

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 750**

51 Int. Cl.:

A61K 31/722	(2006.01)	A61K 35/32	(2015.01)
A61K 31/728	(2006.01)		
A61K 31/729	(2006.01)		
A61K 31/737	(2006.01)		
A61K 38/39	(2006.01)		
A61K 47/36	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 31/734	(2006.01)		
A61K 38/36	(2006.01)		
C12N 5/077	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2010 PCT/US2010/042369**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11009106**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10800651 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2453905**

54 Título: **Métodos y composiciones para la condrogénesis in vitro e in vivo**

30 Prioridad:

16.07.2009 US 226237 P
18.09.2009 US 243939 P
27.05.2010 US 349088 P
16.07.2010 US 365308 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.08.2020

73 Titular/es:

LINEAGE CELL THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
2173 Salk Avenue, Suite 200
Carlsbad, CA 92008, US

72 Inventor/es:

WEST, MICHAEL D.;
STERNBERG, HAL y
CHAPMAN, KAREN B.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 778 750 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

Métodos y composiciones para la condrogénesis in vitro e in vivo

Referencia cruzada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119(e) de las siguientes solicitudes de patente provisionales:
 Solicitud Núm. de Serie 61/226.237, titulada "Methods and Compositions Useful for In Vitro and In Vivo
 Chondrogenesis Using Embryonic Progenitor Cell Lines" presentada el 16 de julio de 2009; Solicitud Núm. de Serie
 61/243.939, titulada "Improved Methods of Screening Embryonic Progenitor Cell Lines" presentada el 18 de
 10 septiembre de 2009; Solicitud Núm. de Serie 61/349.088, titulada "Improved Methods of Screening Embryonic
 Progenitor Cell Lines" presentada el 27 de mayo de 2010; y Solicitud Núm. de Serie 61/365.308, titulada "Methods
 and Compositions for In Vitro and In Vivo Chondrogenesis" presentada el 16 de julio de 2010.

Antecedentes

15 La capacidad regenerativa limitada del cartílago limita la capacidad natural del organismo para reparar el daño
 debido a un trauma o una enfermedad degenerativa. Por ejemplo, la osteoartritis (OA) afecta hasta a 70% de las
 personas mayores de 65 años (21 millones de Estadounidenses). La lesión del menisco o del ligamento cruzado
 anterior a menudo deja al paciente en mayor riesgo de artritis. La osteoartritis se caracteriza por una pérdida
 progresiva de cartílago sobre la superficie articular, lo que lleva a una exposición dolorosa del hueso subcondral.
 Después de esta lesión en el cartílago articular, los tejidos humanos muestran poca capacidad de reparación. El
 cartílago naciente que aparece como resultado de una respuesta de reparación innata generalmente es de
 naturaleza fibrosa y, por lo tanto, no es adecuado para la reparación.

20 Se han desarrollado varios regímenes terapéuticos para el tratamiento de sujetos con daño en el cartílago. Los
 ejemplos de estos tratamientos incluyen aquellos que están destinados a desencadenar la producción de cartílago
 en el sujeto utilizando medios mecánicos (p. ej., cirugía de abrasión y microfractura, tal como perforación, cirugía de
 microfractura, condroplastia y esponjialización; tratamientos asistidos por láser, que combinan la eliminación de
 25 cartílago enfermo con la remodelación del cartílago) y terapias que se basan en el trasplante (o injerto) de tejido al
 sitio dañado (p. ej., injerto perióstico, injerto osteocondral (plastia en mosaico), e injerto de pasta de cartílago
 articular). Las tasas de éxito de estas terapias varían y algunas tienen posibles efectos secundarios nocivos,
 incluyendo necrosis tisular, sinovitis reactiva, condrólisis y una aceleración de la degeneración del cartílago articular.

30 Un régimen de tratamiento de cartílago basado en células, conocido como terapia de condrocitos autólogos (ACT),
 implica la eliminación de condrocitos del cartílago, la expansión de las células in vitro y la administración de estas
 células expandidas al paciente con o sin una matriz de soporte (u otras proteínas o proteoglicanos). La terapia ACT
 se complica por la desdiferenciación de los condrocitos articulares humanos cuando se cultivan in vitro, así como por
 la dificultad relativa de volver a diferenciar las células de modo que produzcan una matriz de cartílago abundante en
 el sitio del injerto. Adicionalmente, solamente se puede recolectar una pequeña cantidad de cartílago de ser humano
 35 y, por lo tanto, solamente se puede utilizar una pequeña cantidad de condrocitos para el inicio del cultivo. Por lo
 tanto, existe una dificultad continua en la aplicación de condrocitos humanos aislados a la terapia de trasplante en la
 práctica.

Otra estrategia terapéutica consiste en la utilización de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea
 (hbmMSC). Los estudios clínicos que utilizan una dosis única de hbmMSC (Condrógeno) muestran una reducción
 40 del dolor en comparación con el control de ácido hialurónico (HA). Sin embargo, las células madre mesenquimales
 (MSC) tienen dos obstáculos con respecto a su uso en la regeneración del cartílago. Primero, el uso de las células
 como injerto alogénico es problemático debido a la capacidad proliferativa limitada de las MSC adultas, e incluso si
 las células son capaces de una cierta cantidad de expansión, a menudo pierden relativamente rápido su capacidad
 de formar cartílago. El segundo obstáculo es que las MSC, tales como las MSC derivadas de la médula ósea,
 45 forman condrocitos hipertróficos, caracterizados por altos niveles de expresión de COL10A1 e IHH. El papel de estos
 condrocitos en el desarrollo es reclutar vasos sanguíneos y osteoblastos y después morir. Los condrocitos
 hipertróficos se observan, por ejemplo, en las regiones de la placa de crecimiento de los huesos largos. También se
 observan en el sitio de una fractura ósea, donde juegan de manera similar un papel importante en la formación de
 hueso. Por lo tanto, el uso de MSC en el tratamiento de traumatismos o enfermedades degenerativas del cartílago,
 50 tales como la osteoartritis, ha arrojado resultados mixtos. Además, existen numerosos tipos de cartílago en el
 organismo. El cartílago elástico de la oreja tiene una composición molecular diferente al de la nariz, el esternón, la
 tráquea y las articulaciones que soportan peso.

Por lo tanto, el campo de la medicina regenerativa, particularmente en el campo de la regeneración y reparación del
 cartílago, tiene una gran necesidad de formulaciones celulares que generen cantidades comerciales de diversos
 tipos de condrocitos permanentes, en oposición a los hipertróficos.

Compendio

Los aspectos de la presente invención incluyen métodos y composiciones relacionados con la producción,
 identificación y uso de líneas celulares progenitoras embrionarias que son capaces de experimentar condrogénesis.

Se describen varias líneas celulares condrogénicas ilustrativas derivadas de células madre primordiales. Las líneas celulares condrogénicas descritas en la presente memoria son robustas, pueden expandirse durante > 40 pases, y tienen una pureza específica del sitio, proporcionando así composiciones y métodos para producir diversos tipos de cartílago con composiciones moleculares únicas para su uso en investigación y terapia.

5 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Niveles de inducción de *COL2A1* en líneas sometidas a ensayo por medio de qPCR antes y después de 14 días de condiciones de micromasa condrogénicas.

Figura 2: Se muestra la expresión relativa de los genes relacionados con el cartílago *COL2A1*, *CRTAC1*, *CD74*, (2A) *LECT1*, *IHH* y *LHX8* (2B) en los controles de MSC junto con las líneas de la presente invención en condiciones indiferenciadas y diferenciadas.

Figura 3: Muestra un ejemplo de tinción con Safranina O de células madre de tejido adiposo en comparación con las líneas 4D20.8 en el pase 14 en comparación con las MSC en el pase 6, los días 21 de diferenciación como un sedimento e inmunotinción con controles de isotipo en los sedimentos del día 14 de la línea 4D20.8 y MSC.

Figura 4: Muestra el resultado de la implantación in vivo de 4D20.8 RGD-alginato (Figura 4A), E15 RGD-alginato y SM30 RGD-alginato (Figura 4B).

Figura 5: Muestra imágenes histológicas ilustrativas que muestran una apariencia de tipo condrocito similar a la del cartílago hialino para las líneas celulares 4D20.8 y E15.

Abreviaturas

	AFP	-	Alfa-fetoproteína
20	BMP	-	Proteína Morfogénica Ósea
	BRL	-	Hígado de rata Búfalo
	BSA	-	Albúmina de suero bovino
	CD	-	Cúmulo de Diferenciación
	cGMP	-	Buenas Prácticas de Fabricación Actuales
25	CNS	-	Sistema Nervioso central
	DMEM	-	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
	DMSO	-	Dimetilsulfóxido
	DPBS	-	Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco
	CE	-	Carcinoma embrionario
30	Células EC humano.	-	Células de carcinoma embrionario; las células hEC son células de carcinoma embrionario humano.
	ECM	-	Matriz extracelular
	Células ED	-	Células derivadas de embriones; las células hED son células ED humanas
	EDTA	-	Ácido etilendiaminotetraacético
35	Células EG	-	Células germinales embrionarias; las células hEG son células EG humanas
	Células EP	-	Las células progenitoras embrionarias son células derivadas de células madre primordiales que están más diferenciadas que las células madre primordiales, puesto que ya no muestran marcadores tales como la seropositividad SSEA4, TRA1-60 o TRA-1-81 en el caso de la especie humana, pero no se han diferenciado completamente. Las células progenitoras embrionarias corresponden a las fases embrionarias en oposición a la fase de desarrollo postnatal.
40	Células ES	-	Células madre embrionarias; Las células hES son células ES humanas
	FACS	-	Clasificación de células activadas por fluorescencia
	FBS	-	Suero bovino fetal

ES 2 778 750 T3

	GMP	-	Buenas prácticas de fabricación
	Células hED	-	Células derivadas de embriones humanos
	Células hEG de tejido fetal.	-	Células germinales embrionarias humanas derivadas de células germinales primordiales
5	Células hEP	-	Las células progenitoras embrionarias humanas son células progenitoras embrionarias de la especie humana.
	Células hiPS	-	Las células madre pluripotentes inducidas humanas son células con propiedades similares a las de las células hES obtenidas de células somáticas después de la exposición a factores de transcripción específicos de hES tales como SOX2, KLF4, OCT4, MYC o NANOG, LIN28, OCT4 y SOX2.
10	HSE	-	Los equivalentes de piel humana son mezclas de células y matrices biológicas o sintéticas fabricadas para someter a prueba o para aplicar terapias en la promoción de la reparación de heridas.
	ICM	-	Masa celular interna del embrión en la fase de blastocisto de mamífero.
15	Células iPS	-	Las células madre pluripotentes inducidas son células con propiedades similares a las de las células hES obtenidas a partir de células somáticas después de la exposición a factores de transcripción específicos de ES tales como SOX2, KLF4, OCT4, MYC o NANOG, LIN28, OCT4 y SOX2.
	LOH	-	Pérdida de heterocigosidad
	MEM	-	Medio esencial mínimo
	NT	-	Transferencia Nuclear
	PBS	-	Solución salina tamponada con fosfato
20	Fibroblastos PS	-	Los fibroblastos previos a la cicatrización son fibroblastos derivados de la piel de la piel gestacional temprana o derivados de las células ED que muestran un patrón prenatal de expresión génica en el sentido de que promueven la curación rápida de heridas dérmicas sin formación de cicatrices.
	RA	-	Ácido retinoico
	RFU	-	Unidades de fluorescencia relativa
25	SCNT	-	Transferencia nuclear de células somáticas
	SFM	-	Medio sin suero
	SPF	-	Sin patógenos específicos
	SV40	-	Virus de Simio 40
	Etiqueta	-	Antígeno T grande
30	T-EDTA	-	Tripsina EDTA

Definiciones

El término "tecnología de reprogramación analítica" se refiere a una variedad de métodos para reprogramar el patrón de expresión génica de una célula somática al de un estado más pluripotente, tal como el de una célula iPS, ES, ED, EC o EG, en donde la reprogramación se produce en etapas múltiples y discretas y no se basa simplemente en la transferencia de una célula somática a un ovocito y la activación de ese ovocito (véanse las Solicitudes de Estados Unidos Núm. 60/332,510, presentada el 26 de noviembre de 2001; 10/304.020, presentada el 26 de noviembre de 2002; la Solicitud PCT Núm. PCT/US02/37899, presentada el 26 de noviembre de 2003; la Solicitud de Estados Unidos Núm. 60/705625, presentada el 3 de agosto de 2005; la Solicitud de Estados Unidos Núm. 60/729173, presentada el 20 de agosto de 2005; la Solicitud de Estados Unidos Núm. 60/818813, presentada el 5 de julio de 2006, el documento PCT/US06/30632, presentado el 3 de agosto de 2006.

El término "células de blastómero/mórula" se refiere a células de blastómero o mórula en un embrión de mamífero o células de blastómero o mórula cultivadas in vitro con o sin células adicionales que incluyen derivados diferenciados de esas células.

Los términos "célula que expresa el gen X", "el gen X se expresa en una célula" (o población celular), o sus equivalentes, significan que el análisis de la célula utilizando una plataforma de ensayo específica proporcionó un resultado positivo. Lo contrario también es cierto (es decir, por una célula que no expresa el gen X, o equivalentes,

significa que el análisis de la célula utilizando una plataforma de ensayo específica proporcionó un resultado negativo). Por lo tanto, cualquier resultado de expresión génica descrito en la presente memoria está vinculado a la sonda o sondas específicas empleadas en la plataforma (o plataformas) de ensayo para el gen indicado.

5 El término "línea celular" se refiere a una población de células mortal o inmortal que es capaz de propagarse y expandirse in vitro.

El término "reconstitución celular" se refiere a la transferencia de un núcleo de cromatina al citoplasma celular con el fin de obtener una célula funcional.

El término "clonal" se refiere a una población de células obtenida a partir de la expansión de una célula individual a una población de células todas derivadas de esas células individuales originales y que no contiene otras células.

10 El término "diferenciación de colonias in situ" se refiere a la diferenciación de colonias de células (p. ej., hES, hEG, hiPS, hEC o hED) in situ sin eliminar o desagregar las colonias del recipiente de cultivo en el que las colonias se propagaron como líneas de células madre indiferenciadas. La diferenciación in situ de colonias no utiliza la etapa intermedia de formación de cuerpos embrioides, aunque la formación de cuerpos embrioides u otras técnicas de agregación, tales como el uso del cultivo giratorio, puede seguir al período de diferenciación in situ de colonias.

15 El término "ampolla citoplasmática" se refiere al citoplasma de una célula unida por una membrana plasmática intacta o permeabilizada pero por lo demás intacta, pero que carece de núcleo.

20 El término "células diferenciadas", cuando se utiliza en referencia a células preparadas por los métodos de esta invención a partir de células madre pluripotentes, se refiere a células que tienen un potencial reducido para diferenciarse en comparación con las células madre pluripotentes parentales. Las células diferenciadas de esta invención comprenden células que podrían diferenciarse adicionalmente (es decir, pueden no estar diferenciadas terminalmente).

