

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 006**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/EP2011/062926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11743493 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2598879**

54 Título: **Marcadores para la determinación de condrocitos**

30 Prioridad:

27.07.2010 DE 102010033565

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

10.04.2018

73 Titular/es:

**TETEC TISSUE ENGINEERING TECHNOLOGIES
AG (100.0%)
Aspenhastrasse 18
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:

**MOLLENHAUER, JUERGEN y
GAISSMAIER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 663 006 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

Marcadores para la determinación de condrocitos

5 [0001] La presente invención se refiere a marcadores para usar en la determinación de la identidad farmacéutica, la pureza y/o la potencia de los condrocitos, y a un método para la determinación de la identidad farmacéutica, la pureza y/o la potencia de los condrocitos, método en el cual se determinan tales marcadores.

10 [0002] Los condrocitos son células que se originan a partir de los condroblastos y que se sitúan en el tejido cartilaginoso. En el cartílago completamente desarrollado, los condrocitos están juntos en grupos isogénicos - hasta aproximadamente 10- rodeados por sustancia extracelular; constituyen menos del 10% del volumen óseo. Debido a su alta actividad de síntesis, tienen muchos orgánulos y aparatos de Golgi grandes. En el cartílago sano, los condrocitos tienen un índice de mitosis bajo; sintetizan componentes de la matriz específicos y los acumulan como sustancia cartilaginosa hialina, y cambian su índice de síntesis con un modelo alterado de carga.

15 [0003] El cartílago hialino se encuentra en cualquier parte donde se producen principalmente cargas de presión, por lo que generalmente se encuentra en el cartílago articular. Hoy en día, los defectos de los cartílagos y las enfermedades articulares degenerativas están entre las enfermedades más comunes. Aquí normalmente se hace una distinción entre las enfermedades del cartílago en las que la destrucción de las superficies articulares se puede atribuir principalmente a impactos de carga y las enfermedades en las que la degeneración articular debida a la inflamación es predominante.

20 [0004] Aparte de los síntomas (en parte muy) dolorosos que acompañan a estas enfermedades, también son uno de los principales problemas de salud, ya que el tratamiento de los defectos en las articulaciones es muy costoso, lo que, en particular, también se puede atribuir al elevado número de casos de enfermedad.

25 [0005] Ya que la capacidad del cartílago hialino para la regeneración endógena es restringida por naturaleza, un procedimiento quirúrgico para tratar los defectos del cartílago es normalmente la única alternativa de terapia que tiene éxito al menos en cierta medida. Lo que tienen en común los métodos de terapia usados actualmente es el objetivo de restaurar la masa del cartílago, una superficie articular congruente, la funcionalidad fisiológica y la ausencia de dolor. Recientemente, el trasplante/implante autólogo de condrocitos (ACT o ACI) en particular ha emergido como una medida preferida. En el contexto del ACT, se retira una biopsia de cartílago de un área sana lejos de la zona de carga articular principal en un primer procedimiento quirúrgico. A partir la red matricial de la biopsia, los condrocitos se liberan enzimáticamente, se aíslan y se expanden *in vitro*. Después de alrededor de 30 dos semanas y de una expansión de las células exitosa, la articulación se reabre y se retiran los residuos. Posteriormente, un parche de periostio (periosteum) del paciente se sutura sobre el defecto, creando una cámara que se rellena con la suspensión de condrocitos.

35 [0006] El ACT tiene, sin embargo, algunos inconvenientes que se han suplido, en particular, mediante el implante de células/condrocitos aplicado a biomateriales.

40 [0007] Por ejemplo, el estado de la técnica describe, por ejemplo, un soporte de colágeno bioreabsorbible bifásico (NOVOCART® 3D, AG TETEC, Reutlingen, Alemania) que -colonizado por condrocitos autólogos- se trasplanta en defectos de hueso cartilaginoso o cartílago puro. Mientras que las células median en la restauración biológica del cartílago defectuoso, el soporte bifásico facilita la manipulación intraoperativa y proporciona, *in vivo*, una protección mecánica de las células implantadas y del nuevo tejido cartilaginoso en desarrollo. Además, el soporte también asegura que los condrocitos que se van a implantar permanezcan en el sitio del defecto, lo que muy a menudo es un gran problema en el caso de los ACT convencionales, es decir, los 45 ACT con una cubierta de parche de periostio.

50 [0008] Sin embargo, la selección, identificación y cultivo de condrocitos, tanto en los ACT convencionales como en el uso de ACT asistidos con soporte, o de los implantes de condrocitos en general, es un desafío importante; esto se debe a que los condrocitos pueden variar en gran medida con respecto a su idoneidad para ser usados como células autólogas para implantar para la regeneración del cartílago, y esto es así no solo para condrocitos de un donante en relación con condrocitos de otro donante, por ejemplo un donante sano en comparación con un donante enfermo, sino también para condrocitos del mismo donante. Además, los condrocitos pueden cambiar en sus propiedades durante el cultivo *ex vivo* de manera que ya no son tan adecuados para implantarse como cuando se aceptan directamente después del aislamiento a partir del donante.

