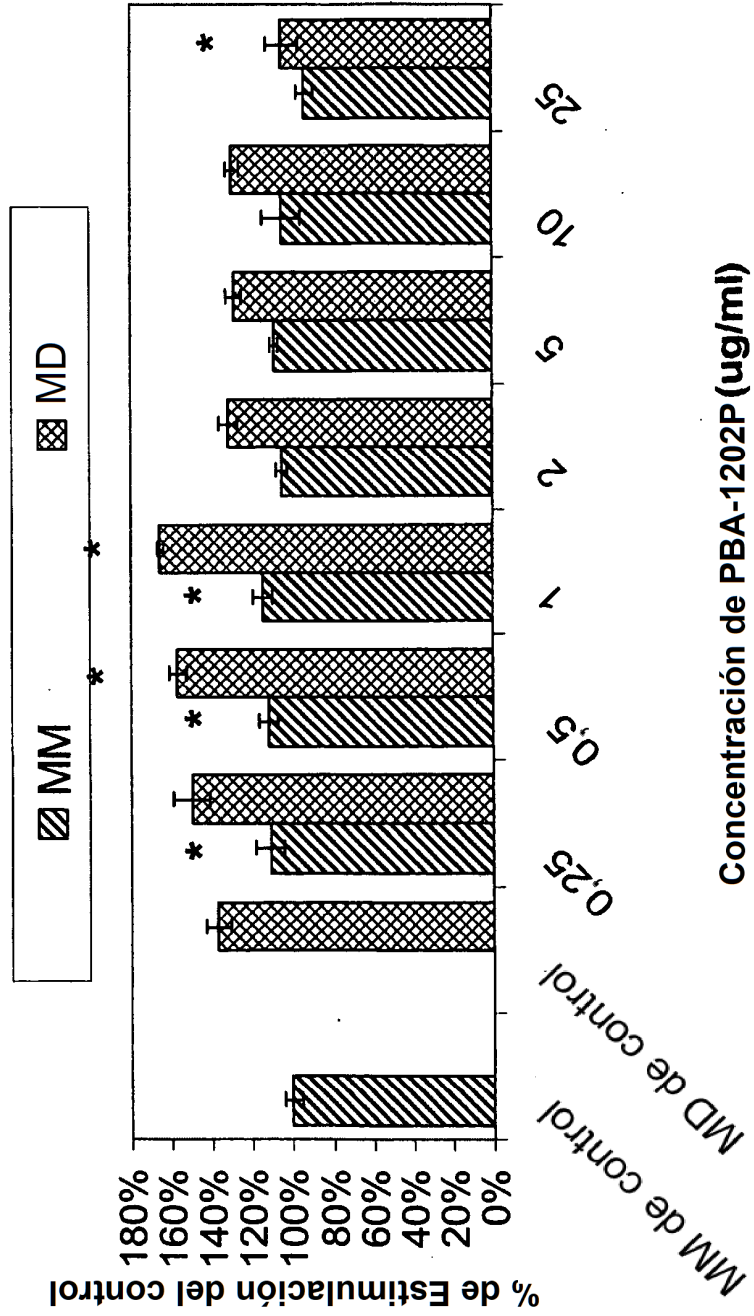
**Figura 30**

Cinética del crecimiento de las células ATDC5 en ausencia (control) y en presencia de PBA-1202P (5 ug/ml) o Insulina (10 ug/ml). En el día 0 las células se sembraron a 20.000 células por pocillo. Los cultivos de insulina consiguieron la confluencia el día 6. PBA-1202P el día 9.