25 El término "diferenciación directa" se refiere al proceso de diferenciación: células de blastómero, células de mórula, células ICM, células ED o células somáticas reprogramadas a un estado indiferenciado (tal como en el proceso de preparación de células iPS pero antes de que dichas células se hayan purificado en un estado indiferenciado) directamente sin el estado intermedio de propagación de células madre aisladas indiferenciadas tales como células hES como líneas celulares indiferenciadas. Un ejemplo no limitante de diferenciación directa sería el cultivo de un blastocisto humano intacto en cultivo y la obtención de células ED sin la generación de una línea celular ES humana como se describió (Bongso et al, 1994. Human Reproduction 9:2110).

30 El término "células madre embrionarias" (células ES) se refiere a las células que se pueden obtener de la masa celular interna de blastocistos, blastómeros o mórulas que se han sometido a pases en serie como líneas celulares mientras se mantiene un estado indiferenciado (p. ej., expresando antígenos TERT, OCT4, y SSEA y TRA específicos para células ES de la especie). Las células ES se pueden obtener de la fertilización de un óvulo con espermatozoide o ADN, transferencia nuclear, partenogénesis, o mediante la generación de células hES con hemizigosidad u homocigosidad en la región MHC. Mientras que las células ES se han definido históricamente como células capaces de diferenciarse en todos los tipos de células somáticas, así como en la línea germinal cuando se trasplantan a un embrión de preimplantación, los cultivos ES candidatos de muchas especies, incluida la humana, tienen una apariencia más plana en el cultivo y típicamente no contribuyen a la diferenciación de la línea germinal y, por lo tanto, se llaman "células de tipo ES". Se cree comúnmente que las células ES humanas son en realidad "de tipo ES", sin embargo, en esta solicitud los autores de la presente invención utilizarán el término células ES para referirse tanto a las líneas celulares ES como a las de tipo ES.

40 El término "cultivo histotípico" se refiere a células cultivadas que se agregan para crear una estructura tridimensional con una densidad celular similar a la de un tejido tal como ocurre en el cultivo de algunas células sobre una capa de agar o tal como ocurre cuando las células se cultivan en tres dimensiones en un gel de colágeno, esponja u otros polímeros tales como los que se utilizan comúnmente en la ingeniería de tejidos.

45 El término "células derivadas de embriones humanos" ("hED") se refiere a células derivadas de blastómeros, células derivadas de mórula, células derivadas de blastocistos, incluidas las de la masa celular interna, escudo embrionario o epiblasto, u otras células madre totipotentes o pluripotentes del embrión temprano, incluyendo endodermo primitivo, ectodermo, mesodermo y cresta neural y sus derivados hasta un estado de diferenciación que se correlaciona con el equivalente de las primeras ocho semanas de desarrollo humano normal, pero excluyendo las células derivadas de células hES que se han sometido a pases como líneas celulares (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos 7.582.479; 7.217.569; 6.887.706; 6.602.711; 6.280.718; y 5.843.780 de Thomson). Las células hED se pueden obtener de embriones previos a la implantación producidos por la fertilización de un óvulo con espermatozoide o ADN, transferencia nuclear o transferencia de cromatina, un óvulo inducido para formar un partenote a través de partenogénesis, tecnología de reprogramación analítica o por métodos para generar células hES con hemizigosidad u homocigosidad en la región HLA. El término "células germinales embrionarias humanas" (células hEG) se refiere a células madre pluripotentes derivadas de las células germinales primordiales del tejido fetal o células germinales en maduración o maduras, tales como los ovocitos y las células espermatogoniales, que se pueden diferenciar en varios tejidos del organismo. Las células hEG también se pueden obtener de células madre

pluripotentes producidas por medios ginogenéticos o androgenéticos, es decir, métodos en donde las células pluripotentes se obtienen de ovocitos que contienen solamente ADN de origen masculino o femenino y, por lo tanto, comprenderán todo el ADN derivado de la hembra o derivado del macho (véanse las Solicitudes de Estados Unidos núm. 60/161.987, presentada el 28 de octubre de 1999; 09/697.297, presentada el 27 de octubre de 2000; 09/995.659, presentada el 29 de noviembre de 2001; 10/374.512, presentada el 27 de febrero de 2003; solicitud PCT núm. PCT/US/00/29551, presentada el 27 de octubre de 2000.

El término "células madre embrionarias humanas" (células hES) se refiere a células ES humanas.

El término "células iPS humanas" se refiere a células con propiedades similares a las células hES, incluyendo la capacidad de formar las tres capas germinales cuando se trasplantan en ratones inmunocomprometidos en donde dichas células iPS se obtienen de células de diversos linajes de células somáticas después de la exposición a los factores de des-diferenciación, por ejemplo, combinaciones de factores de transcripción específicos de células hES: KLF4, SOX2, MYC y OCT4 o SOX2, OCT4, NANOG y LIN28. Se puede utilizar cualquier combinación conveniente de factores de des-diferenciación para producir células iPS. Dichas células iPS se pueden producir mediante la expresión de estos genes a través de vectores tales como vectores retrovirales, lentivirales o adenovirales como se conoce en la técnica, o mediante la introducción de los factores como proteínas, p. ej., por permeabilización u otras tecnologías. Para las descripciones de tales métodos ilustrativos, véanse: la Solicitud PCT núm. PCT/US2006/030632, presentada el 3 de agosto de 2006; la Solicitud de Estados Unidos Núm. de Serie 11/989.988; la Solicitud PCT PCT/US2000/018063, presentada el 30 de junio de 2000; la Solicitud de Estados Unidos Núm. 09.736.268 presentada en 15 de diciembre de 2000; la Solicitud de Estados Unidos Núm. 10/831.599, presentada el 23 de abril de 2004; y la Publicación de Patente de Estados Unidos 20020142397 (Sol. Núm. de Serie 10/015.824, titulada "Methods for Altering Cell Fate"); Publicación de Patente de Estados Unidos 20050014258 (Sol. Núm. de Serie 10/910.156, titulada "Methods for Altering Cell Fate"); Publicación de Patente de Estados Unidos 20030046722 (Sol. Núm. de Serie 10/032.191, titulada "Methods for cloning mammals using reprogrammed donor chromatin or donor cells"); y Publicación de Patente de Estados Unidos 20060212952 (Sol. Núm. de Serie 11/439,788, titulada "Methods for cloning mammals using reprogrammed donor chromatin or donor cells").

El término "células ICM" se refiere a las células de la masa celular interna de un embrión de mamífero o a las células de la masa celular interna cultivadas in vitro con o sin las células trofodérmicas circundantes.

El término "oligoclonal" se refiere a una población de células que se originó a partir de una pequeña población de células, típicamente 2-1000 células, que parecen compartir características similares, tales como la morfología o la presencia o ausencia de marcadores de diferenciación que difieren de los de otras células en el mismo cultivo. Las células oligoclonales se aíslan de las células que no comparten estas características comunes y se les permite proliferar, generando una población de células que derivan esencialmente de la población original de células similares.

El término "cultivo organotípico" se refiere a células cultivadas que se agregan para crear una estructura tridimensional con una densidad celular similar a la de un tejido, tal como ocurre en el cultivo de algunas células sobre una capa de agar, cultivadas como teratomas en un animal, desarrolladas de otro modo en un sistema de cultivo tridimensional pero en donde dichas células agregadas contienen células de diferentes linajes celulares, tales como, a modo de ejemplos no limitantes, la combinación de queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos, o la combinación de células parenquimales con su correspondiente estroma tisular, o células epiteliales con células mesenquimales.

El término "células madre pluripotentes" se utiliza como sinónimo del término "células madre primordiales" como se define a continuación.

El término "clonal agrupada" se refiere a una población de células obtenida combinando dos o más poblaciones clonales para generar una población de células con una uniformidad de marcadores tales como marcadores de expresión génica, similares a una población clonal, pero no una población en donde todas las células se obtuvieron del mismo clon original. Dichas líneas clonales agrupadas pueden incluir células de un genotipo único o mixto. Las líneas clonales agrupadas son especialmente útiles en los casos en que las líneas clonales se diferencian relativamente temprano o se alteran temprano de manera indeseable en su vida proliferativa.

El término "células madre primordiales" se refiere a células animales capaces de diferenciarse en más de un tipo de célula diferenciada. Tales células incluyen células hES, células de blastómero/mórula y sus células hED derivadas, células hiPS, células hEG, células hEC y células derivadas de adultos que incluyen células madre mesenquimales, células madre neuronales y células madre derivadas de médula ósea. Las células madre primordiales pueden ser de animales no humanos. Las células madre primordiales pueden estar genéticamente modificadas o no genéticamente modificadas. Las células genéticamente modificadas pueden incluir marcadores tales como proteínas fluorescentes para facilitar su identificación in vitro o in vivo.

Descripción detallada

Como se resume anteriormente, los aspectos de la presente invención incluyen métodos y composiciones relacionados con la producción, identificación y uso de líneas celulares progenitoras embrionarias que son capaces

de experimentar condrogénesis.

Antes de describir la presente invención con mayor detalle, se debe entender que esta invención no está limitada a las realizaciones concretas descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones concretas solamente, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Ciertos intervalos se presentan en la presente memoria con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se utiliza en la presente memoria para proporcionar soporte literal al número exacto al que precede, así como para un número que está cercano o próximo al número al que precede el término. Al determinar si un número está cerca o próximo a un número específicamente citado, el número no citado cercano o próximo puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente citado.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales ilustrativos representativos.

Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva revelan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no se debe interpretar como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de la invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Se observa que, como se emplea en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa adicionalmente que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la citación de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes y características discretos. Cualquier método citado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Células Progenitoras Condrogénicas Embrionarias y Métodos de Uso

Los aspectos de la presente invención incluyen métodos y composiciones relacionadas con la producción, identificación y uso de células progenitoras embrionarias que son capaces de experimentar condrogénesis. Un conjunto diverso de líneas celulares clonales que expresan reguladores centrales del mesénquima asociados con el de la extremidad y la articulación, tales como las líneas que expresan *MSX1*, *MSX2*, y *SOX9* con un subconjunto de líneas que expresan altos niveles del marcador específico de la articulación *GDF5* han sido descritos (véase West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308, incluida información complementaria; y Solicitud de Patente de Estados Unidos 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"). Estas líneas purificadas clonalmente son robustas, se pueden expandir a lo largo de > 40 pases mientras mantienen su patrón de expresión génica, no han demostrado tumorigenicidad y tienen un patrón embrionario de expresión génica. Estas líneas proporcionan de ese modo composiciones y métodos para producir diversos tipos de cartílago con composiciones moleculares únicas para su uso en investigación y terapia.

En ciertas realizaciones, el patrón de expresión génica de las células o líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarios indiferenciados de la presente invención no proporciona ninguna indicación de que tengan el potencial de convertirse en condrocitos en las condiciones de cultivo apropiadas. En otras palabras, las células no tienen un patrón de expresión génica indicativo del potencial de desarrollo a condrocitos.

Ciertas líneas celulares progenitoras embrionarias condrogénicas de la presente invención, cuando se inducen en condiciones condrogénicas, son capaces de generar cartílago sin expresar COL10A1 o el gen IHH, que se expresan ambos en MSC en tales condiciones y son marcadores de condrocitos hipertróficos. Los condrocitos hipertróficos proporcionan una matriz temporal que después es invadida por los osteoblastos para producir hueso y, por lo tanto, no es adecuada para ciertos fines terapéuticos (p. ej., cuando se inyectan en la articulación o se trasplantan de otro modo en el cartílago articular, en un esfuerzo por regenerar ese tejido para el tratamiento de traumatismos del cartílago articular, artritis o usos relacionados). Por lo tanto, las líneas celulares de la presente invención tienen importantes diferencias terapéuticas con respecto a otros progenitores de condrocitos que se convierten en condrocitos hipertróficos (p. ej., MSC derivadas de médula ósea).

Las células progenitoras de condrocitos embrionarios ilustrativas según la presente invención son negativas para la expresión de uno, dos, tres, cuatro o todos los siguientes genes: CD74, CD90, CD166, ITGA2 y KCNK2. Cada uno de estos genes es un marcador presente en las células madre mesenquimales (MSC), que actualmente se utilizan en la terapia de reemplazo de cartílago (que se describe más adelante). Por lo tanto, las líneas celulares progenitoras embrionarias condrogénicas de la presente invención tienen patrones de expresión génica que son distintos de los de otras células progenitoras condrogénicas conocidas. En ciertas realizaciones, las células progenitoras embrionarias condrogénicas son adicionalmente negativas para la expresión de genes HOX y PITX1.

A continuación se muestra una lista de líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarios humanos ilustrativas de acuerdo con aspectos de la presente invención y ciertos marcadores de expresión génica de interés (marcadores positivos y negativos). Estas líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarios humanos son capaces de diferenciarse en condroblastos y después en condrocitos que expresan niveles más altos de COL2A1 que los condrocitos articulares humanos (NHAC) cultivados en pases tempranos normales que se sometieron a 18-21 duplicaciones de expansión clonal después del aislamiento de ES humanas o células derivadas de células madre primordiales humanas similares.

Los marcadores de expresión génica de la línea celular MEL2 en el intervalo de P22-28 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *PIP*, *ENPP2*, *DLX5*, *CXADR*, *NPTX2*, *CLDN23*, *SFRP2*, *HSPB3*, *HAND2*, *HSD17B2*, *RCAN2*, *EBF3*, *GPM6B*, *RNF175*, *PPARGC1A*, *RGS16*, *GPM6B*, *SOX17*, *EPHB6*, y *BAPX1*. Los más específicos de estos marcadores que se expresan en la línea celular MEL2 en el intervalo de P22-28 son: *PIP* (ID de la sonda Illumina 4010519), *SOX17* (ID de la sonda Illumina 3610193), *DLX5* (ID de la sonda Illumina 3370767), *GPM6B* (ID de la sonda Illumina 2630279), *RGS16* (ID de la sonda Illumina 1030102), *EPHB6* (ID de la sonda Illumina 7400017) y *HAND2* (ID de la sonda Illumina 4640563) y la expresión negativa de: *TBX15* (ID de la sonda Illumina 6060113), *HOXA2* (ID de la sonda Illumina 2060471), *AJAP1* (ID de Illumina 1300647) y *HOXB2* (ID de la sonda Illumina 3460097).

Los marcadores de expresión génica de la línea celular SM30 en el intervalo de P13-15 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *COL15A1*, *DYSF*, *FST*, *ITGB4*, *TMEM119*, *MSX1*, *NDST3*, *NTRK1*, y *ZIC2*. Los más específicos de estos marcadores de expresión génica que se expresan en la línea celular SM30 en el intervalo de P13-15 son: *NTRK1* (ID de la sonda Illumina 7050113), *NDST3* (ID de la sonda Illumina 670537), *ZIC2* (ID de la sonda Illumina 510368), *ITGB4* (ID de la sonda Illumina 3940132) y la expresión negativa de *PIP* (ID de la sonda Illumina 4010519), *NNAT* (ID de la sonda Illumina 4010709), *HOXA2* (ID de la sonda Illumina 2060471), *TBX15* (ID de la sonda Illumina 6060113) y *HAND2* (ID de la sonda Illumina 4640563).