55 [0009] Por lo tanto, sería deseable desarrollar un método por medio del cual se controle la idoneidad de los condrocitos para un trasplante de condrocitos potencialmente exitoso, por ejemplo con criterios que sean indicativos de esto. Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar dicho método o criterios.

60 [0010] Según la presente invención, este objeto se consigue mediante el uso de marcadores o genes marcadores que son adecuados para determinar al menos una de las siguientes -a saber identidad, pureza y potencia de los condrocitos *in vitro*, por medio de las cuales se controla la idoneidad de los condrocitos para un 65

trasplante de condrocitos potencialmente exitoso- y que se seleccionan de al menos uno de los siguientes -FLT-1 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), BSP-2 (sialoproteína ósea 2), colágeno de tipo I, e interleucina (IL)-1beta, -donde se determina la expresión del al menos un marcador.

5 [0011] El objeto se consigue además mediante un método para la determinación de la identidad, pureza y/o potencia de los condrocitos *in vitro*, por medio del cual se controla la idoneidad de los condrocitos para un trasplante de condrocitos potencialmente exitoso, donde al menos uno de los siguientes marcadores se determina en una muestra biológica que comprende condrocitos: FLT-1, BSP-2, colágeno de tipo I, e IL-1beta.

10 [0012] El objeto subyacente la invención se consigue completamente de este modo.

[0013] Al proporcionar los marcadores y el uso de los mismos, es posible por primera vez seleccionar e identificar, de manera selectiva, condrocitos que, respecto a su identidad, pureza y potencia, son óptimos para un trasplante de condrocitos prometedor, es decir, representan una población de condrocitos que, en primer lugar, está suficientemente identificada y es suficientemente pura, y que, en segundo lugar, sigue estando activa en su capacidad para invertir el estado proliferativo transitorio hacia un estado metabólico de manera gradual.

15 [0014] "Determinación" en este caso significa cualquier método genético y/o biotecnológico por medio del cual el/los marcador(es) o la expresión de los mismos se puede identificar en una muestra biológica, más particularmente una muestra que comprende condrocitos.

[0015] Además, "muestra biológica" en este caso significa cualquier muestra que haya sido recogida anteriormente de un sujeto humano, y de la cual se asume que comprende condrocitos. Preferiblemente, la muestra es una muestra articular o una muestra de cartílago, y más preferiblemente una muestra de cartílago o articular procedente de un lugar del cuerpo en el que se debe insertar un implante para tratar el daño en el cartílago, donde los condrocitos presentes en la muestra biológica se evalúan *ex vivo* directamente después de la recogida de la muestra y/o incluso se evalúan después del cultivo *in vitro*.

25 [0016] Los presentes marcadores ofrecen la posibilidad no solo de seleccionar condrocitos con respecto a su identidad anatómica, sino también particularmente de confirmar condrocitos respecto a su modelo genético. En particular, la pureza de los condrocitos que se va a identificar así también es muy importante, ya que asegura que solo se purifiquen y en última instancia se usen condrocitos, en lugar de también, por ejemplo, células endoteliales u osteogénicas, que, conjuntamente, siguen teniendo la capacidad de permitir el desarrollo del hueso ectópico.

30 [0017] Además, el uso novedoso proporcionado asegura también que se usen solo condrocitos que todavía, o de nuevo, son capaces de producir una matriz extracelular, una propiedad clave de los condrocitos que es necesaria para un trasplante de condrocitos exitoso.

35 [0018] Por consiguiente, se entiende que "potencia" significa la capacidad de los condrocitos de reanudar la producción de matriz extracelular cuando las células se implantan en el sitio defectuoso que se va a tratar.

[0019] Los marcadores previstos para este propósito por primera vez por la presente invención son, por lo tanto, una herramienta excelente que asegura un control bueno y suficiente de los condrocitos que se van a usar.

40 [0020] Se otorga preferencia en particular a la determinación de la expresión del marcador mediante el nivel de ARNm, el nivel de proteína y/o mediante una prueba funcional.

[0021] La determinación del nivel de los ARNm y/o de las proteínas que son codificadas por los genes forma parte de las capacidades generales y el conocimiento de un experto en la materia. Los métodos habituales incluyen, por ejemplo, las técnicas Northern blot, Western blot, ELISA, y PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con transcriptasa inversa (cuantitativa), todas las cuales forman parte de las capacidades estándar de un experto en la técnica del campo en cuestión.