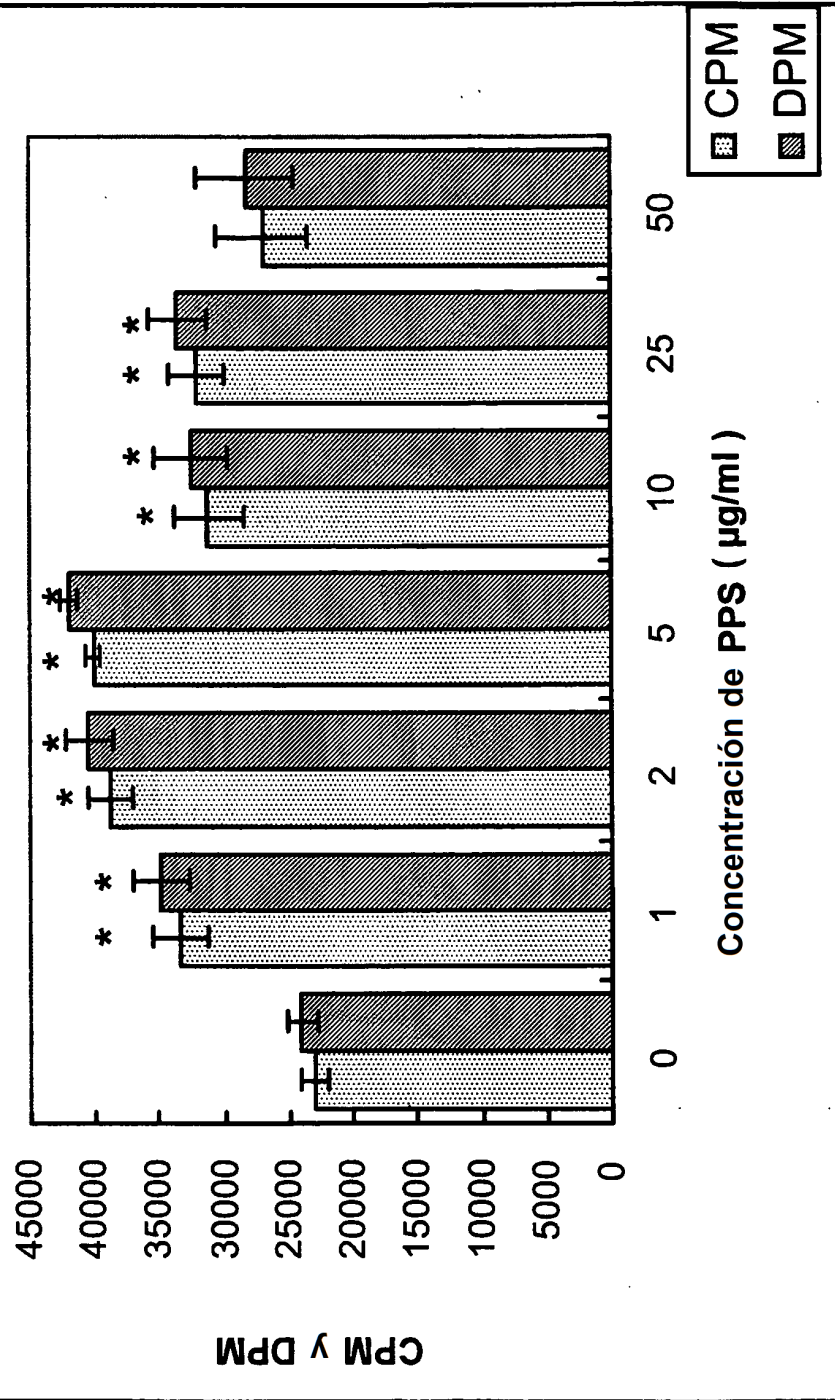
**Figura 31**

% de Estimulación por rhNC4 (lote PBA-1202P) de la síntesis de 35S-GAG por las células ATDC5 cultivadas en ausencia (MM) o presencia (MD) de 10 ugramos/ml de Insulina. \* = P < 0,05 con respecto al control



**Figura 32**

**Efectos del PPS sobre la incorporación de S35-GAG en células ATDC5**  
 \* = P < 0,005 con respecto al control (sin PPS)