Los marcadores de expresión génica de la línea celular 7SM0032 en el intervalo de P11-18 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *EGFL6*, *FGF13*, *BEX2*, *CHRNA3*, *NCAM2*, *BBOX1*, y *DLK1*. Los más específicos de estos marcadores de expresión génica que se expresan en 7SM0032 son: *EGFL6* (ID de la sonda Illumina 6330079), *FGF13* (ID de la sonda Illumina 7380239), *CHRNA3* (ID de la sonda Illumina 4280180), *BBOX1* (ID de la sonda Illumina 3400386), y es negativa para la expresión de los genes: *TBX15* (ID de la sonda Illumina 6060113), *NNAT* (ID de la sonda Illumina 4010709), *NTRK1* (ID de la sonda Illumina 7050113), *HAND2* (ID de la sonda Illumina 4640563) y *HOXA2* (ID de la sonda Illumina 2060471).

Los marcadores de expresión génica de la línea celular SK11 en el intervalo de P12-17 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *PITX1*, *TBX15*, *NCAM1*, *COL21A1*, *CYYR1*, *LAMP3*, *MEGF10*, *RNF165* y *GDF10*. Los más específicos de estos marcadores de expresión génica que se expresan en SK11 son: *TBX15* (ID de la sonda Illumina 6060113), *COL21A1* (ID de la sonda Illumina 3440747), *GDF10* (ID de la sonda Illumina 5690095), *PITX1* (ID de la sonda Illumina 2000373), y es negativa para la expresión de los genes: *NNAT* (ID de la sonda Illumina 4010709), *HAND2* (ID de la sonda Illumina 4640563), *FOXF2* (ID de la sonda Illumina 1660470), *FOXP1* (ID de la sonda Illumina 4200458), *HOXA2* (ID de la sonda Illumina 2060471) *HOXB2* (ID de la sonda Illumina 3460097) y *AJAP1* (ID de Illumina 1300647).

5 Los marcadores de expresión génica de la línea celular 7PEND24 en el intervalo de P15-26 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *TBX15*, *CA9*, *SPAG16*, *SUSD2*, *TBXAS1*, *AIF1*, *SLITRK5*, *FOXF2*, *AADAC*, y *FOXG1*. Los más específicos de estos marcadores de expresión génica que se expresan en 7PEND24 son: *AADAC* (ID de la sonda Illumina 6200619), *TBX15* (ID de la sonda Illumina 6060113), *SPAG16* (ID de la sonda Illumina 4390537), *AIF1* (ID de la sonda Illumina 3800047), y es negativa para la expresión de los genes: *NNAT* (ID de la sonda Illumina 4010709), *PITX1* (ID de la sonda Illumina 2000373), *SOX17* (ID de la sonda Illumina 3610193) y *AJAP1* (ID de Illumina 1300647).

10 Los marcadores de expresión génica de la línea celular E15 en el intervalo de P14-15 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *ENPP2*, *ABCA6*, *TBX15*, *BAI3*, *CNTN3*, *TSPYL5*, *GAP43*, *AJAP1*, *CYFIP2*, *HOXA2* (ID de la sonda Illumina 2060471) *HOXB2* (ID de la sonda Illumina 3460097), y *NNAT*. Los más específicos de estos marcadores de expresión génica que se expresan en E15 son: *AJAP1* (ID de la sonda Illumina 1300647), *BAI3* (ID de la sonda Illumina 5690301), *NNAT* (ID de la sonda Illumina 4010709), *ABCA6* (ID de sonda Illumina 5810209), y es negativa para la expresión del gen: *PITX1* (ID de la sonda Illumina 2000373) y es negativa para los marcadores de expresión génica: *HAND2* (ID de la sonda Illumina 4640563) y *SOX17* (ID de la sonda Illumina 3610193).

20 Los marcadores de expresión génica de la línea celular 4D20.8 en el intervalo de P12-17 se pueden determinar comparando el patrón de expresión génica de las células en el estado indiferenciado (Control o Ctrl) como se muestra en la Tabla 1. Los marcadores de expresión génica específicos expresados por la línea celular incluyen los genes: *LHX8*, *HAPLN1*, *LINGO2*, *FGF18*, *GPR126*, *BBOX1*, *ITGA4*, *SHISA3*, y *BARX1* y es negativa para los marcadores de expresión génica: *NNAT* y *HAND2*. Los más específicos de estos marcadores de expresión génica que se expresan en 4D20.8 son: *SHISA3* (ID de sonda Illumina 5670286), *LHX8* (ID de sonda Illumina 2900343), *BARX1* (ID de la sonda Illumina 6450040), *LINGO2* (ID de sonda Illumina 1110291), y es negativa para la expresión de los genes: *PITX1* (ID de la sonda Illumina 2000373), *SOX17* (ID de la sonda Illumina 3610193) y *AJAP1* (ID de Illumina 1300647).

30 Como se señaló anteriormente, las células progenitoras de condrocitos embrionarios de la presente invención encuentran uso en métodos para generar cartílago in vitro o in vivo (a veces denominados en la presente memoria métodos de inducción de condrocitos). Se puede utilizar cualquier método conveniente de inducción de condrocitos, incluyendo aquellos adecuados para uso terapéutico (varios métodos de inducción de condrocitos/generación de cartílago ilustrativos se describen a continuación y en la sección de Ejemplos).

35 Por lo tanto, las células progenitoras de condrocitos embrionarios de la presente invención se pueden utilizar en aplicaciones terapéuticas para la reparación de tejido de cartílago administradas a un sujeto, p. ej., en un portador terapéuticamente aceptable. El sujeto al que se administran las células progenitoras puede tener cualquier afección, lesión o enfermedad para la cual el reemplazo/regeneración de cartílago proporcionaría un beneficio terapéutico. Por ejemplo, si un sujeto tiene daño del cartílago en un sitio específico, p. ej., daño del cartílago articular, la línea celular progenitora embrionaria se puede administrar al sitio del daño del cartílago. Los portadores farmacéuticamente aceptables para tales tratamientos incluyen cualquiera de una amplia variedad de armazones, matrices y similares que encuentran uso como portadores terapéuticos para el trasplante celular. Los ejemplos no limitantes incluyen portadores que contienen una cualquiera o una combinación de los siguientes componentes: Hextend; hialuronano y polímeros del mismo; sulfato de condroitina; colágeno tipo I; colágeno tipo II; colágeno de tipo III, polianhídrido, poliorioéster, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos; alginato agarosa; poloxámeros; fibrina; quitina y quitosano. Los armazones/matrices ilustrativos y su uso en la diferenciación de condrocitos y terapias se describen con más detalle a continuación.

50 En ciertas aplicaciones terapéuticas, la línea celular progenitora embrionaria de condrocitos empleada se puede cultivar en condiciones inductoras de condrocitos antes de administrar las células al sujeto, p. ej., para inducir la producción de cartílago antes del trasplante. Por ejemplo, una forma u otra estructura que contiene cartílago generado a partir de una línea de la presente invención (p. ej., una estructura moldeada) se puede trasplantar a un sujeto, p. ej., en el sitio de pérdida, lesión o degeneración de cartílago. Se puede emplear cualquier condición conveniente de producción de cartílago en tales realizaciones, incluyendo una cualquiera o una combinación de: condiciones de cultivo de condrocitos; impregnación de la línea celular progenitora embrionaria en matrices sintéticas o vehículos de inmovilización reabsorbibles biológicos; y colocación de la línea celular progenitora embrionaria en una estructura moldeada.

55 Los métodos de tratamiento según la presente invención también pueden incluir medir la tasa de generación de cartílago en el sitio deseado (p. ej., medir la reparación o reemplazo del cartílago dañado) en uno o más puntos temporales después del trasplante, así como obtener información sobre el rendimiento del cartílago recién formado en el sujeto. Los parámetros medidos pueden incluir la supervivencia, localización y número de células administradas presentes en el sitio de trasplante en el paciente. El grado de injerto o reconstitución celular se puede determinar utilizando cualquiera de una variedad de técnicas de exploración, p. ej., tomografía axial computarizada (CAT o CT), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) o tomografía de emisión de positrones (PET).

La integración funcional de las células trasplantadas de acuerdo con la invención en un sujeto se puede evaluar examinando la restauración de la función que estaba dañada o enferma, por ejemplo, la restauración de la articulación o el aumento de la función. El injerto de trasplante de células, la localización y la supervivencia también se pueden realizar retirando el tejido diana y examinándolo visualmente o con un microscopio (p. ej., en el análisis post mortem).

Cartílago Obtenido Mediante Ingeniería Tisular

Tres tipos de cartílago están presentes en un mamífero e incluyen: cartílago hialino; fibrocartílago y cartílago elástico. El cartílago hialino consiste en una masa grumosa que tiene una consistencia firme y elástica, es translúcida y es de color azul perlado. El cartílago hialino se encuentra predominantemente en las superficies articulares de las articulaciones móviles. También se encuentra en placas epifisarias, cartílago costal, cartílago traqueal, cartílago bronquial y cartílago nasal. El fibrocartílago es esencialmente el mismo que el cartílago hialino, excepto que contiene fibrillas de colágeno tipo I que añaden resistencia a la tracción al cartílago. Las fibras de colágeno están dispuestas en haces, con las células de cartílago ubicadas entre los haces. El fibrocartílago se encuentra comúnmente en el anillo fibroso del disco intervertebral, las inserciones tendinosas y ligamentosas, los meniscos, la sínfisis del pubis y las inserciones de las cápsulas articulares. El cartílago elástico también es similar al cartílago hialino, excepto que contiene fibras de elastina. Es más opaco que el cartílago hialino y es más flexible y maleable. Estas características se definen en parte por las fibras elásticas incrustadas en la matriz del cartílago. Típicamente, el cartílago elástico está presente en la pinna de las orejas, la epiglotis y la laringe.

En ciertas realizaciones, las células productoras de cartílago de la presente invención se emplean en aplicaciones terapéuticas para reparar, reemplazar o mejorar el tejido de cartílago (p. ej., cartílago dañado) en un sujeto (p. ej., un mamífero, p. ej., un paciente humano). El cartílago se puede generar in vitro seguido de trasplante al sitio afectado o, en ciertas realizaciones, los condrocitos se pueden trasplantar (p. ej., dentro de una matriz o armazón) para producir cartílago en el sitio deseado en el sujeto. Se han descrito varias terapias que emplean células productoras de cartílago (o condrocitos), algunas de las cuales se resumen a continuación.

En ciertas realizaciones, las matrices sintéticas o los vehículos de inmovilización reabsorbibles biológicos (a veces denominados "armazones" o "matrices") se pueden impregnar con células productoras de cartílago de la presente invención. Hasta la fecha se ha utilizado una variedad de matrices portadoras sintéticas que incluyen: geles de colágeno tridimensionales (Patente de Estados Unidos Núm. 4.846.835; Nishimoto (1990) Med. J. Kinki University 15; 75-86; Nixon et al. (1993) Am. J. Vet. Res. 54:349-356; Wakitani et al. (1989) J. Bone Joint Surg. 71B:74-80; Yasui (1989) J. Jpn. Ortho. Assoc. 63:529-538); geles reconstituidos de fibrina-trombina (Patentes de Estados Unidos Núm. 4.642.120; 5.053.050 y 4.904.259); matrices de polímeros sintéticos que contienen polianhídrido, poliortoéster, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos (Patente de Estados Unidos Núm. 5.041.138); y polímeros con una base de ácido hialurónico (Robinson et al. (1990) Calcif. Tissue Int. 46:246-253). Algunos de estos armazones y matrices se están utilizando (o se están sometiendo a una prueba) para la reparación terapéutica del cartílago, incluyendo las matrices de colágeno tipo 1 (p. ej., Atelocollagen de Koken Co Ltd, Tokio, Japón); armazones de bicapa de colágeno tipo I y III (p. ej., de Verigen, Leverkusen, Alemania); armazones de colágeno (p. ej., Implantación de Condrocitos Autólogos Cubiertos (CACI) y sistemas de implantación de condrocitos autólogos inducidos por matriz (MACI) (ACI-Maix™) de Matricel, Hezzenrath, Alemania); bicapa de colágeno porcino tipo I/tipo III (p. ej., ChondroGide® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suiza); Matrices de Gel de Colágeno 3D (p. ej., como se emplea en CaReS® de BioRegioSTERN, Friedrichstraße, Stuttgart y Arthro Kinetics Inc, Boston, MA); armazón de hialuronano, p. ej., derivado esterificado (éster bencílico) de polímero biodegradable con una base de hialuronano (p. ej., Hyaff®-11 de Fida Advanced Biopolymers Laboratories, Abano Terme, Italia); copolímero de PGA/PLA y armazón de polidioxanona, p. ej., una malla biodegradable porosa cargada de gel (p. ej., como se emplea en Bio-Seed-C de Biotissue Technologies, Friburgo, Alemania); armazones sólidos con matriz de agarosa-alginato (p. ej., Cartipatch® de TBF Tissue Engineering, MIONS, FRANCIA); bifásico, armazones de colágeno-condroitin sulfato tridimensionales (p. ej., NOVOCART™ 3D de TETEC, Reutlingen, Alemania).

Las células productoras de cartílago de la presente invención se pueden emplear en la reconstrucción de cartílago como se describe en Methods of Tissue Engineering (2002), editado por Anthony Atala y Robert P. Lanza y publicado por Academic Press (Londres), (véanse, p. ej., las páginas 1027 a 1039). Como se describe allí, las células productoras de cartílago se pueden colocar en una estructura moldeada (p. ej., mediante moldeado por inyección) y trasplantarse a un animal. Con el tiempo, el cartílago producido por las células productoras de cartílago reemplazará la estructura moldeada, produciendo así una estructura de cartílago formada (es decir, con la forma de la estructura moldeada inicial). Los materiales de molde ilustrativos para la estructura moldeada incluyen hidrogeles (p. ej., alginato, agarosa, poloxámeros (Pluronic)) y materiales naturales (p. ej., colágeno tipo I, colágeno tipo II y fibrina).

En ciertas realizaciones, las células productoras de cartílago de la presente invención se pueden cultivar in vitro para formar un material de cartílago sintético (o de tipo cartílago). El cartílago resultante se puede implantar posteriormente en un sujeto en el sitio del defecto del cartílago. Este tipo de enfoque tiene la ventaja de que el desarrollo del material de cartílago sintético se puede controlar antes de la implantación. Además, el cartílago resultante se puede caracterizar bioquímicamente y morfológicamente antes de la implantación. Se han desarrollado dos procedimientos generales para cultivar cartílago sintético in vitro. Estos incluyen el crecimiento de células

productoras de cartílago, ya sea de manera dependiente del anclaje o independiente del anclaje.

En la manera independiente del anclaje, las células productoras de cartílago se pueden cultivar como colonias dentro de un gel de agarosa. Véanse por ejemplo: Benya et al. (1982) Cell 30:215-224; Aydlotte et al. (1990) en Methods and Cartilage Research Capítulo 23: pág. 90-92; Aulthouse et al. (1989) In Vitro Cellular and Developmental Biology 25:659-668; Delbruck et al. (1986) Connective Tissue Res. 15:1550-172; y Bohme et al. (1992) J. Cell Biol. 116:1035-1042. Alternativamente, en otro método independiente del anclaje, las células productoras de cartílago se pueden cultivar como colonias en cultivo en suspensión. Véanse por ejemplo, Franchimont et al. (1989) J. Rheumatol. 16:5-9; y Bassleer et al. (1990) en "Methods and Cartilage Research", Academic Press Ltd., Capítulo 24.