45 [0022] En particular, se otorga preferencia a la determinación de la expresión del marcador mediante un nivel de ARNm elevado, un nivel de proteína y/o un nivel de actividad enzimática elevado. El nivel de ARNm elevado se puede determinar o bien en función del tiempo con respecto a una población de condrocitos o bien en relación con otras poblaciones celulares.

50 [0023] Además, se otorga preferencia a que el marcador sea al menos uno de los siguientes -FLT-1, BSP-2, y colágeno de tipo I- y a la determinación de su expresión mediante un nivel de ARNm elevado.

[0024] Esta medida tiene la ventaja que un nivel elevado de los ARNm de FLT-1, BSP-2, colágeno de tipo I permite determinar claramente los condrocitos respecto a su identidad, pureza (BSP-2 y FLT-1) o potencia (colágeno de tipo I). Además de que los inventores de la presente invención hayan descubierto que la cuantificación de ARNm de colágeno de tipo II y de ARNm de agregano permite realizar una afirmación positiva

acerca de la identidad de los condrocitos -hecho que debe usarse según la invención en combinación con la expresión de uno o más de los otros marcadores-, también se ha descubierto que la cuantificación de ARNm de BSP-2 y de ARNm de FLT-1 permite realizar una afirmación positiva acerca de la pureza de los condrocitos o una afirmación negativa acerca de los tipos de células contaminantes, ya que estos dos marcadores son típicos para los tejidos subcondrales.

[0025] "Marcador negativo" en este caso significa que, cuando se descubre una expresión elevada para uno de los genes, los condrocitos son, por ejemplo, no puros (como para los marcadores BSP-2 y FLT-1, por ejemplo); en cambio, "marcador positivo" significa que la expresión elevada de estos marcadores confirma la identidad de los condrocitos.

[0026] Asimismo, se ha observado que la MMP-3 (metaloproteínasa de matriz 3) o el agregano, más particularmente el epítipo 846, son marcadores adecuados y la expresión del marcador se determina mediante un nivel elevado de proteína. En este caso, la ventaja proviene del hecho de que un cambio en la liberación del epítipo 846 de agregano es una indicación del inicio de una rediferenciación y, de este modo, un nivel elevado de este epítipo indica una potencia de funcionamiento. Lo mismo se aplica a la MMP-3, ya que la liberación de MMP-3 es un marcador positivo para la regeneración del cartílago. Este hallazgo se usa en combinación con la expresión de uno o más de los otros marcadores según la invención.

[0027] Mediante la determinación de estos marcadores, es posible aislar ventajosamente condrocitos con respecto a la potencia de los mismos para formar una matriz extracelular.

[0028] Según una forma de realización adicional, se otorga preferencia a la determinación del ARNm de interleucina 1beta (IL-1beta), donde un nivel de ARNm IL-1beta elevado se usa como marcador negativo.

[0029] Como ya se ha mencionado antes, la presente invención también proporciona un método para la determinación de la identidad, pureza y/o potencia de los condrocitos *in vitro*, donde al menos uno de los siguientes marcadores se determina en una muestra biológica que comprende condrocitos: FLT-1, BSP-2, colágeno de tipo I e IL-1beta. Más particularmente, se otorga preferencia a un método que consta de los pasos siguientes: a) aislamiento y, si es necesario, cultivo de condrocitos a partir de una muestra biológica, y b) determinación de la expresión génica de al menos uno de los siguientes marcadores en los condrocitos: FLT-1, BSP-2, colágeno de tipo I e IL-1beta.

[0030] Mientras que la identidad de los condrocitos se puede determinar mediante una expresión génica elevada de colágeno de tipo II y/o agregano, se ha observado que para determinar la pureza de los condrocitos se puede determinar una expresión génica elevada de FLT-1 y/o BSP-2, y para determinar la potencia de los condrocitos se puede determinar una expresión génica elevada de colágeno de tipo I e IL-1beta.

[0031] En el método según la invención, en los condrocitos que están presentes en una muestra biológica, los marcadores en cuestión se determinan respecto a su expresión génica, es decir, si tienen una expresión génica elevada para estos marcadores en comparación con los controles y/o a lo largo del tiempo.

[0032] En cuanto al uso según la invención, se otorga preferencia a la determinación de la expresión génica elevada a través de un nivel de ARNm elevado, un nivel de proteína y/o un nivel de actividad enzimática elevado.

[0033] En particular, se otorga preferencia a la correlación de un nivel elevado de ARNm de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II y/o agregano con la identidad, pureza o potencia de los condrocitos, y en particular a la correlación inversa de un nivel elevado de ARNm de BSP-2 y/o FLT-1 con la pureza de los condrocitos, o a la correlación de un nivel elevado de ARNm de colágeno de tipo I, colágeno de tipo II con la potencia intacta de los condrocitos.