**Figura 33**

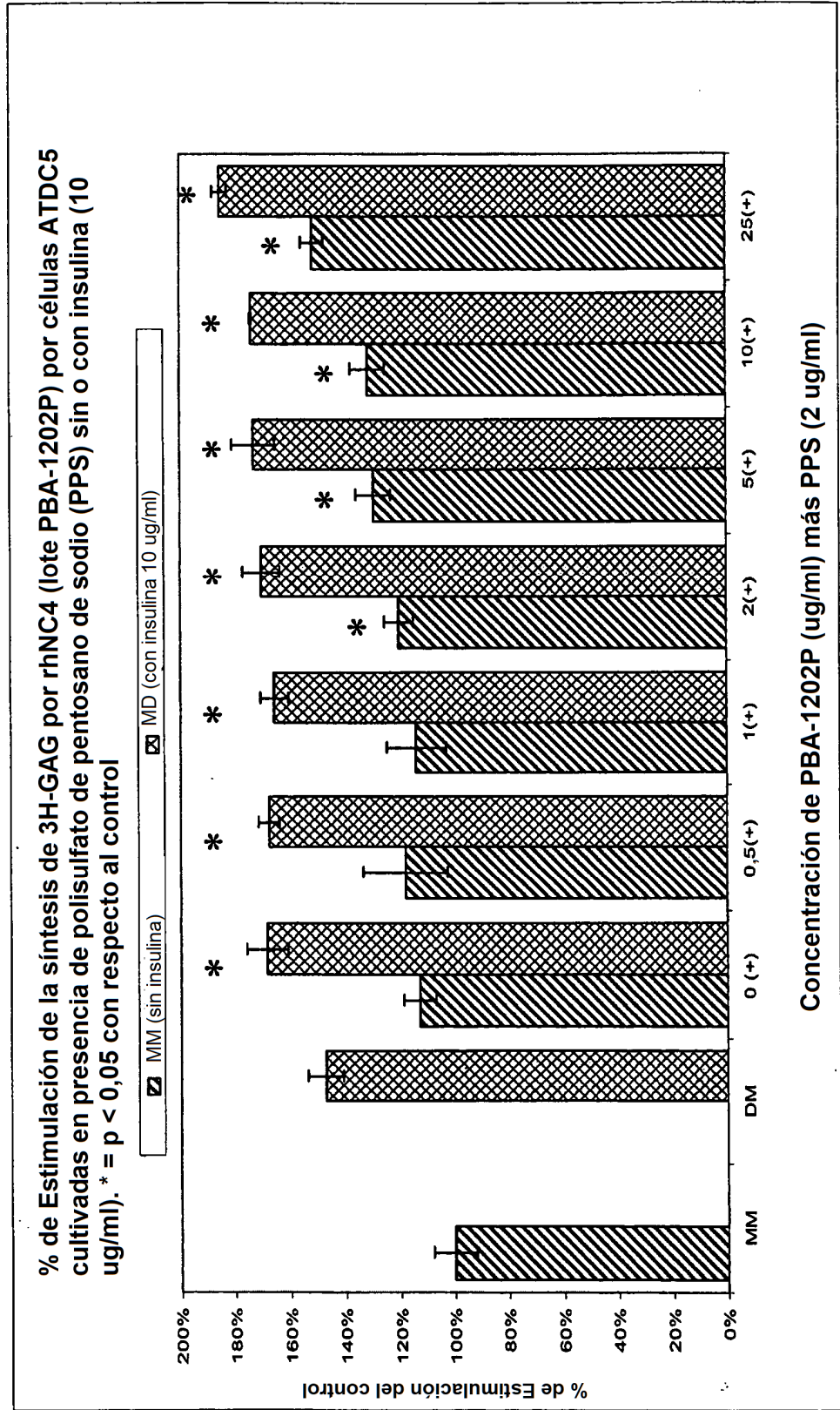
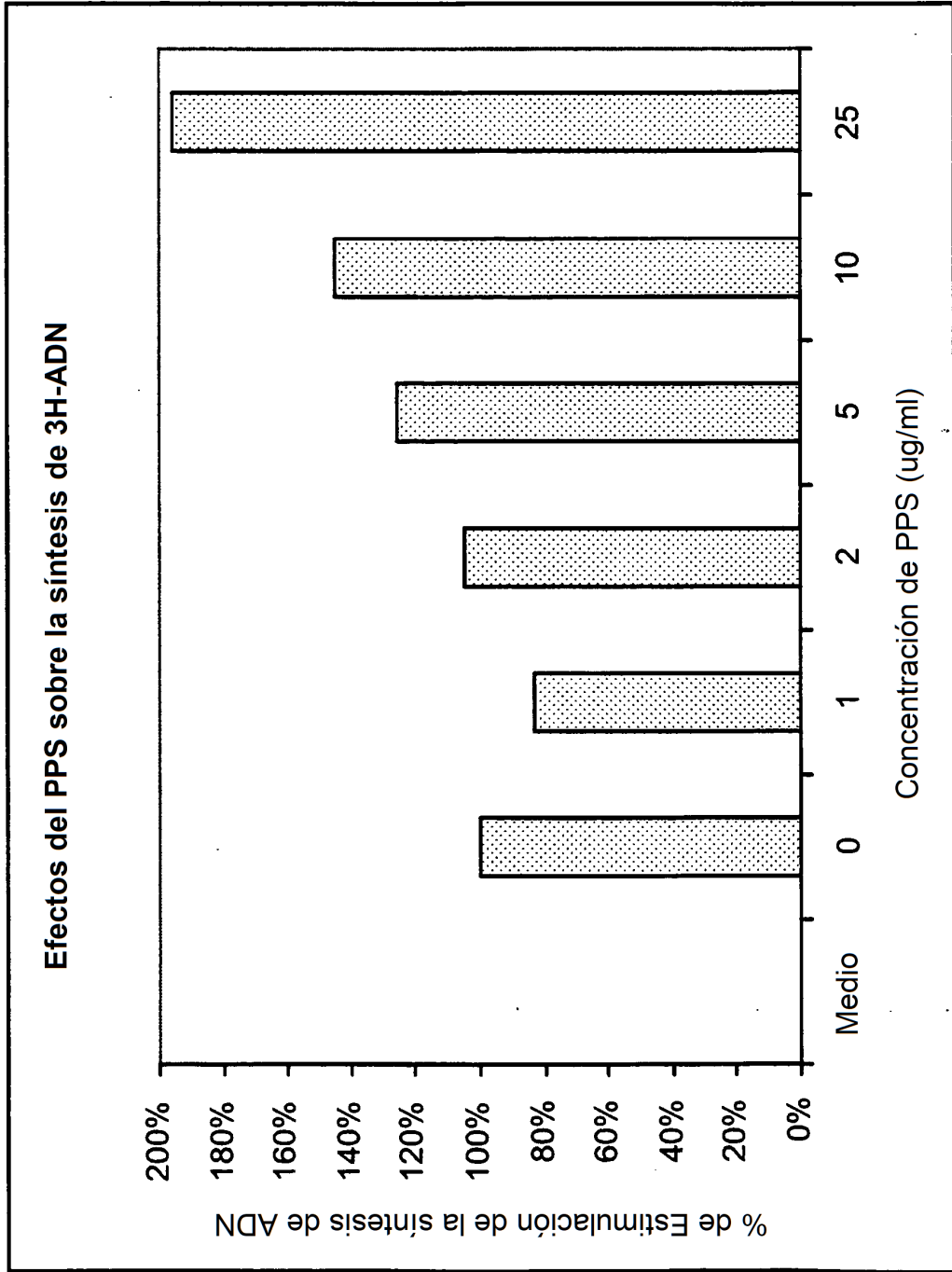