En el método dependiente del anclaje, los cultivos primarios de células productoras de cartílago se pueden cultivar como monocapas ancladas a la superficie de un matraz de cultivo celular. Véase por ejemplo: Yoshihashi (1983) J. Jpn. Ortho. Assoc. 58:629-641; y Patente de Estados Unidos Núm. 4.356.261.

En ciertas realizaciones, una terapia de cartílago de la invención incluye las descritas en las Patentes de Estados Unidos 5.723.331 y 5.786.217 (titulado "Methods and compositions for the repair of articular cartilage defects in mammals". Estas patentes describen métodos para preparar in vitro un parche de cartílago sintético para la reparación de un defecto del cartílago. Cuando se emplean las células productoras de cartílago de la presente invención, los métodos incluyen las etapas de: (1) siembra de células productoras de cartílago de la presente invención en un pocillo preformado que tiene una superficie adhesiva celular que contacta con las células, y (2) cultivo de las células productoras de cartílago de la presente invención en el pocillo durante un tiempo suficiente para permitir que las células secreten una matriz extracelular, formando así un parche tridimensional de cartílago sintético de múltiples capas. El cartílago sintético resultante (p. ej., cartílago articular sintético), contiene células productoras de cartílago de la presente invención dispersas dentro de una matriz extracelular secretada y producida endógenamente. El parche de cartílago sintético resultante se puede utilizar posteriormente para la reparación (o reemplazo) de un defecto del cartílago en un sujeto (p. ej., un mamífero).

Como otro ejemplo, las células condrogénicas de la presente invención se pueden encapsular en matrices tridimensionales, p. ej., hidrogeles. Se pueden encontrar métodos de encapsulación de hidrogel ilustrativos en "Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells in Three-Dimensional Hydrogel Culture", Nathaniel S. Hwang, Shyni Varghese y Jennifer Elisseeff, Methods in Molecular Biology, vol. 407: pág. 351 Stem cells Assays. Los procedimientos ilustrativos descritos allí se resumen a continuación.

A. Fotoencapsulación de progenitores de condrocitos en PEGDA o hidrogeles de PEGDA modificados con RGD

1. Preparar la solución de polímero PEGDA, diacrilato de poli(etilenglicol) (PEGDA; Núm. de Cat. 01010F12, Nektar, Huntsville, AL, EE.UU.) o solución de polímero PEGDA modificado con RGD mezclando el macrómero al 10% (p/v) en PBS estéril. Proteger la solución de polímero de la luz y posibilitar el almacenamiento a -20°C durante 3 meses.

2. Disolver 100 mg de fotoiniciador, Igracure 2959 (Producto Núm. 1706673, Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, NY, EE.UU.), en 1 ml de etanol esterilizado por filtración al 70%.

3. Colocar la solución de PEGDA y la solución del fotoiniciador sobre hielo picado hasta su uso.

5. Añadir el fotoiniciador a la solución de PEGDA y mezclar bien para obtener una concentración final de 0,05% (p/v). Asegurarse de que el iniciador se mezcle muy bien con la solución de macrómero (5 ul de solución de fotoiniciador/ml de solución de polímero).

6. Suspender las células (20-30 millones/ml) dentro de la solución precursora (polímero con fotoiniciador) añadiendo la solución de PEGDA que contiene el fotoiniciador en un sedimento celular y mezclar bien utilizando una pipeta sin crear burbujas.

7. Transferir 100_1 de solución de polímero con células progenitoras a un molde cilíndrico y exponer a onda larga, luz de 365 nm a 4,4 mW/cm² (Glowmark System, Upper Saddle River, NJ, EE.UU.), durante 5 minutos para completar la formación de gel.

8. Retirar de su molde los hidrogeles cargados de células progenitoras de condrocitos "solidificados" y transferirlos a placas de 12 pocillos con medio condrogénico que contiene 10 ng/ml de TGF-β1 e incubar a 37°C y 5% de CO₂. Cambiar el medio cada 2-3 días.

B. Encapsulación de progenitores de condrocitos en Hidrogel de Alginato

1. Recoger las células condrogénicas en un tubo cónico de 50 ml y centrifugar durante 5 minutos a 145 g. Retirar el sobrenadante y añadir las soluciones de polímero de alginato o de polímero de alginato modificado con RGD y suspender suavemente las células utilizando un Pipetteman (P-1000). Evite hacer burbujas en el líquido.

2. Tomar una de las bandejas de inserto de cultivo de tejidos Transwell y llenar el pocillo con 1 ml de

solución de cloruro de calcio.

3. Con un Pipetteman, añadir 100 µl de la suspensión celular a los insertos de cultivo de tejidos. Después de llenar todos los insertos, utilizar unas pinzas estériles para transferir los insertos a los pocillos que contienen solución de cloruro de calcio. Incubarlos a 37°C durante 20 min en 5% de CO₂.

5 4. Retirar las construcciones de los insertos utilizando un movimiento de palanca suave con una espátula delgada y curva. Colocar una construcción en cada pocillo e incubar a 37°C con 5% de CO₂.

Las células progenitoras de condrocitos encapsuladas en hidrogel se pueden cultivar in vitro o se pueden trasplantar in vivo a un sitio para el que se desea la producción de cartílago, p. ej., para reemplazar el cartílago dañado o perdido.

10 Glycosan Biosystems también proporciona hidrogeles para cultivos celulares tridimensionales que se utilizan en cultivos, armazones de ingeniería de tejidos y terapia celular. Esta compañía proporciona, por ejemplo, hidrogeles con una base de hialuronano, con una base de PEG y con una base de colágeno para su uso en el crecimiento y diferenciación celular in vitro e in vivo.

15 Un sistema de hidrogel ilustrativo de Glycosan Biosystems es HyStem-CSS™, que permite la recuperación suave y rápida de células encapsuladas en cultivos tridimensionales. HyStem-CSS utiliza un nuevo agente de entrecruzamiento, PEGSSDA, que permite la licuefacción del hidrogel HyStem-C utilizando solo pequeñas cantidades de agente reductor. Los componentes HyStem-CSS™ reconstituidos permanecen líquidos a una temperatura de 15 a 37°C. El hidrogel se forma cuando el agente de entrecruzamiento, PEGSSDA, se añade a una mezcla de Glycosil™ (hialuronano modificado con tiol) y Gelin-S™ (gelatina modificada con tiol). La gelificación se produce aproximadamente veinte minutos después de que se mezclan los tres componentes. Ninguna etapa depende de bajas temperaturas o bajo pH. La dilución de los componentes con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de cultivo celular puede aumentar el tiempo de gelificación. El hidrogel resultante se puede disolver en 40 ml de acetil-L-cisteína (agente reductor) en menos de 2 horas a 37°C.

25 Según el protocolo del fabricante, los hidrogeles HyStem-CSS (3 x 2,5 ml = 7,5 mL) se preparan de la siguiente manera:

Permitir que los viales HyStem, Gelin-S, PEGSSDA y Agua DG alcancen la temperatura ambiente.

En condiciones asépticas, utilizando una jeringa y una aguja, añadir 1,0 mL de Agua DG al vial de HyStem. Repetir para el vial de Gelin-S.

30 Colocar ambos viales horizontalmente en un agitador basculante o un agitador de balanceo oscilante. Los sólidos tardarán <30 minutos en disolverse por completo. Calentando a no más de 37°C y/o sometiendo a vórtice suavemente se acelerará la disolución, las soluciones serán claras y ligeramente viscosas.

En condiciones asépticas, utilizando una jeringa y una aguja, añadir 0,5 mL de Agua DG al vial de PEGSSDA. Invertir varias veces para disolver.

35 Tan pronto como sea posible, pero en el plazo de 2 horas de la elaboración de las soluciones, mezclar asépticamente volúmenes iguales de HyStem y Gelin-S™. Para mezclar, pipetear arriba y abajo lentamente para evitar atrapar burbujas de aire.

Resuspender el sedimento celular en 2,0 mL de HyStem + Gelin-S. Pipetear arriba y abajo para mezclar.

Para formar el hidrogel, añadir PEGSSDA a la mezcla de HyStem + Gelin-S a una razón en volumen 1:4 (0,5 mL PEGSSDA™ con respecto a 2,0 mL de HyStem + Gelin-S) y mezclar con una pipeta.

40 Permitir que la solución reaccione durante 10 minutos y después mezclar nuevamente con una pipeta para asegurar una distribución uniforme de las células. La gelificación se producirá en ~10 a 20 minutos.

45 Otro almacén ilustrativo que se utiliza en aplicaciones de condrogénesis son los tejidos descelularizados, por ejemplo de fuentes cadavéricas, p. ej., tejido cadavérico humano. (Véase, p. ej., Minehara et al., "A new technique for seeding chondrocytes onto solvent-preserved human meniscus using the chemokinetic effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2". Cell Tissue Bank. 17 de junio de 2010. [Epub antes de la impresión]; Yang et al. "A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Biomaterials. Mayo de 2008; 29(15):2378-87; y Stapleton et al., "Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering". Tissue Eng Parte A. Abril de 2008;14(4):505-18.

50 Por ejemplo, Minehara et al. describen una técnica de siembra de células quimiotácticas que utiliza meniscos humanos de cadáveres preservados en disolvente y un agente quimiotáctico de condrocitos. Minehara demuestra que rhBMP-2 (a 10 ng/ml) puede inducir la migración de los condrocitos a un menisco humano descelularizado. Minehara et al. mostraron que después de una incubación de 3 semanas, la matriz extracelular cartilaginosa recién

formada fue sintetizada por los condrocitos migrados en todo el menisco, hasta una profundidad de 3 mm.

Inyección directa de células para conferir condrogénesis in situ

La inyección directa de células, tales como las líneas celulares 4D20.8, MEL2, 7SM0032, SM30, SK11, 7PEND24 o E15, o células humanas o animales con los mismos marcadores o marcadores análogos u otras células de la presente invención, también tiene utilidad terapéutica similar a la referida anteriormente con MSC derivadas de médula ósea (Condrogéno) en adultos. Los pacientes se someten a meniscectomía seguida de una sola inyección de ácido hialurónico (HA) o una dosis baja (50 millones de células) o una dosis alta (150 millones de células) de MSC. Se realiza un seguimiento de los pacientes para determinar la seguridad y la eficacia preliminar adicional en forma de dolor, daño de cartílago y reparación de tejidos durante dos años. Se utiliza la MRI no invasiva para examinar el estado del menisco y el cartílago. En pacientes con osteoartritis (OA) en el momento de la cirugía, se observó una reducción estadísticamente significativa de 20 mm en el dolor, medida por la escala analógica visual (VAS), en pacientes que recibieron una inyección única de MSC sobre pacientes que recibieron una inyección del control, HA, al año (MSC 48 mm vs. Control 28 mm, $p = 0,05$). La reducción del dolor aumentó aún más a 37 mm con cambios osteoartíticos más severos en la articulación del paciente ($p = 0,004$, MSC 56 mm vs. Control 19 mm). A modo de comparación, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) aprobó los tratamientos disponibles actualmente para la OA, tales como el HA, basándose en las mejoras de 9-23 mm sobre el placebo. El método de análisis de volumen de MRI se consideró inadecuado para el análisis computacional debido al alto nivel de variabilidad observado entre las lecturas. Como resultado, no se puede realizar una evaluación significativa de la regeneración del menisco. Los efectos beneficiosos de las MSC adultas también se observaron en las medidas físicas de la afección articular. Se notificaron cambios óseos asociados con la osteoartritis, tales como esclerosis subcrónica y formación de osteofitos, en 21% de los pacientes que recibieron el control, pero solo en 6% de los pacientes tratados con MSC. También hubo un efecto positivo de dosis-respuesta. Al año, la mejoría en el dolor con respecto al valor inicial, antes de la cirugía para extirpar el menisco dañado, fue de 56 mm para dosis altas de MSC, 26 mm para dosis bajas y 19 mm para el control. La terapia basada en células para la articulación se beneficiaría de las tecnologías para generar células madre específicas de la articulación y específicas del paciente, células con una mejor capacidad de regenerar tejidos de la articulación, células con mejor capacidad de aumento y criopreservación. La presente invención proporciona líneas celulares que expresan *SOX9*, *MSX1*, y *MSX2* adecuadas para la producción a escala industrial.

Métodos para la Producción de Líneas Celulares Progenitoras Embrionarias

Además de los métodos descritos a continuación, los métodos que encuentran uso en la producción y el uso de las líneas celulares descritas en la presente memoria se pueden encontrar en lo siguiente: Publicación de Patente de Estados Unidos 20080070303, titulada "Methods to accelerate the isolation of novel cell strains from pluripotent stem cells and cells obtained thereby"; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. de Serie 61/226.237 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods and Compositions Useful for In Vitro and In Vivo Chondrogenesis Using Embryonic Progenitor Cell Lines"; y Solicitud PCT PCT/US2006/013519, presentada el 11 de abril de 2006, titulada "NOVEL USES OF CELLS WITH PRENATAL PATTERNS OF GENE EXPRESSION".

Si bien los siguientes métodos describen la producción de líneas celulares progenitoras embrionarias a partir de células hES, se pueden emplear otras células madre primordiales, p. ej., células madre primordiales de seres humanos o animales no humanos.

Cultivo de células hES y generación de cultivos candidato

Las líneas de células hES de referencia utilizadas se describieron previamente como H9 (Institutos Nacionales de Salud registrados como WA09) y la línea (MA03) derivada de Advanced Cell Technology (West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308). Las células hES se cultivaron rutinariamente en medio hES (KO-DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1X aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Carlsbad, CA), IX Glutamax-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), beta-mercaptoetanol 55 uM (Invitrogen, Carlsbad, CA), Reemplazo de Suero Knock-Out al 8% (Invitrogen, Carlsbad, CA), Plasmanate al 8%, 10 ng/ml de LIF (Millipore, Billerica, MA), 4 ng/ml de bFGF (Millipore, Billerica, MA), 50 unidades/ml de Penicilina - 50 unidades/ml de Estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las líneas de células hES se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 10% de CO₂ y 5% de O₂ sobre fibroblastos embrionarios de ratón tratados con Mitomicina-C (MEF) y pasados por tripsinización o selección manual periódica de colonias. Para la producción de progenitores embrionarios clonales, las células hES se colocaron en placas a 500-10.000 células por placa de 15 cm y después se diferenciaron bajo un protocolo de dos etapas, la primera etapa fue la diferenciación de células hES en una variedad de condiciones para producir diversos cultivos heterogéneos de células llamados "cultivos candidato". La generación de cultivos candidato se realizó con células hES adherentes cultivadas sobre MEF (diferenciación de colonias in situ) o con cuerpos embrioides (EB) derivados de hES. Para los experimentos de diferenciación in situ de colonias, se permitió que las células hES crecieran hasta la confluencia y se diferenciaron por una variedad de métodos (como se describe en la Tabla I Complementaria de West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308. A modo de ejemplo no limitante, en el caso de la diferenciación in situ de colonias en DMEM con FCS al 10%, el medio de cultivo se aspiró de cultivos de colonias de

células hES en alimentadores de ratón, y los medios se reemplazaron por medio DMEM que contenía FBS al 10% para la diferenciación y después de varios períodos de tiempo (1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 días en medio de diferenciación). Las células se disociaron a continuación con tripsina al 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron en placa en matraces de 150 cm² para su expansión. Las células candidatas de cada punto temporal en los matraces de 150 cm² se cultivaron en placa para su clonación y expansión como se describe a continuación. Para los experimentos de diferenciación con EB, se trataron cultivos confluentes de hES durante 15 minutos a 37°C con 1 mg/ml de Colagenasa IV (en DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) para liberar las colonias. Las colonias desprendidas, intactas se rasparon y se recogieron por centrifugación (150xg durante 5 minutos), se resuspendieron en medio de diferenciación descrito en la Tabla Complementaria I (de West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad) y se transfirieron a un solo pocillo de una placa de Unión Ultra Baja de 6 pocillos (Corning, distribuida por Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) que contenía el mismo medio de diferenciación. Se permitió que los EB se diferenciaron, dependiendo del experimento, de 4 a 7 días y los EB diferenciados se disociaron con tripsina al 0,25%, se cultivaron en placas de 6 pocillos que contenían diversos medios de expansión. Se permite que los cultivos candidatos en las placas de 6 pocillos crezcan hasta la confluencia y se cultivan en placa para clonación y expansión como se describe a continuación.