[0034] En otra forma de realización del método, se otorga preferencia a la correlación de un nivel elevado de proteína de agregano, más particularmente mediante la detección del epítipo 846, y/o de MMP-3 con la potencia intacta de los condrocitos.

[0035] Según otra forma de realización del método según la invención, análoga al uso según la invención, un nivel elevado de ARNm de IL-1beta se correlaciona con una potencia reducida de los condrocitos.

[0036] En general, se otorga preferencia a los marcadores que se usan solos o en combinación unos con otros. Aquí, por lo tanto, se puede determinar los marcadores o bien solos respecto a su expresión génica, o bien se puede determinar dos o más o todos, y el resultado de dicha determinación de la expresión génica de los marcadores se puede correlacionar de manera correspondiente con la identidad, pureza y potencia de los condrocitos. Además, estos resultados también se pueden correlacionar con la proporción de ARNm entre el colágeno de tipo I y el colágeno de tipo II para garantizar la determinación correcta de los condrocitos.

[0037] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a los propios marcadores, en concreto para usar para determinar la identidad, pureza y/o potencia de los condrocitos de una muestra biológica, donde el marcador se selecciona de al menos uno de los siguientes: FLT-1, BSP-2, colágeno de tipo I, e IL-1beta.

5 [0038] Se apreciará que las características mencionadas anteriormente y que se van a ilustrar más adelante son concebibles no solo en la combinación especificada en cada caso, sino también solas o en otras combinaciones, sin apartarse del contexto de la presente invención.

10 [0039] La invención se ilustrará con más detalle a continuación mediante las figuras y los ejemplos. En las figuras:

[0040]

15 Fig. 1: muestra un análisis de la expresión génica relativa de los distintos genes marcadores

Fig. 2: muestra la tabla 1: un compendio de los genes marcadores y su uso como marcadores para investigar la identidad, la pureza y la potencia de condrocitos autólogos.

20 **Ejemplo:** Caracterización de un implante autólogo de condrocitos en una matriz tridimensional (por ejemplo, NOVOCART® 3D) e identificación de genes marcadores

25 [0041] Durante la producción de matrices tridimensionales que están cargadas con células para un implante autólogo de condrocitos, es esencial identificar las células "correctas", es decir, los condrocitos, que se han de usar para la colonización. Las características de estas células incluyen -además de la viabilidad, la morfología celular y la actividad proliferativa- más particularmente identidad, pureza y potencia. Para que sea posible investigar estas propiedades de una manera estandarizada y para determinarlas con certeza, se han identificado genes marcadores por medio de los cuales pueden llevarse a cabo estas investigaciones.

30 [0042] Además de la identificación de los genes marcadores, también se investigaron los efectos adversos o efectos secundarios de los implantes en los pacientes, y se realizaron encuestas antes y después del implante.

35 [0043] Un objetivo de las investigaciones también era, por lo tanto, una visión retrospectiva de los resultados tempranos, los efectos secundarios o cambios, más particularmente respecto al dolor, la función y la inflamación, en un grupo de pacientes más grande. Además, se llevaron a cabo más análisis para investigar los efectos de los pacientes individuales, de la producción y de las características de liberación del producto sobre la seguridad y los resultados en los pacientes.

40 [0044] Para investigar a los pacientes, a los que se examinó artroscópicamente según los requisitos de tratamiento con NOVOCART® 3D (TETEC, Reutlingen, véase anteriormente), se extrajeron de dos a tres cilindros de cartílago/hueso de la muesca intercondilar de la articulación afectada. Después de la extracción del hueso, y de cartílago mineralizado, los condrocitos se aislaron mecánicamente y enzimáticamente del material cartilaginoso restante, y se expandieron como un cultivo primario *in vitro* siguiendo las normas de correcta fabricación (NCF).

45 [0045] El implante de NOVOCART® 3D se efectuó de manera rutinaria 21 días después de la artroscopia y la expansión celular. NOVOCART® 3D se administró con una densidad celular media de $1,36 \times 10^6$ células por cm^2 del defecto, con las células aplicadas al soporte después de haber sido cosechadas del cultivo de monoestrato mediante tripsinización. Para cada lote de cultivo de condrocitos individual, la viabilidad de las células se investigó mediante exclusión del azul de tripano, y se realizaron análisis RT-PCR, donde se usaron seis genes marcadores diferentes para investigar la identidad, pureza y potencia de los condrocitos expandidos.

50 [0046] Estos genes marcadores se seleccionaron basándose en experimentos anteriores *in vitro* e *in vivo* con uso de condrocitos articulares humanos para investigar su capacidad para formar cartílago y para evaluar el entorno articular respectivo para la sustitución del cartílago.