Figura 34





SEQ ID: 1

```

<210> 1
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Ala Val Lys Arg Arg Pro Arg Phe Pro Val Asn Ser Asn Ser Asn Gly
1 5 10 15
Gly Asn Glu Leu Cys Pro Lys Ile Arg Ile Gly Gln Asp Asp Leu Pro
20 25 30
Gly Phe Asp Leu Ile Ser Gln Phe Gln Val Asp Lys Ala Ala Ser Arg
35 40 45
Arg Ala Ile Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Thr Leu Gln Val Ala Tyr
50 55 60
Lys Leu Gly Asn Asn Val Asp Phe Arg Ile Pro Thr Arg Asn Leu Tyr
65 70 75 80
Pro Ser Gly Leu Pro Glu Glu Tyr Ser Phe Leu Thr Thr Phe Arg Met
85 90 95
Thr Gly Ser Thr Leu Lys Lys Asn Trp Asn Ile Trp Gln Ile Gln Asp
100 105 110
Ser Ser Gly Lys Glu Gln Val Gly Ile Lys Ile Asn Gly Gln Thr Gln
115 120 125
Ser Val Val Phe Ser Tyr Lys Gly Leu Asp Gly Ser Leu Gln Thr Ala
130 135 140
Ala Phe Ser Asn Leu Ser Ser Leu Phe Asp Ser Gln Trp His Lys Ile
145 150 155 160
Met Ile Gly Val Glu Arg Ser Ser Ala Thr Leu Phe Val Asp Cys Asn
165 170 175
Arg Ile Glu Ser Leu Pro Ile Lys Pro Arg Gly Pro Ile Asp Ile Asp
180 185 190
Gly Phe Ala Val Leu Gly Lys Leu Ala Asp Asn Pro Gln Val Ser Val
195 200 205
Pro Phe Glu Leu Gln Trp Met Leu Ile His Cys Asp Pro Leu Arg Pro
210 215 220
Arg Arg Glu Thr Cys His Glu Leu Pro Ala Arg Ile Thr Pro Ser Gln
225 230 235 240
Thr Thr Asp Glu Arg
245

```

Figura 35