Aislamiento y expansión de líneas celulares clonales

Los cultivos de células candidatas parcialmente diferenciados descritos anteriormente se disociaron con tripsina al 0,25% a células individuales y se cultivaron en placa sobre placas duplicadas recubiertas de gelatina de 15 cm a densidades de clonación de aproximadamente 500 y/o 1.000 y/o 2.000 y/o 5.000 células por placa para una diferenciación y expansión adicionales en una variedad de medios de crecimiento que se muestran en la Tabla Complementaria I (de West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308. Las células de densidad clonal se dejaron crecer, sin perturbar, durante 10-14 días y las colonias que se desarrollaron se identificaron y recolectaron con cilindros de clonación y tripsina utilizando técnicas convencionales. Las colonias clonadas se transfirieron a placas de 24 pocillos recubiertas de gelatina para su expansión. A medida que los clones se volvían confluentes en las placas de 24 pocillos (pero sin dejar que las células permanecieran en confluencia durante más de 2 días), se expandieron secuencialmente a 12 pocillos, 6 pocillos, matraz T-25, matraz T-75, matraces T-150 o T-225 y, finalmente, frascos rodantes. A las líneas celulares clonales que se expandían a la fase de frasco rodante se les asignó un número de identificación ACTC único, se fotografiaron y se criopreservaron en alícuotas para su uso posterior. Una vez que las células alcanzaron una placa de 6 pocillos confluyente, se pasaron a un matraz T-25 y se eliminó una fracción de las células (5×10^5) para colocarlas en una placa gelatinizada de 6 cm para el análisis del perfil de expresión génica. Alternativamente, algunas células se pasaron primero a matraces T-225, después una fracción de las células (5×10^5) se eliminaron para colocarlas en una placa gelatinizada de 6 cm para el análisis del perfil de expresión génica. Por lo tanto, se determinó que las duplicaciones de población que habían sufrido las células eran 18-21 PD. Después de la eliminación de los clones celulares de las placas de clonación, las colonias restantes se visualizaron por tinción con Cristal Violeta (Sigma HT9132-1L) en etanol al 100% según las instrucciones del fabricante. Los medios de cultivo celular utilizados en los experimentos incluyen: medio basal de células musculares lisas (Núm. de Cat. C-22062B) y suplemento de crecimiento (Núm. de Cat. C-39267), medio basal del músculo esquelético (Núm. de Cat. C-22060B) y suplemento de crecimiento (Núm. de Cat. C-39365), medio basal de células endoteliales (Núm. de Cat. C-22221) y suplemento de crecimiento (Núm. de Cat. C-39221), medio basal de melanocitos (Núm. de Cat. C-24010B) y suplemento de crecimiento (Núm. de Cat. C-39415) obtenidos de PromoCell GmbH (Heidelberg, Alemania). Epi-Life, medio libre de calcio/libre de rojo fenol (Núm. de Cat. M-EPIcf/PRF-500) y suplemento de crecimiento con bajo contenido de suero (Núm. de Cat. S-003-10) se adquirieron de Cascade Biologics (Portland, Oregón). El medio basal Mesencult (Núm. de Cat. 05041) y el suplemento (Núm. de Cat. 5402) se obtuvieron de Stem Cell Technologies (Vancouver, BC). El medio Eagle modificado de Dulbecco (Núm. de Cat. 11960-069) y el suero bovino fetal (Núm. de Cat. SH30070-03) se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA) e Hyclone (Logan, UT) respectivamente. El medio y los suplementos se combinaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Nomenclatura de la Línea Progenitora Embrionaria Clonal:

Las líneas celulares de la presente invención junto con sus designaciones alternativas se enumeran en la Tabla 4 junto con sinónimos que representan modificaciones menores que resultan de la manipulación de los nombres resultantes del análisis bioinformáticos, incluida la sustitución de "-" por "." y viceversa, la inclusión de una "x" antes de los nombres de las líneas celulares que comienzan con un número árabe, y sufijos como "bio1" o "bio2" que indican réplicas biológicas de la misma línea que son ejemplos de casos en los que una ampolla congelada de la misma línea se descongeló, propagó y se utilizó en un análisis paralelo y "Rep1" o "Rep2" que indican réplicas técnicas en donde el ARN aislado de una línea celular dada se utiliza por segunda vez para un análisis repetido sin descongelar o comenzar de otra manera con un nuevo cultivo de células. El número de pases (que es el número de veces que las células se han tratado con tripsina y se han vuelto a cultivar en placa) para las líneas celulares generalmente se designa con la letra "P" seguida de un número árabe y, en contraste, el número de duplicación de la población (que se refiere al número de las duplicaciones estimadas que las líneas celulares han experimentado una expansión clonal a partir de una célula) se designa con las letras "PD" seguidas de un número árabe. El número de PD en un pasaje variaba de un experimento a otro, pero en general cada nuevo tratamiento con tripsina y cada nuevo cultivo en placa eran en una proporción de 1:3 a 1:4 (correspondiente a un aumento de PD de 1,5 y 2 respectivamente). En la expansión de los clones, las colonias originales se eliminaron de las placas de cultivo de

tejidos con cilindros de clonación y se transfirieron a placas de 24 pocillos, después a 12 pocillos y a 6 pocillos como se describió anteriormente. El primer cultivo de 24 pocillos confluentes se designa P1, el primer cultivo de 12 pocillos confluentes es P2, el primer cultivo de 6 pocillos es P3, después el cultivo de seis pocillos se dividió en una segunda placa de 6 pocillos (P4) y un T25 (P4). El segundo cultivo de 6 pocillos en P4 se utiliza para la extracción de ARN (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada en 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby", y representa aproximadamente 18-21 PD de expansión clonal. Los posteriores pases estimados típicos y las PD son la siguiente división a un matraz T75 (19,5-22,5 PD), el pase P6 de las células a un matraz T225 (21-24 PD), siendo a continuación P7 la transferencia de las células a un frasco rodante (850cm², 23-26 PD) y P8 la división a 4 frascos rodantes (25-28 PD). Los intervalos que se muestran arriba entre paréntesis representan intervalos estimados en el recuento de células debido al tamaño de las células, la eficacia de anclaje y el error de recuento.

Propagación de Líneas Celulares Clonales, Clonales Agrupadas, Oligoclonales y Oligoclonales Agrupadas

Los aspectos de la invención proporcionan métodos para identificar y diferenciar líneas celulares progenitoras embrionarias que derivan de una sola célula (clonal) o líneas celulares que son "clonales agrupadas", lo que significa que las líneas celulares clonadas tienen marcadores indistinguibles tales como marcadores de expresión génica y se combinan para producir cultivos de una sola célula a menudo con el propósito de aumentar el número de células en un cultivo, o son oligoclonales en donde se produce una línea a partir de un número pequeño, típicamente 2-1.000 células similares y se expande como una línea celular, o líneas "oligoclonales agrupadas" que son líneas producidas combinando dos o más líneas celulares oligoclonales que tienen marcadores indistinguibles tales como patrones de expresión génica. Dichas líneas celulares clonales, clonales agrupadas, oligoclonales u oligoclonales agrupadas se propagan a continuación in vitro mediante la eliminación de las células del sustrato al que se fijan, y el cultivo en placa de nuevo de las células a una densidad reducida típicamente de 1/3 a 1/4 del número original de células, para facilitar una proliferación adicional. Los ejemplos de dichas líneas celulares y sus medios de cultivo celular asociados se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; y West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308, incluida la información complementaria. Las composiciones y métodos de la presente invención se refieren a dichas líneas celulares cultivadas como se describe, pero para más de 21 duplicaciones de expansión clonal.

Análisis de Expresión Génica

Para reducir las variaciones en la expresión génica debidas a los artefactos del ciclo celular, y para capturar un perfil temprano de expresión génica de las células, al expandirse a placas de seis pocillos, el día en que las células alcanzaron la confluencia, las células se colocaron en medios con una reducción de suero a 0,5% en el caso en que la concentración de suero original fuera > 5%. En todos los demás casos, el suero y/u otros factores de crecimiento se redujeron a 10% de sus valores originales. Estas condiciones de reposo se impusieron durante cinco días y todos los cultivos se volvieron a alimentar dos días antes de la cosecha para reducir los artefactos de la diferencia de alimentación. De esta manera, a modo de ejemplo, si el medio original era medio DMEM con FCS al 10%, el medio de sincronización de inactividad era DMEM con FCS al 0,5%. El ARN total se extrajo directamente de las células que crecen en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos o 6 cm utilizando mini kits Qiagen RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ARN se midieron utilizando un espectrofotómetro Beckman DU530 o Nanodrop y la calidad de ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante o un bioanalizador Agilent 2100. El análisis de la expresión del genoma completo se realizó utilizando el sistema GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 de Affymetrix, Illumina Human-6 v1 y HumanRef-8 v1 Beadchips (Illumina 1) e Illumina Human-6 v2 Beadchips (Illumina 2), y los niveles de ARN para ciertos genes fueron confirmados por medio de PCR cuantitativa. Para Illumina BeadArrays, el ARN total se amplificó linealmente y se marcó con biotina utilizando los kits Illumina TotalPrep (Ambion), y se controló la calidad del ARNc utilizando un Bioanalizador Agilent 2100. El ARNc se hibridó a Illumina BeadChips, se procesó y se leyó utilizando un lector de matriz BeadStation de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina). Los valores de la Unidad de Fluorescencia Relativa (RFU) para todas las líneas celulares con conjuntos de sondas comunes se normalizaron por cuantiles.

Los datos del análisis de expresión génica anterior se pueden encontrar en las Tablas Complementarias de West et al., 2008, *Regenerative Medicine* vol. 3(3) pág. 287-308, incluidas todas las Tablas Complementarias. En las Tablas Complementarias II-IV, los genes se muestran en orden de clasificación (más alto-más bajo) para la razón de (valor de RFU más alto observado para el gen en el conjunto completo de líneas celulares - Valor de RFU promedio)/valor de RFU Prom. En la Tabla Complementaria V, los 45 genes principales expresados diferencialmente están ordenados por clasificación (más alto-más bajo) para la razón de (valor de RFU más alto observado para el gen en la línea celular individual)/valor de RFU Prom. para todas las líneas celulares. En la Tabla Complementaria VI, los genes correspondientes a los antígenos CD reconocidos se muestran en orden de clasificación (más alto-más bajo) y también (más alto-más bajo) para la razón de (valor de RFU más alto observado para el gen en el conjunto completo de líneas celulares)/Valor de RFU Prom. y (valor de RFU más bajo observado para el gen en todo el conjunto de líneas celulares)/valor de RFU Prom., respectivamente. En la Tabla Complementaria VII, los genes correspondientes a las proteínas secretadas se muestran en orden de clasificación (más alto-más bajo) para la razón de (valor de RFU más alto observado para el gen en el conjunto completo de líneas celulares)/valor de RFU Prom.

Condiciones Ilustrativas para Inducir la Diferenciación de Condrocitos

Se observa que cualquier método conveniente para inducir condrogénesis (o producción de cartílago) utilizando las líneas celulares progenitoras descritas en la presente memoria se puede emplear (ya sea in vivo o in vitro) para fines de investigación o terapéuticos, y como tal, no se pretende que haya limitación a este respecto. Los ensayos descritos a continuación, por lo tanto, representan ejemplos ilustrativos, no limitantes de afecciones para la condrogénesis.

Protocolo de Referencia de Diferenciación de Micromasa 1

El siguiente protocolo de diferenciación se denomina simplemente "d14 MM" (p. ej., En las tablas de micromatrices descritas en la presente memoria).

1. Las células se cultivan en material de cultivo tratado con cultivo de tejido Corning recubierto con gelatina (0,1%) y se desprenden con tripsina/EDTA al 0,25% (Gibco) diluido 1:3 con PBS (Gibco Ca, sin Mg). Después del desprendimiento y la adición del medio de crecimiento, las células se cuentan utilizando un contador Coulter y se resuspende el número apropiado de células necesarias para el experimento (p. ej., 10 x10e6 células o más) a una densidad celular de 20x10e6 células/ml en medio de crecimiento.

2. Se siembran alícuotas de 10 ul se siembran como montículos o "micromasas" en placas o fuentes de Poliestireno Tratadas con Cultivo de Tejidos de Corning. Se siembran veinticinco o más alícuotas de micromasa (200.000 células/10 ul de alícuota).

3. Las micromasas sembradas se colocan en una incubadora humidificada a 37° con 5% de O₂ y 10% de CO₂ durante 90 minutos a 2 horas para el anclaje.

4. Se añade medio de crecimiento y se reemplaza a la mañana siguiente, después de la aspiración y el lavado con PBS (libre de Ca, Mg), con Medio Condrogénico Completo (preparado como se describe a continuación para las micromasas de sedimentos). Por ejemplo, se añaden 6 ml de Medio Condrogénico Completo/fuente de 10 cm. Las células se mantienen en una incubadora humidificada a 37° con 5% de O₂, 10% de CO₂ y el medio condrogénico se reemplaza por medio recién preparado cada 2-3 días.

5. Después de períodos de tiempo variables en medio condrogénico, se extrae ARN utilizando kits Qiagen RNeasy (Qiagen Núm. de Cat. 74104) como se describe en el Manual de Qiagen. El rendimiento de ARN se maximiza mediante el uso de QiaShredder de Qiagen (Núm. de Cat. 79654 para homogeneizar las muestras después de la lisis de las micromasas con tampón RLT, (que se proporciona con los mini kits RNeasy) antes de la extracción de ARN.

Una alternativa al medio Condrogénico Lonza es CellGro (Núm. de Cat. 15-013-CV) de Media Tech. A cada 500 ml, se le añaden los siguientes complementos: 5,0 ml de Pen/Estrep (Gibco Núm. de Cat. 15140), 5,0 ml de Glutamax (Gibco Núm. de Cat. 35050), Dexametasona (Sigma, St. Louis, MO, Núm. de Cat. D1756-100) - 500 ul 0,1 mM para una concentración final de 0,1 uM; L-Prolina (Sigma Núm. de Cat. D49752) -500ul 0,35 M para una concentración final de 0,35 mM; Ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma, Núm. de Cat. 49792, Fluka) -500ul 0,17 M para una concentración final de 0,17mM; Premezcla ITS (BD, Franklin Lakes, NJ, estéril Núm. de Cat. 47743-628) -500 ul de producto concentrado 1000x para una concentración final de 6,25 ug/ml de insulina, 6,25 ug/ml de transferrina, 6,25 ng/ml de ácido selenioso, 1,25 mg/ml de albúmina sérica, 5,35 ug/ml de ácido linoleico.