55 [0047] Tanto los respectivos cirujanos de los pacientes como los propios pacientes cumplieron formularios de datos apropiados, donde los pacientes no solo proporcionaron datos demográficos básicos, sino que también dieron detalles con respecto a la autoevaluación de los resultados quirúrgicos, tal como, por ejemplo, con respecto al grado de dolor, funcionalidad.

60 [0048] La valoración de los resultados quirúrgicos y los efectos adversos se recopiló y se registró estadísticamente. La encuesta se efectuó en todos los centros clínicos de Alemania donde se trató a los 433 pacientes implantados con NOVOCART® 3D. En general, se registraron los datos de 422 pacientes, de los cuales 140 eran mujeres y 282 eran hombres. La edad media fue de 33,4 años.

65

[0049] Se usaron estadísticas, incluyendo valores de media, desviaciones estándar, intervalos de confianza, para presentar resúmenes de los efectos adversos, de la eficiencia de las operaciones y para presentar las características de los pacientes. Se construyeron pruebas de Chi-cuadrado y modelos de regresión para investigar asociaciones entre las características de producción o de liberación y las cinco valoraciones del resultado quirúrgico de las encuestas a los pacientes: efectos adversos basados en el implante (definidos como el conjunto resumido de fracaso del implante, delaminación, hipertrofia, artrofibrosis, adhesión, condromalacia, infección de la articulación y la presencia de fragmentos osteocondrales (fragmentos de hueso cartilaginoso desprendidos)), repetición de la operación (por el motivo que sea), y cambios con respecto a la referencia en el dolor, función, y grado de inflamación de la articulación afectada.

[0050] Para investigar las características celulares y biomoleculares, la viabilidad de los condrocitos se investigó durante la extracción (% de células vivas), al igual que los niveles de expresión de ARNm de seis genes marcadores diferentes en los condrocitos, a saber FLT-1, BSP-2, colágeno de tipo I/de tipo II, agregano, interleucina 1beta y MMP-3, con respecto a la identidad, pureza y potencia de los condrocitos.

[0051] Con este fin, el ARNm de los marcadores individuales se evaluó en cada caso mediante qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa). Aquí, la expresión de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usó para la normalización de los valores determinados. Después de la expansión *ex vivo* de los condrocitos, el ARNm se aisló de las células y se analizó con respecto a los marcadores particulares. Se observó que la expresión aumentada de colágeno de tipo II en combinación con la expresión aumentada de agregano es un marcador excelente, o una combinación de marcadores excelente, que es prueba de una línea celular de condrocitos adecuada. Además, los marcadores FLT-1 y BSP-2 se identificaron como marcadores negativos, es decir, la expresión aumentada de estos dos genes indica poblaciones de condrocitos impuras. El valor umbral que indicaba una población impura era de menos de 50 copias de ARNm por 1000 células (<0,001/GAPDH). Con respecto a la potencia de los condrocitos que se iban a investigar, los genes marcadores del colágeno de tipo I/colágeno de tipo II, o su proporción, se identificaron como un marcador/una combinación de marcadores adecuada, y para determinar la proporción de colágeno de tipo I/colágeno de tipo II el día 19 después de la expansión *ex vivo* las células se cosecharon y los genes marcadores, como se ha explicado antes, se investigaron mediante qRT-PCR y unos respecto a otros. También es posible determinar la potencia mediante la determinación de la expresión de IL-1beta, donde un valor de IL-1beta aumentado es un marcador negativo, y este hecho, por ejemplo también en combinación con el valor para la proporción de colágeno de tipo I/colágeno de tipo II, se puede usar para la determinación de la potencia.

[0052] El agregano (epítipo 846) y la MMP-3 se identificaron como marcadores adicionales que se pueden usar para la potencia. Ambas proteínas se detectaron mediante ELISA, en los días 4, 19 y 20. La expresión de proteína cuantitativa del epítipo 846 y de la MMP-3, o su nivel elevado, son indicadores importantes de una potencia funcional de los condrocitos.

[0053] La Fig. 1 muestra el análisis de la expresión génica cuando los condrocitos se cosecharon de cultivos monoestrato expandidos. Los datos se obtuvieron de experimentos de PCR según protocolos estándar como se ha descrito anteriormente, antes de que las células fueran sembradas en el material de soporte bifásico.