Después de la adición de constituyentes por encima, el medio se filtra a través de una unidad de filtro Corning de 0,2 micras de 500 ml.

Protocolo de Referencia de Diferenciación de Micromasa 2

El siguiente protocolo de diferenciación se denomina simplemente "d14 MM" en las tablas de micromatrices descritas en la presente memoria.

Como alternativa a Lonza TGFβ₃ descrito anteriormente, los autores de la presente invención utilizaron TGFβ₃ (R&D Systems, Minneapolis MN, Núm. de Cat. 243-B3-010). Se prepara, se divide en alícuotas y se almacena y se utiliza de manera similar a la del adquirido de Lonza.

Protocolo de Referencia de Diferenciación de Micromasa 3

El siguiente protocolo de diferenciación se denomina simplemente "d14 CS" en las tablas de micromatrices descritas en la presente memoria.

Como alternativa al Protocolo de Micromasa1, las células se pueden cultivar en placa en el medio Condrogénico Completo directamente en lugar de permitir que las micromasas se anclen en presencia de medio que contiene suero. Dichas micromasas diferenciadas se denominan "Sembradas con Condro" o "CS" en la presente invención.

Protocolo de Referencia de Diferenciación de Sedimentos

ES 2 778 750 T3

El siguiente protocolo de diferenciación se denomina simplemente "d14 Pel" en las tablas de micromatrices descritas en la presente memoria.

5 1. Las células se cultivan en material de cultivo tratado con cultivo de tejido Corning recubierto con gelatina (0,1%) y se desprenden con tripsina/EDTA al 25% (Invitrogen, Carlsbad, CA, Gibco) diluido 1:3 con PBS (libre de Ca, Mg). Después del desprendimiento y la adición del medio de crecimiento, las células se cuentan utilizando un contador Coulter y se transfiere el número apropiado de células necesarias para el experimento (p. ej., 10×10^6 o más) a un tubo de polipropileno estéril y se centrifugan a 150 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

10 2. El sobrenadante se aspira y se desecha. Las células se lavan con la adición de Medio Condrogénico Incompleto que consiste en hMSC Chondro BulletKit (PT-3925) al cual se le añaden complementos (Lonza, Basilea, Suiza, Poietics Single-Quots, Núm. de Cat. PT-4121). Los complementos añadidos para preparar el Medio Condrogénico Incompleto son: Dexametasona (PT-4130G), Ascorbato (PT-4131G), ITS + complementos (4113G), Piruvato (4114G), Prolina (4115G), Gentamicina (4505G), Glutamina (PT-4140G).

15 3. Las células se centrifugan a 150 g a temperatura ambiente, se aspira el sobrenadante y se vuelve a suspender el sedimento celular (una vez más) con 1,0 ml de Medio Condrogénico Incompleto por $7,5 \times 10^5$ células, y se centrifuga a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y se desecha. El protocolo de cultivo de Condrogénesis descrito por Lonza se sigue con algunas modificaciones (como se escribe a continuación).

20 4. Los sedimentos celulares se resuspenden en medio Condrogénico Completo a una concentración de $5,0 \times 10^5$ células por ml. El Medio Condrogénico Completo consiste en Medio Incompleto de Lonza más TGFb3 (Lonza, PT-4124). El TGFb3 liofilizado estéril se reconstituye con la adición de HCl estéril 4 mM que contiene 1 mg/ml de BSA a una concentración de 20 µg/ml y se almacena después de la división en alícuotas a -80°C . El medio Condrogénico Completo se prepara justo antes de su uso mediante la adición de 1 ul de TGFb3 por cada 2 ml de Medio Condrogénico Incompleto (la concentración final de TGFb3 es 10 ng/ml).

5. Una alícuota de 0,5 ml ($2,5 \times 10^5$ células) de la suspensión celular se coloca en tubos de cultivo de polipropileno de 15 ml estériles. Las células se centrifugan 150 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

25 6. Después de la centrifugación, las tapas de los tubos se aflojan media vuelta para permitir el intercambio de gases. Los tubos se colocan en una incubadora a 37°C , en una atmósfera humidificada de 10% de CO_2 y 5% de O_2 . Los sedimentos no se alteran durante 24 horas.

30 7. Los sedimentos celulares se alimentan cada 2-3 días reemplazando completamente el medio en cada tubo aspirando el medio viejo con una punta de pipeta estéril de 1-200 ul y añadiendo 0.5 ml de Medio Condrogénico Completo recién preparado a cada tubo.

8. Después de reemplazar el medio y asegurar que el sedimento flota libremente, las tapas se aflojan y los tubos se devuelven a la incubadora.

35 9. Los sedimentos se cosechan después de intervalos de tiempo variables en medio condrogénico y se preparan para la histología mediante fijación con Formalina Tamponada Neutra y/o los sedimentos se combinan y se preparan para la extracción de ARN utilizando mini kits RNeasy (Qiagen, Germantown, MD, Núm. de Cat. 74104).

El protocolo para la extracción de ARN se sigue como se describe en el Manual de Qiagen. El rendimiento de ARN se maximiza mediante el uso de QiaShredder de Qiagen (Núm. de Cat. 79654) para homogeneizar las muestras después de la lisis de los sedimentos celulares con tampón RLT (proporcionado en mini kits RNeasy) antes de la extracción de ARN.

40 Protocolo de Referencia de Diferenciación de Cuentas de Alginato

El siguiente protocolo de diferenciación se denomina simplemente "alginato d14" en las tablas de micromatrices descritas en la presente memoria.

45 Las células de la presente invención se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad, se lavaron con NaCl (155 mM), se centrifugaron nuevamente, y el sedimento se resuspendió a 20×10^6 en alginato al 1,2% (Lonza). La suspensión celular se introdujo en una jeringa de 1 ml y, a través de una aguja 22 g, se dispensó gota a gota en un baño de CaCl_2 (102 mM). La gelificación es inmediata. Las cuentas se lavaron 3-5x con NaCl (155 mM), después se lavaron una vez con medio Condrogénico (sin TGF) después de la inmersión en medio condrogénico. Las cuentas se colocaron en múltiples pocillos de placas de 6 pocillos y se alimentaron tres días a la semana durante 14 días. Las cuentas se lavaron con NaCl varias veces antes de la despolimerización por exposición al citrato de sodio (55 mM) durante 20 minutos. Después de la centrifugación, el sedimento celular se sometió a lisis con RLT (Qiagen) y se extrajo el ARN total utilizando micro kits RNeasy (Qiagen) seguido de una etapa de trituración empleando QiaShredder para mejorar el rendimiento. La expresión de COL2A1 se determinó por qPCR como anteriormente.

Marcadores de Expresión Génica de Diferenciación de Condrocitos

La expresión génica de los condrocitos se puede someter a ensayo mediante análisis de micromatrices como se

ES 2 778 750 T3

describe en la presente memoria o mediante qPCR. Las secuencias de los cebadores de qPCR se pueden elegir por medios conocidos en la técnica y a modo de ejemplo no limitante pueden ser:

COMP	f2	CCGACAGCAACGTGGTCTT
COMP	r2	CAGGTTGGCCAGATGATG
CRTL1	f1	TGCTCAGATTGCAAAAGTGG
CRTL1	r1	TATCTGGGAAACCCACGAAG
CILP	f1	CCTGGTCCTGGAAGTCACAT
CILP	r1	CCATGTTGTCCACTCACCAG
CEP68	f1	ATCCGTAGAGAGCACGGAGA
CEP68	r1	GGACTCTCCATGGGACAAGA
COL2A1	f3	GGCAATAGCAGGTTACGTACA
COL2A1	r3	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
COL2A1	f4	TGGCCTGAGACAGCATGA
COL2A1	r4	AGTGTGGGAGCCAGATTG
CEP68	f1	ATCCGTAGAGAGCACGGAGA
CEP68	r1	GGACTCTCCATGGGACAAGA
SOX9	f1	TACGACTACACCGACCACCA
SOX9	r1	TCAAGGTCGAGTGAGCTGTG
SCXA	f1	TCCAGCTACATCTCGCACCT
SCXA	r1	CGGTCCTTGCTCAACTTTCT
BARX2	f1	GGACTTGGCTCAGTCTCTGG
BARX2	r1	TGGGGATGGAGTTCTTCTTG
GAPDH	f2	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC
GAPDH	r2	AGGGGTCTACATGGCAACTG
RPS10	f1	ATTTGGTCGTGGACGTGGT
RPS10	r1	TTTGGCTGTAAGTTTATTCAATGC
GUSB	f1	AAACGATTGCAGGGTTTCAC
GUSB	r1	CTCTCGTCGGTGACTGTTCA

Otros Conjuntos de Cebadores para Condrogénesis:

COL2A1	f1	TCTACCCCAATCCAGCAAAC
COL2A1	r1	GTTGGGAGCCAGATTGTCAT
COL2A1	f2	CACACTGGTAAGTGGGGCAAGACCG
COL2A1	r2	ACGAGGTCCTCACTGGTGAA
ACAN	f1	TGAGTCCTCAAGCCTCCTGT
ACAN	r1	TGGTCTGCAGCAGTTGATTC
ACAN	f2	ACAGCTGGGGACATTAGTGG
ACAN	r2	GTGGAATGCAGAGGTGGTTT
COL10A1	f1	GCTAAGGGTGAAAGGGGTTTC
COL10A1	r1	CTCCAGGATCACCTTTTGGGA
BGN	f1	GGACTCTGTACACCCACCT

ES 2 778 750 T3

BGN	r1	AGCTCGGAGATGTCGTTGTT
COL9A2	f1	AGCATCATTCGGCTGTTACC
COL9A2	r1	CTGAGGGGTGGAAGTGTAGC
CDMP1	f1	CCCATCAGCATCCTCTTCAT
CDMP1	r1	TGTAGATGCTCCTGCCACAG
VERSICAN	f1	ACCACGCTTCCTATGTGACC
VERSICAN	r1	TGTTGTAAGTGGGTGGCAAA
COL11A1	f1	TCGAGGGTTTGATGGACTTC
COL11A1	r1	CATCTTCTCCCCTCATTCCA
DCN	f1	TGGCAACAAAATCAGCAGAG
DCN	r1	GCCATTGTCAACAGCAGAGA
FMOD	f1	CCTCCAAGGCAATAGGATCA
FMOD	r1	GCTGCGCTTGATCTCGTTC
LUM	f1	TGATCTGCAGTGGCTCATT
LUM	r1	AAAAGAGCCCAGCTTTGTGA
COL1A1	f1	GTGCTAAAGGTGCCAATGGT
COL1A1	r1	ACCAGGTTACCGCTGTTAC
COL1A1	f2	GTGCTAAAGGTGCCAATGGT
COL1A1	r2	CTCCTCGCTTTCCTCCTCT
PRELP	f1	TCCCAATCTTGCCCTCATT
PRELP	r1	GTCATGGAACGCCACTAGGT
ACAN	f3	TCGAGGACAGCGAGGCC
ACAN	r3	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
COL10A1	f2	CAAGGCACCATCTCCAGGAA
COL10A1	r2	AAAGG GTATTTGTG GCAGCATATT
CRTL1	f2	TTCCACAAGCACAACTTTACACAT
CRTL1	r2	GTGAAACTGAGTTTTGTATAACCTCTCAGT
LUM	f2	ACCAGATTGACCATATTGATGA
LUM	r2	GGACAGATCCAGCTCAACC
SOX9	f2	AGGCAAGCAAAGGAGATGAA
SOX9	r2	TGGTGTCTGAGAGGCACAG
SOX9	f3	ACTGAGTCATTTGCAGTGTTCCTGCC
SOX9	r3	GTGGGCTGATCCCCTCCAGGT
SOX5	f1	TGGCACTGCACTGGGTAGGA
SOX5	r1	AAGGCTGGGAGCCCCTCACT
AGC1/ACAN	f4	TGAGTCCTCAAGCCTCCTGT
AGC1/ACAN	r4	CCTCTGTCTCCTTGCAGGTC
IHH	f1	GGCCGGGAGACCGTGTGTTG
IHH	r1	TGGGGCTCGCGGTCCAGTAA
IHH	f2	TACGCCTGGAGAGTGGGGCG

IHH	r2	TGGGGCTCGCGGTCCAGTAA
COL2A1	f5	TCGTGGGTCCCAGGGGTGAA
COL2A1	r5	GACCTGGAGGGCCCTGTGCG
COL2A1	f6	TGCTGCCCCATCTGCCAAC
COL2A1	r6	CCTGCAGGTCCCTGAGGCC
COL2A1	f7	AGGGCCAGGATGTCCGGCAA
COL2A1	r7	TCTGCCACGAGGTCCAGGGG

CRTAC1 (CEP-68)	f2	CGGGGCGATGGCACCTTTGT
CRTAC1 (CEP-68)	r2	GATAGAGGCGGTGGGGGCCA
COMP	f1	ACAATGACGGAGTCCCTGAC
COMP	r1	TCTGCATCAAAGTCGTCTCTG
BARX2	f2	GAGTCAGAGACGGAACAGCC
BARX2	r2	AGTCCCAGAGACTGAGCCAA
CHM1 (LECT1)	f1	GCGCAAGTGAAGGCTCGTAT
CHM1 (LECT1)	r1	GTTTGGAGGAGATGCTCTGTTTG

5 Los protocolos de qPCR pueden variar y son bien conocidos en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, las muestras para la prueba se preparan en placas de reacción de 96 pocillos Optical convencionales (Applied Biosystems Carlsbad, CA, PN 4306737) que consisten en 30 ng de ARN equivalente de ADNc, 0,4 µM por cebador, agua destilada Ultra-Pure (Invitrogen), diluida 1:1 con 12,5 ul de Mezcla Maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems Carlsbad, CA, Núm. de Cat. 4367659) que incorpora la ADN polimerasa AmpliTaq Gold en un volumen de reacción total de 25 ul. La qPCR en tiempo real se ejecuta utilizando el sistema de PCR en Tiempo Real de Applied Biosystems 7500 que emplea el soporte lógico SDSv1.2. Las condiciones de amplificación se ajustan a 10 50°C durante 2 min. (fase 1), 95°C durante 10 min. (fase 2), 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, después 60°C durante 1 minuto (fase 3), con una etapa de disociación a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos (fase 4). Los valores de Ct para los productos de amplificación de genes de interés se normalizan al valor de Ct promedio de 3 genes constitutivos (GAPD, RPS10 y GUSB).

Ensayo de Tinción de Safranina O

15 Las técnicas bien conocidas de tinción de secciones de tejido incluidas en parafina, fijadas en formalina con Safranina O se utilizan comúnmente en la detección de proteoglicanos relacionados con el cartílago, sin embargo, el ensayo no es absolutamente específico para el cartílago ya que también tiñe la mucina, los gránulos de los mastocitos, y probablemente otras sustancias en otros tipos de células. Un ejemplo no limitante del protocolo en el que el cartílago y la mucina se teñirán de color naranja a rojo, y los núcleos se teñirán de color negro y el fondo se teñirá de color verde, utiliza micromasas fijadas con formalina, sedimentos o agregaciones similares de células. Los reactivos utilizados incluyen Solución de Hematoxilina Férrica de Weigert: en la cual la Solución de Partida A está compuesta por 1 gramo de Hematoxilina en 100 ml de alcohol del 95%; la Solución de Partida B está compuesta por 4 ml de Cloruro férrico al 29% en agua diluido en 95 ml de Agua destilada y 1,0 ml de Ácido clorhídrico concentrado; Solución de Trabajo de Hematoxilina Férrica de Weigert compuesta por partes iguales de Solución de Partida A y B 20 y utilizada en cuatro semanas; Solución de Fast Green (FCF) al 0,001% compuesta por 0,01 gramos de Fast Green, FCF, C.I. 42053 en 1000 ml de Agua destilada; Solución de ácido acético al 1% compuesta por 1,0 ml de Ácido acético glacial en 99 ml de Agua destilada; y Solución de Safranina O al 0,1% compuesta por 0,1 gramos de Safranina O, C.I. 50240 en 100 ml de Agua destilada. Las muestras se Desparafinaron e hidrataron con agua destilada. Se tiñeron con solución de trabajo de hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos, después se lavaron con agua corriente durante 10 minutos, se tiñeron con solución Fast Green (FCF) durante 5 minutos, se enjuagaron rápidamente con solución de ácido acético al 1% durante no más de 10-15 segundos, se tiñeron en solución de safranina O al 0,1% durante 5 minutos, se deshidrataron y aclararon con alcohol etílico del 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, utilizando 2 cambios cada uno, 2 minutos cada uno, se montaron utilizando medio resinoso, y se obtuvieron imágenes y se analizaron para detectar manchas como se ha descrito más arriba. El proteoglicano 30 relacionado con el cartílago se tiñe de rojo anaranjado oscuro.

Escrutinio de Bajo Rendimiento y qPCR

Las líneas celulares progenitoras embrionarias clonales, oligoclonales, o clonales agrupadas u oligoclonales

agrupadas de la presente invención a <21 o preferiblemente > 21 duplicaciones de expansión clonal u oligoclonal, lo más preferiblemente a 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 duplicaciones de expansión clonal (dado que antes de 29 duplicaciones de expansión clonal las células están disponibles solamente en cantidades limitadas, y más allá de 70 duplicaciones las células normalmente se acercan a la senescencia) se escrutan simultáneamente en 1, 2, 3, 4, 5, o preferiblemente 10 o más condiciones de diferenciación diversas. Las condiciones de diferenciación pueden incluir las descritas anteriormente como "diferenciación de micromasa", "diferenciación de sedimentos" y "diferenciación de cuentas de alginato".

La lectura del ensayo puede ser marcadores de ARNm de diferenciación de condrocitos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos anteriormente como "Marcadores de Expresión Génica de Diferenciación de Condrocitos" y medidos por hibridación con secuencias diana dispuestas en matrices, que incluyen, pero no se limitan a micromatrices, o por qPCR. La detección también se puede realizar a nivel de péptidos o proteínas que se pueden detectar mediante el uso de anticuerpos específicos, mediante el uso de ensayos enzimáticos, espectroscopía de masas u otros medios similares bien conocidos en la técnica.

Escrutinio de Rendimiento Medio de la Zona de Destino de los Progenitores Embrionarios Clonales u Oligoclonales

Las líneas celulares progenitoras embrionarias clonales, oligoclonales o clonales agrupadas u oligoclonales agrupadas de la presente invención a <21 o preferiblemente > 21 duplicaciones de expansión clonal u oligoclonal, lo más preferiblemente a 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 duplicaciones de expansión clonal (dado que antes de 29 duplicaciones de expansión clonal las células están disponibles solamente en cantidades limitadas, y más allá de 70 duplicaciones las células normalmente se acercan a la senescencia) se escrutan simultáneamente en 10, 20, 30, 40, 50, o preferiblemente 100 o más condiciones de diferenciación diversas (véanse, p. ej., las condiciones de diferenciación descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 11/604.047 presentada el 21 de noviembre de 2006 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby". Las células se cultivan en dichas condiciones de diferenciación durante 1-6 semanas, lo más preferiblemente cuatro semanas.

La lectura del ensayo pueden ser marcadores de diferenciación de ARNm tales como los descritos anteriormente como "Gene Expression Markers of Chondrocyte Differentiation" y medidos por hibridación a secuencias diana dispuestas en matrices, que incluyen, pero no se limitan a micromatrices o PCR. La detección también se puede realizar a nivel de péptidos o proteínas que se pueden detectar mediante el uso de anticuerpos específicos, mediante el uso de ensayos enzimáticos, espectroscopía de masas u otros medios similares bien conocidos en la técnica.

Escrutinio por qPCR de Rendimiento Medio de la Diferenciación de Células hEP

Las líneas celulares progenitoras embrionarias clonales, oligoclonales, o clonales agrupada u oligoclonales agrupadas de la presente invención, que incluyen pero no se limitan, a las descritas anteriormente a <21 o preferiblemente >21 duplicaciones de expansión clonal u oligoclonal, lo más preferiblemente a 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 duplicaciones de la expansión clonal se cultivan en placas de cultivo de 12 pocillos teniendo cada pocillo 10 micromasas de 250.000 células (es decir, 2,5 millones de células por pocillo). Alternativamente, las células se tratan con otras condiciones de cultivo (p. ej., como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 11/604.047 presentada el 21 de noviembre de 2006 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; véase la Tabla II que utiliza el mismo número de células, expuestas a cualquier combinación de los medios de cultivo enumerados en la Tabla III, y los factores complementados enumerados en la Tabla IV de estas solicitudes). Las células se cultivan en dichas condiciones de diferenciación durante 1-6 semanas, lo más preferiblemente cuatro semanas.

El ARN se prepara a partir de productos lisados celulares utilizando los mini kits RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los cultivos celulares (micromasas) se enjuagan en PBS, a continuación se lisan en un volumen mínimo de tampón de lisis RLN. Después de la incubación sobre hielo, los restos celulares se eliminan por centrifugación y el producto lisado se mezcla con tampón RLT, después de lo cual se añade etanol a la mezcla. La mezcla combinada se carga después en la columna giratoria RNeasy y se centrifuga. A continuación se lava la columna cargada y se libera el ARN purificado de la columna con un volumen mínimo de agua tratada con DEPC (típicamente 30 ul o menos). La concentración de ARN en el eluato final se determina por absorbancia a 260 nm.

La síntesis de ADNc se realiza utilizando el kit de ADNc SuperScript First Strand (InVitrogen; Carlsbad, CA). Brevemente, se desnaturalizan 2,5 µg de ARN purificado por calor en presencia de hexámeros aleatorios. Después

de enfriar, la reacción de la primera hebra se completa utilizando la enzima transcriptasa inversa SuperScript y los reactivos asociados del kit. El producto resultante se purifica adicionalmente utilizando kits de Purificación por PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añade tampón PB a los productos de reacción de ADNc de la primera hebra, a continuación la mezcla se carga sobre la columna giratoria QIAquick y se centrifuga. La columna se lava con tampón PE y el ADNc purificado se hace eluir de la columna utilizando un volumen mínimo de agua (20 ul).

Se sintetizan pares de cebadores de la qPCR para cada gen objetivo. Brevemente, los pares de cebadores para un gen diana se diseñan para amplificar solamente la secuencia de ARNm diana y tienen temperaturas de reasociación óptimas para sus secuencias diana que se encuentran en el intervalo de 65-80°C y productos de amplificación únicos en el intervalo de tamaño de 100-500 pb. Los pares de cebadores se suministran a concentraciones de trabajo (10 µM) a BioTrove, Inc. (Woburn, MA) para la producción de una placa qPCR Open Array personalizada. Las placas OpenArray están diseñadas para albergar 56-336 pares de cebadores y la placa final fabricada con pares de cebadores secados se proporciona al proveedor de servicios. Los productos de reacción de ADNc purificado (2.) y la mezcla maestra Syber Green se cargan en pocillos individuales de la placa OpenArray utilizando el dispositivo de carga automática OpenArray (BioTrove). La placa se sella y la qPCR se carga en el dispositivo NT Imager/Cycler (BioTrove) para la amplificación. Los valores de Ct para cada muestra se calculan utilizando el soporte lógico de la aplicación OpenArray.

Aplicaciones

Los métodos descritos para el cultivo de células y tejidos animales son útiles para generar células o la progenie de las mismas en la terapia celular de mamíferos y seres humanos, tales como, pero no limitados a, la generación de células humanas y formulaciones derivadas de células útiles en el tratamiento de afecciones ortopédicas que incluyen, pero no se limitan a, artritis, tal como osteoartritis, degeneración del tejido intervertebral, enfermedad de la articulación mandibular temporal, trauma o reparación quirúrgica de los tejidos cartilaginosos de la nariz, el oído externo, la articulación mandibular, la tráquea, el cricoide, el esternón u otras articulaciones sinoviales, como las del hombro, codo, muñeca, dedos de las manos y articulaciones que soportan peso, tales como cadera, rodilla, tobillo y dedos de los pies.

En ciertas realizaciones de la invención, las células derivadas de células individuales y células derivadas de células oligoclonales obtenidas por los métodos de esta invención, se utilizan en la investigación y el tratamiento de trastornos relacionados con la biología celular, el descubrimiento de fármacos basados en células y en la terapia celular. Las poblaciones de células derivadas de células individuales obtenidas utilizando los métodos de la presente invención pueden haber recibido ya las señales requeridas para ser dirigidas hacia una ruta de diferenciación.

En ciertas realizaciones de la invención, las células derivadas de células individuales y derivadas de células oligoclonales se introducen en los tejidos en los que residen normalmente para mostrar utilidad terapéutica. En ciertas realizaciones de la invención, las células derivadas de células individuales y células derivadas de células oligoclonales, obtenidas por los métodos de esta invención, se utilizan para inducir la diferenciación de otras células madre pluripotentes. La generación de poblaciones de células derivadas de células individuales capaces de propagarse in vitro mientras se mantiene un patrón embrionario de expresión génica es útil para inducir la diferenciación de otras células madre pluripotentes. La inducción célula-célula es un medio común para dirigir la diferenciación en el embrión temprano. Muchos tipos de células potencialmente útiles desde el punto de vista médico están influenciados por señales inductivas durante el desarrollo embrionario normal, incluyendo las neuronas de la médula espinal, las células cardíacas, las células beta pancreáticas y las células hematopoyéticas definitivas. Las poblaciones de células derivadas de células individuales capaces de propagarse in vitro mientras se mantiene un patrón embrionario de expresión génica se pueden cultivar en una variedad de condiciones de cultivo in vitro, in ovo, o in vivo para inducir la diferenciación de otras células madre pluripotentes que se convierten en tipos de células o tejidos deseados. La inducción se puede llevar a cabo en una variedad de métodos que yuxtaponen la célula inductora con la célula diana. A modo de ejemplos no limitantes, las células inductoras se pueden cultivar en placa en cultivo de tejidos y tratar con mitomicina C o radiación para evitar que las células se repliquen más. Las células diana se cultivan en placa a continuación encima de las células inductoras mitóticamente inactivadas. Alternativamente, las células inductoras derivadas de una sola célula se pueden cultivar sobre una membrana extraíble de un cultivo de células más grande o de una colonia derivada de una sola célula original y las células diana se pueden colocar sobre la parte superior de las células inductoras o sobre una membrana separada cubierta con células diana se pueden yuxtaponer para emparejar las dos capas de células en contacto directo. La bicapa de células resultante se puede cultivar in vitro, trasplantarse en un huevo de ave SPF, o cultivarse en condiciones que permitan el crecimiento en tres dimensiones mientras se proporciona soporte vascular (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional Número WO2005068610, publicada el 28 de julio de 2005. Las células inductoras también pueden provenir de una fuente de células madre pluripotentes, incluidas las células hES o hED, en las que se ha introducido una construcción suicida de modo que las células inductoras se puedan eliminar a voluntad. Los tipos de células útiles en la inducción derivada de células individuales y derivada de células oligoclonales pueden incluir casos de inducción bien conocidos en la técnica que se producen naturalmente en el desarrollo embrionario normal. En ciertas realizaciones de la invención, las células derivadas de células individuales y las células derivadas de células oligoclonales, obtenidas por los métodos de esta invención, se utilizan como "células alimentadoras" para apoyar el crecimiento de otros tipos de células, incluyendo las células madre

pluripotentes. El uso de células derivadas de células individuales y células derivadas de células oligoclonales de la presente invención como células alimentadoras alivia el riesgo potencial de transmitir patógenos desde las células alimentadoras derivadas de otras fuentes de mamífero a las células diana. Las células alimentadoras se pueden inactivar, por ejemplo, mediante irradiación de rayos gamma o mediante tratamiento con mitomicina C, para limitar la replicación y después se pueden cultivar simultáneamente con las células madre pluripotentes.

En ciertas realizaciones de la invención, la matriz extracelular (ECM) de células derivadas de células individuales y células derivadas de células oligoclonales, obtenidas por los métodos de esta invención, se puede utilizar para soportar células menos diferenciadas (véase Stojkovic et al., *Stem Cells* (2005) 23(3):306-14). Ciertos tipos de células que normalmente requieren una capa de alimentación se pueden apoyar en cultivos sin alimentación sobre una matriz (Rosler et al., *Dev Dyn.* (2004) 229(2):259-74). La matriz se puede depositar precultivando y lisando una línea celular formadora de matriz (véase el documento WO 99/20741), tal como la línea de fibroblastos de ratón STO (Número de Acceso ATCC CRL-1503) o fibroblastos placentarios humanos.

En ciertas realizaciones de la invención, los medios acondicionados de cultivos celulares derivados de células individuales y derivados de células oligoclonales se pueden recoger, agrupar, filtrar y almacenar como medio acondicionado. Este medio acondicionado se puede formular y utilizar para investigación y terapia. Tal medio acondicionado puede contribuir a mantener un estado menos diferenciado y permitir la propagación de células tales como las células madre pluripotentes. En ciertas realizaciones de la invención, el medio acondicionado de cultivos celulares derivados de células individuales y derivados de células oligoclonales obtenidos por los métodos de esta invención se puede utilizar para inducir la diferenciación de otros tipos de células, incluyendo células madre pluripotentes. El uso de medio acondicionado de cultivos celulares derivados de células individuales y derivados de células oligoclonales puede ser ventajoso para reducir el riesgo potencial de exponer células cultivadas a patógenos animales no humanos derivados de otras fuentes de mamíferos (es decir, sin xenógeno).

En otra realización de la invención, se puede inducir al proliferación de los tipos de células que no proliferan bien bajo ninguna condición de cultivo celular conocida de modo que se puedan aislar clonal u oligoclonalmente de acuerdo con los métodos de esta invención a través de la expresión regulada de factores que superan la inhibición del ciclo celular, tales como la expresión regulada del antígeno T grande del virus SV40 (Tag), o E1a y/o E1b regulados, o E6 y/o E7 del virus del papiloma, o CDK4 (véase, p. ej., Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 11/604.047 presentada el 21 de noviembre de 2006 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby").