[0054] En algunos casos, se realizaron biopsias comparativas de pacientes que habían recibido implantes de condrocitos autólogos convencionales o que se sometieron al método NOVOCART® 3D. Estas biopsias se recogieron en suero fisiológico, se fijaron brevemente en paraformaldehído tamponado al 4% y se introdujeron en un soporte de sección congelada (TissueTek), y se mantuvieron a -20°C hasta la producción de las secciones. En cada caso, se produjeron 10 secciones y se tiñeron con hematoxilina eosina (HE) o Safranina O - verde rápido (SafO), o se inmunotifieron con anticuerpos monoclonales primarios para colágenos de tipo I y de tipo II, agregano (anti colágeno de tipo I; 1 mg/ml (ratón monoclonal; especificidad de especies: humano; MP Biomedical * 63170 I-8H5); anti colágeno de tipo II ; 1 mg/ml (ratón monoclonal; especificidad de especies: amplio; estudios de desarrollo Thomas F. Linsenmeyer * II-Il6B3); anti-agregano; 0,75 mg/ml (ratón monoclonal; especificidad de especies: humano/bovino; Acris * SM1353)). La detección se efectuó con anticuerpos secundarios fluorescentes (AffiniPure de cabra conjugado con Cy3, anti-ratón IgG+M; 0,75 mg/ml; (Jackson, Dianova; #115-165-044)).

[0055] Antes del procedimiento quirúrgico, los cirujanos respectivos examinaron al paciente y valoraron los exámenes con respecto al dolor articular, la función y la inflamación en una escala de 1 a 10, donde los valores más altos indicaban un mejor resultado quirúrgico. Los pacientes para los que los resultados de la encuesta se evaluaron preoperatoriamente y postoperatoriamente mostraron mejoras significativas respecto a la referencia ($p < 0,0001$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon).

[0056] Con respecto a la incidencia de los efectos adversos, se descubrió lo siguiente: se dieron fracasos de implante en el 3,1% de la población total de pacientes. En general, los índices registrados para complicaciones basadas en los implantes para la población total de pacientes fueron muy bajos. La delaminación, artrofibrosis e hipertrofia se observaron en el 1,7%, 2,4% y 0,7%, respectivamente.

[0057] Un total de 36 pacientes (8,5%) requirieron una operación de repetición y/o revisión. Los efectos adversos más comunes para los pacientes que requirieron una operación de repetición fueron fracaso de implante (13), delaminación (6), artrofibrosis (7), sinovitis (7), adhesión (5) y dolor (6).

5 [0058] El tamaño de todos los defectos tratados no estaba correlacionado con los efectos adversos. Sin embargo, el cambio en la referencia para la función estaba asociado significativamente a la edad de los pacientes, lo que significa que los pacientes más jóvenes mostraron de media mayores mejoras, $p=0,004$ (datos no mostrados).

10 [0059] Además, los efectos adversos basados en el implante y las operaciones de repetición fueron en su mayoría independientes de la ubicación del defecto primario, con la excepción de los defectos de la rótula.

15 [0060] La evaluación de la asociación entre la clasificación del defecto del cartílago y la incidencia de efectos adversos basados en el implante revelaron que un paciente tenía más probabilidad de padecer efectos adversos cuando el defecto del cartílago se había evaluado como degenerativo ($p=0,005$). En el caso de pacientes con un defecto del cartílago provocado por osteocondrosis disecante, se registraron menos de tales efectos adversos ($p=0,04$).

20 [0061] Durante las evaluaciones clínicas retrospectivas y potenciales con NOVOCART® 3D, los ADNc almacenados de los pacientes se analizaron para determinar simultáneamente los niveles de expresión génica de los marcadores de colágeno de tipo I (Col1), colágeno de tipo II (Col2), agregano (Agg), interleucina 1beta (IL-1b), sialoproteína ósea 2 (BSP-2) y el receptor endotelial del VEGF FLT-1. Estos conjuntos de datos luego se combinaron con los resultados operativos clínicos y se investigaron las asociaciones entre los procesos de producción y las características de liberación del implante, y los resultados clínicos.

25 [0062] El uso adicional del protocolo de rediferenciación para condrocitos sembrados en el soporte bifásico o la crioconservación temporal de las células no se asoció a una incidencia superior de efectos adversos basados en el implante o a diferencias significativas en otros resultados quirúrgicos. Los mismos resultados se observaron para las cantidades de células administradas.

30 [0063] Los resultados de estas investigaciones se muestran en la fig. 2 (tabla 1).

35 [0064] En la tabla de la fig. 2 puede observarse una asociación significativa entre los efectos adversos basados en el implante y los niveles de expresión de los genes marcadores según la invención. Por ejemplo, un nivel de expresión elevado para uno de los marcadores elegidos para la contaminación molecular de los condrocitos (FLT-1) se asoció a efectos adversos basados en el implante ($p=0,02$). Se descubrieron valores umbral respecto a un nivel de expresión elevado de un marcador (colágeno de tipo I) para potencia negativa, así como un nivel de expresión reducido de un marcador de potencia positiva (colágeno de tipo II) (véase también la fig. 2 = tabla 1), lo que muestra que estos marcadores de potencia también son adecuados para controlar la potencia, la pureza y la identidad de los condrocitos que se van a usar en cada caso y que se usan con el soporte bifásico o generalmente en los ACI. En cambio, se descubrió una asociación entre la desaparición del dolor y la coexpresión elevada del marcador de identidad y del marcador de potencia positiva (colágeno de tipo II) para condrocitos.

45 [0065] En resumen, los marcadores identificados para identidad, pureza y potencia son adecuados para la confirmación del fenotipo condrogénico de las células expandidas. Mediante los marcadores, fue posible demostrar que el método usado para producir soportes NOVOCART® 3D es seguro y que la cantidad de células administrada está dentro del margen de eficacia terapéutica. Los marcadores se usaron de la siguiente manera:

50 Colágeno de tipo I e interleucina 1beta: marcadores de potencia negativa; colágeno de tipo II: marcador de potencia positiva; FLT-1; BSP-2: marcadores de pureza negativa; agregano: marcador de identidad positiva.

55 [0066] Además, se identificaron sesgos de umbral para efectos secundarios basados en el implante, y fue posible encontrar su origen tanto en la expresión aumentada del marcador de potencia negativa (colágeno de tipo I) como en la expresión aumentada del marcador de potencia positiva. El marcador de potencia positiva está asociado con el grado condrogénico de diferenciación de los condrocitos expandidos, mientras que el marcador de potencia negativa está asociado con la inflamación local de la articulación, y también con la apoptosis (muerte celular controlada) y un metabolismo más catabólico de los condrocitos. Sin embargo, los niveles de coexpresión aumentada de la identidad y los marcadores de potencia positiva fueron acompañados por un descenso o desaparición del dolor después del implante del NOVOCART® 3D.

60 [0067] En general, estos datos sugieren que tanto la calidad de los condrocitos implantados como el entorno molecular de la articulación concreta pueden influir en el resultado clínico. Usando los nuevos marcadores, por lo tanto, es posible predecir no solo la calidad real de las células y del implante, sino también, en parte, el éxito clínico.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un marcador para la determinación *in vitro* de la identidad, pureza o potencia de condrocitos por medio del cual se comprueba la idoneidad de los condrocitos para un trasplante de condrocitos potencialmente exitoso, **caracterizado por el hecho de que** el marcador se selecciona de al menos uno de los siguiente: IL-1beta, FLT-1, BSP-2, y colágeno de tipo I, donde se determina la expresión del marcador.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** la expresión del marcador se determina mediante el nivel de ARNm, el nivel de proteína y/o mediante un nivel funcional.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** la pureza de los condrocitos se predice usando al menos uno de los marcadores que comprenden FLT-1 y BSP-2, y **de que** la expresión génica aumentada de estos genes se usa como un marcador negativo para la pureza de los condrocitos.
- 20 4. Uso según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** la potencia de los condrocitos se predice mediante la determinación de al menos uno de los marcadores que comprenden IL-1beta y la proporción de colágeno de tipo I/colágeno de tipo II.
- 25 5. Método para la determinación de la identidad, pureza y/o potencia de condrocitos *in vitro* por medio del cual se controla la idoneidad de los condrocitos para un trasplante de condrocitos potencialmente exitoso, que consta de los pasos siguientes:
 a) aislar y, si es necesario, cultivar condrocitos a partir de una muestra biológica, y
 b) determinar la expresión génica de al menos uno de los siguientes marcadores en los condrocitos: FLT-1, IL-1beta, BSP-2, y colágeno de tipo I.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** la pureza de los condrocitos se determina mediante la determinación de la expresión génica de FLT-1 y/o BSP-2, y **de que** la expresión génica aumentada de estos genes se usa como un marcador negativo para la pureza de los condrocitos.
- 35 7. Método según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** la potencia de los condrocitos se determina mediante la determinación de la expresión génica de IL-1beta y la proporción de colágeno de tipo I/colágeno de tipo II.
- 40 8. Método según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** un nivel de ARNm elevado de FLT-1, colágeno de tipo I, y/o BSP-2 está correlacionado con la identidad, pureza o potencia de los condrocitos.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, **caracterizado por el hecho de que** un nivel de ARNm elevado de FLT-1 y/o BSP-2 está correlacionado inversamente con la pureza de los condrocitos.
- 50 10. Método según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado por el hecho de que** un nivel de ARNm elevado de una proporción de colágeno de tipo I/colágeno de tipo II está correlacionado con la potencia intacta de los condrocitos.
- 55 11. Método según la reivindicación 7, **caracterizado por el hecho de que** un nivel de ARNm elevado de IL-1beta está correlacionado con una potencia reducida de los condrocitos.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, **caracterizado por el hecho de que** los marcadores se usan solos o en combinación unos con otros.
13. Uso o método según la reivindicación 12, **caracterizado por el hecho de que** los marcadores se usan en combinación con los marcadores colágeno de tipo II, agrecano y/o MMP-3.
14. Uso o método según la reivindicación 13, **caracterizado por el hecho de que** la expresión de los marcadores colágeno de tipo II, agrecano y/o MMP-3 se determina mediante el nivel de ARNm.

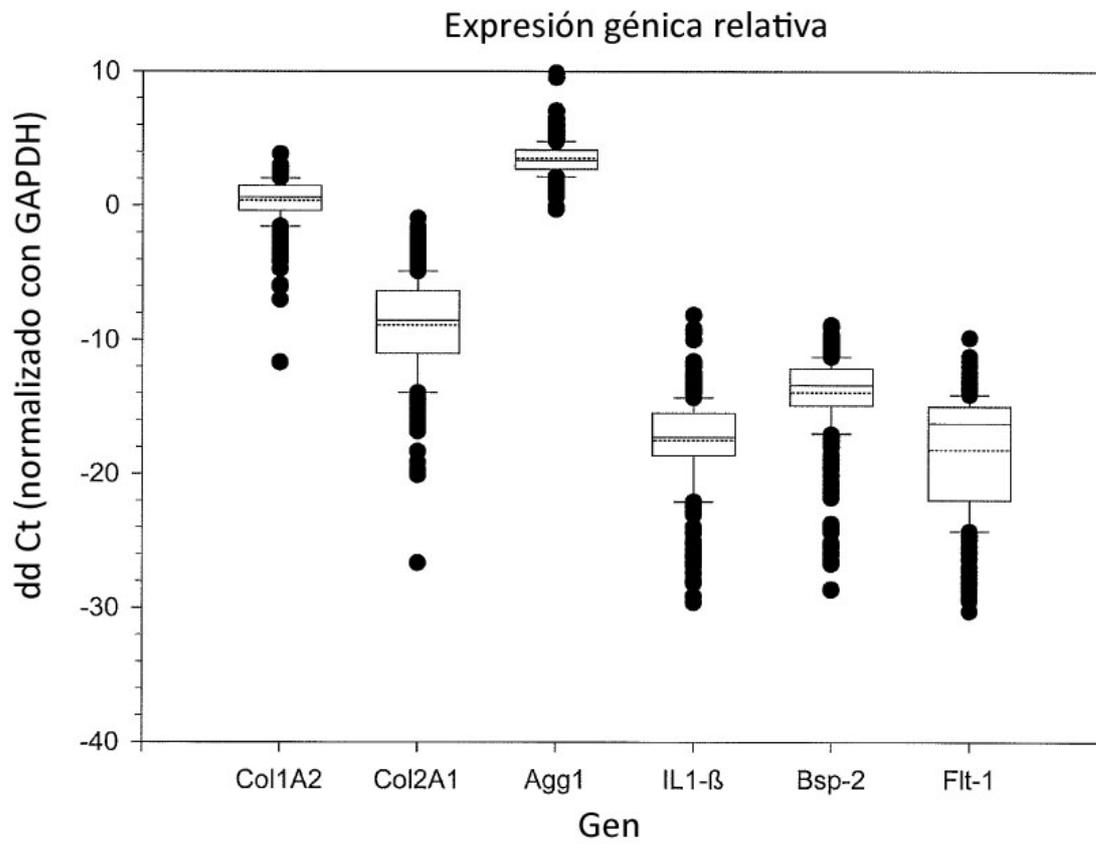


Fig. 1

Covariable	Efectos adversos relacionados con el injerto**	Reoperación (cualquier motivo)	Dolor	Función	Hinchazón
Características de fabricación y liberación del producto					
Protocolo de rediferenciación	0,61	0,74	0,91	0,52	0,26
Células crioconservadas	0,98	0,98	0,59	0,78	0,13
Log 10 número de células	0,30	0,06	0,47	0,37	0,36
Viabilidad de las células al cosecharlas	0,56	0,13	0,55	0,38	0,76
Agregano	0,14	0,44	0,61	0,50	0,62
BSP-2	0,11	0,14	0,76	0,78	0,90
FLT-1	0,02	0,03	0,21	0,67	0,81
Colágeno II	0,08	0,08	0,42	0,90	0,29
Interleucina-1β	0,08	0,20	0,26	0,19	0,24
Colágeno I	0,49	0,70	0,53	0,79	0,27

*Valores P derivados del análisis multivariante de covariantes individuales sobre resultados de interés en presencia de "tiempo desde la intervención quirúrgica". **Definidos como el subconjunto de efectos adversos posiblemente relacionados con el injerto, el "grado de relación" no se recogió en el instrumento de la encuesta

Fig. 2