En otra realización de la invención, los factores que anulan la detención del ciclo celular se pueden fusionar con proteínas o dominios de proteínas adicionales y suministrar a las células. Por ejemplo, los factores que anulan la detención del ciclo celular se pueden unir a un dominio de transducción de proteínas (PTD). Los dominios de transducción de proteínas, unidos covalente o no covalentemente a factores que anulan la detención del ciclo celular, permiten la translocación de dichos factores a través de las membranas celulares para que la proteína finalmente llegue a los compartimentos nucleares de las células. Los PTD que pueden fusionarse con factores que anulan la detención del ciclo celular incluyen el PTD de la proteína transactivadora del VIH (TAT) (Tat 47-57) (Schwarze y Dowdy 2000 *Trends Pharmacol. Sci.* 21:45-48; Krosi et al. 2003 *Nature Medicine* (9):1428-1432). Para la proteína TAT del VIH, la secuencia de aminoácidos que confiere la actividad de translocación de membrana corresponde a los residuos 47-57 (Ho et al., 2001, *Cancer Research* 61:473-477; Vives et al., 1997, *J. Biol. Chem* 272: 16010-16017). Estos residuos solos pueden conferir actividad de translocación de proteínas.

En otra realización de la invención, el PTD y el factor de detención del ciclo del ciclo se pueden conjugar a través de un conector. La longitud y secuencia exactas del conector y su orientación con respecto a las secuencias conectadas pueden variar. El conector puede comprender, por ejemplo, 2, 10, 20, 30 o más aminoácidos y se puede seleccionar basándose en propiedades deseadas tales como solubilidad, longitud, separación estérica, etc. En realizaciones particulares, el conector puede comprender una secuencia funcional útil para la purificación, detección o modificación, por ejemplo, de la proteína de fusión.

En otra realización de la invención, las células derivadas de células individuales o derivadas de células oligoclonales de esta invención se pueden reprogramar a un estado indiferenciado a través de una nueva técnica de reprogramación, como se describe en la Solicitud de Patente Núm. 60/705.625, presentada el 3 de agosto de 2005, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 60/729.173, presentada el 20 de octubre de 2005; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 60/818.813, presentada el 5 de julio de 2006. Brevemente, las células se pueden reprogramar a un estado indiferenciado utilizando al menos un proceso de dos, preferiblemente tres etapas que implica una primera etapa de remodelación nuclear, una segunda etapa de reconstitución celular y, finalmente, una tercera etapa en la que las colonias de células resultantes que surgen de la etapa dos se caracterizan por el grado de reprogramación y por la normalidad del cariotipo y la calidad. En ciertas realizaciones, las células derivadas de células individuales u células derivadas de células oligoclonales de esta invención se pueden reprogramar en la primera etapa de remodelación nuclear del proceso de reprogramación remodelando la envoltura nuclear y la cromatina de una célula diferenciada para parecerse más a la composición molecular de una célula indiferenciada o de la línea germinal. En la segunda etapa de reconstitución celular del proceso de reprogramación, el núcleo, que contiene la envoltura nuclear remodelada de la etapa uno, se fusiona a continuación con una ampolla citoplasmática que contiene el aparato mitótico necesario que es capaz, junto con el núcleo transferido, de producir una población

indiferenciada células madre tales como las células ES o ED capaces de proliferar. En la tercera etapa del proceso de reprogramación, las colonias de células que surgen de una o varias células resultantes de la etapa dos se caracterizan por el grado de reprogramación y por la normalidad del cariotipo y las colonias de alta calidad. Si bien esta tercera etapa no es necesaria para reprogramar con éxito las células y no es necesaria en algunas aplicaciones, se prefiere la inclusión de la tercera etapa de control de calidad cuando se utilizan células reprogramadas en ciertas aplicaciones, tales como el trasplante humano. Finalmente, las colonias de células reprogramadas que tienen un cariotipo normal pero no un grado suficiente de programación se pueden reciclar repitiendo las etapas uno y dos o las etapas uno a tres.

En otra realización de la invención, las células derivadas de células individuales y derivadas de células oligoclonales se pueden utilizar para generar ligandos empleando la tecnología de presentación en fagos (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 60/685.758, presentada el 27 de mayo de 2005 y el documento PCT US2006/020552, presentada el 26 de mayo de 2006).

La medición de los niveles de expresión génica se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, análisis de expresión génica de micromatrices, análisis de expresión génica de matrices en cuentas y análisis Northern. Los niveles de expresión génica se pueden representar como expresión relativa normalizada a ADPRT (Número de Acceso NM_001618.2), GAPD (Número de Acceso NM_002046.2) u otros genes constitutivos conocidos en la técnica. Los datos de expresión génica también se pueden normalizar mediante un método de mediana de medianas. En este método, cada matriz proporciona una intensidad total diferente. La utilización del valor de la mediana es una forma sólida de comparar líneas celulares (matrices) en un experimento. Como ejemplo, se encontró la mediana para cada línea celular y a continuación la mediana de esas medianas se convirtió en el valor para la normalización. La señal de cada línea celular se hizo en relación con cada una de las otras líneas celulares.

En otra realización de la invención, las células derivadas de células individuales o derivadas de células oligoclonales de esta invención pueden expresar patrones únicos de expresión del gen del antígeno CD, que son antígenos de la superficie celular. La expresión diferencial de antígenos CD en la superficie celular puede ser útil como una herramienta, por ejemplo, para clasificar las células utilizando anticuerpos disponibles comercialmente, basándose en las células que expresan los antígenos CD. Los perfiles de expresión de antígenos CD de algunas células de esta invención se muestran en West et al., 2008, Regenerative Medicine vol. 3(3) pág. 287-308, incorporada a la presente memoria como referencia, incluyendo la información complementaria. Por ejemplo, hay antígenos CD que se expresan en células ES y no (o en algunos casos, a niveles reducidos) en las líneas celulares relativamente más diferenciadas de esta invención. Esta podría ser una herramienta muy útil para seleccionar, clasificar, purificar y/o caracterizar células ES. Dado que los antígenos CD se expresan sobre la superficie celular y los anticuerpos contra ellos están, en términos generales, disponibles comercialmente, los anticuerpos (o combinaciones específicas de ellos) se pueden utilizar para purificar poblaciones puras de células ES o células de esta invención a partir de una mezcla heterogénea de células. Esto podría ser útil en diversas estrategias para cultivar células ES o células de esta invención, o preparar estas células para diversos fines comerciales.

En otra realización de la invención, las células derivadas de células individuales y derivadas de células oligoclonales, obtenidas por los métodos de esta invención, se pueden inyectar en ratones para generar anticuerpos contra antígenos de diferenciación. Los anticuerpos contra los antígenos de diferenciación serían útiles tanto para identificar las células para documentar la pureza de las poblaciones para las terapias celulares, para la investigación en la diferenciación celular, como para documentar la presencia y el destino de las células después del trasplante. En general, los mecanismos para generar anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

Una célula producida por los métodos de esta invención se podría modificar genéticamente para producir grandes cantidades de BMP3b u otros miembros de la familia BMP y, por lo tanto, esta célula podría ser útil para inducir hueso en la enfermedad de desgaste óseo. En el caso de la línea celular de la presente invención designada 4D20.8 con marcadores de mesénquima mandibular, la expresión en exceso de factores como BMP3b u otros miembros de la familia BMP es útil en el tratamiento de la osteonecrosis o fracturas óseas, tales como la de la mandíbula.

En otra realización de la invención, las células derivadas de células individuales y derivadas de células oligoclonales capaces de experimentar condrogénesis se pueden generar a partir de especies animales no humanas y se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades veterinarias.

En otra realización de la invención, las células derivadas de células individuales y derivadas de células oligoclonales capaces de experimentar condrogénesis se pueden utilizar experimentalmente para realizar la investigación sobre la diferenciación de condrocitos, incluyendo las redes reguladoras transcripcionales que conducen a los diversos tipos de cartílago en el organismo humano o no humano.

Combinaciones

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar combinadas en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se

5 pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones pertenecientes a los patrones de expresión génica de las células progenitoras de condrocitos embrionarios del sujeto están específicamente abarcadas por la presente invención y se describen en la presente memoria como si todas y cada una de las combinaciones se describieran individual y explícitamente. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan células progenitoras de condrocitos embrionarios que muestran los marcadores descritos.

Sistemas y Kits

La presente invención también proporciona sistemas y kits diseñados para su uso en diversas aplicaciones como se describe en la presente memoria.

10 Por ejemplo, los sistemas y kits (denominados genéricamente a continuación como "kits") de acuerdo con aspectos de la invención incluyen una o más de las líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarios de la invención. Los kits pueden incluir adicionalmente reactivos y materiales para la propagación y el uso de las células para investigación y/o aplicaciones terapéuticas, así como instrucciones de uso. Los kits también pueden contener los reactivos utilizados en la presente memoria para inducir la diferenciación de las células en condrocitos, como los
 15 materiales descritos en los protocolos mencionados anteriormente: Protocolo de Diferenciación de Micromasa 1, Protocolo de Diferenciación de Micromasa 2, Protocolo de Diferenciación de Micromasa 3, Protocolo de Diferenciación de Sedimentos y Protocolo de Diferenciación de Cuentas de Alginato.

20 En algunas realizaciones, el kit está diseñado para la producción de cartílago e incluye una o más de las líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarios descritas en la presente memoria y uno o más componentes adicionales utilizados para la propagación de las células y/o para la inducción de condrogénesis. Las líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarios proporcionadas en tales kits muestran marcadores de expresión génica de las líneas progenitoras embrionarias de la presente invención, tales como las líneas: SM30, E15, 4D20.8, 7SM0032, MEL2, SK11 y 7PEND24. Los componentes para la propagación y/o diferenciación de condrocitos pueden incluir cualquier componente descrito en la presente memoria para tales fines, incluyendo una matriz o un armazón (o reactivos para generar la matriz/armazones, p. ej., para generar hidrogeles), agentes hidratantes (p. ej., soluciones salinas fisiológicamente compatible, medios de cultivo celular preparados), sustratos de cultivo celular (p. ej., fuentes de cultivo, placas, viales, etc.), medios de cultivo celular (ya sea en forma líquida o en polvo), compuestos antibióticos, hormonas, aditivos, etc.

30 En ciertas realizaciones, el kit puede incluir adicionalmente componentes diseñados para facilitar el suministro de la población celular, p. ej., a un animal experimental o a un paciente que lo necesite, p. ej., un paciente que necesita terapia de reparación/reemplazo de cartílago. En estas últimas realizaciones, los componentes del kit se pueden proporcionar en una forma que sea adecuada para uso terapéutico (p. ej., proporcionados como componentes estériles/de calidad médica). Los componentes de suministro pueden incluir aquellos diseñados para encapsular o inmovilizar la población celular (p. ej., un armazón o matriz), así como para suministrar las células, ya sea directamente o asociadas con otros componentes (p. ej., un armazón o matriz), incluyendo la inyección de las células aisladas en el sitio del defecto, la incubación y/o cultivo de las células progenitoras embrionarias con un armazón o matriz adecuado y la implantación, incubación con armazones bio-reabsorbibles, etc. Se puede emplear cualquier armazón o matriz conveniente, tales como los armazones bio-reabsorbibles, biocompatibles como se describe con detalle más arriba, donde se han empleado, o se están sometiendo a prueba, varios para su uso en la
 40 reparación/reemplazo terapéutico de cartílago.

En algunas realizaciones, el kit incluye componentes para su uso en la determinación de que la población celular suministrada/trasplantada se ubica en al menos un sitio deseado, p. ej. el sitio de daño del cartílago. Tales componentes pueden permitir la determinación de la localización e incluso la cuantificación de las células suministradas a un sujeto.

45 En ciertas realizaciones, la línea o líneas celulares progenitoras de condrocitos embrionarias en el kit están genéticamente modificadas. Por ejemplo, se puede diseñar una línea celular progenitora de condrocitos embrionaria para expresar un gen exógeno, p. ej., un gen marcador que se puede utilizar para la identificación posterior de células derivadas de la línea celular (p. ej., un gen informador como es bien conocido en la técnica). Los genes informadores incluyen aquellos que son detectables directa o indirectamente, p. ej., proteínas fluorescentes, proteínas luminiscentes, enzimas, marcadores de la superficie celular y similares. En ciertas realizaciones, se diseñaron diferentes líneas celulares para expresar genes informadores exógenos que son discriminables entre sí, p. ej., proteínas fluorescentes que tienen diferentes características de excitación y/o emisión.

En ciertas realizaciones, el kit puede incluir cualquiera o todos los componentes necesarios para su uso previsto.

55 Por ejemplo, los kits de acuerdo con la invención pueden incluir otros artículos o componentes adecuados, tales como articulaciones artificiales, tubos, suturas, escalpelos, agujas, jeringas, antisépticos para la preparación de sitios quirúrgicos, dispositivos ortopédicos, etc.

También se proporcionan tipos adicionales de kits en aspectos de la presente invención.

Por ejemplo, se proporcionan kits para la identificación y/o aislamiento de células progenitoras de condrocitos según la presente invención. Tales kits incluirán reactivos diseñados para detectar la expresión de marcadores celulares que incluyen cualquiera de los marcadores de expresión génica descritos en la presente memoria. Tales reactivos de detección se pueden formular para detectar productos de expresión de estos genes a nivel de proteína o ácido nucleico (p. ej., ARNm). Como tales, los reactivos pueden incluir: anticuerpos o porciones de unión específica de los mismos (p. ej., anticuerpos marcados de forma detectable), otros agentes de unión a proteínas específicos (p. ej., ligandos o receptores solubles), sondas de ácido nucleico para su uso en el análisis de hibridación, p. ej., análisis de transferencia Northern, análisis de micromatrices y similares; pares de cebadores para su uso en ensayos de PCR, p. ej., ensayos de PCR cuantitativa como se detalla anteriormente); etc.

Como se señaló anteriormente, los kits sujeto típicamente incluyen adicionalmente instrucciones para el uso de los componentes del kit para poner en práctica los métodos sujeto, p. ej., para preparar muestras de ácido nucleico para realizar el proceso de mutación de acuerdo con aspectos de los métodos sujeto. Las instrucciones para poner en práctica los métodos sujeto generalmente se registran en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones se pueden imprimir sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los kits en forma de prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o de los componentes del mismo (es decir, asociado con el envasado o subenvasado), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes en forma de un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, p. ej. CD-ROM, disquete, etc. En otras realizaciones más, las instrucciones reales no están presentes en el kit, sino que se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, p. ej. a través de internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web donde se pueden ver las instrucciones y/o desde donde se pueden descargar las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones se registra sobre un sustrato adecuado.

Además de los componentes mencionados anteriormente, los kits también pueden incluir una o más muestras de control y reactivos, p. ej., dos o más muestras de control. Tales muestras de control pueden adoptar cualquier forma, p. ej., líneas celulares adicionales que tengan perfiles de marcadores conocidos, muestras de control negativo y positivo para su uso en el análisis de datos de expresión génica, etc. Se puede emplear cualquier muestra de control conveniente en los kits sujeto.

Depósitos biológicos

Las líneas celulares descritas en esta solicitud se han depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana ("ATCC"; P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EE.UU.) en virtud del Tratado de Budapest. La línea celular 4D20.8 (también conocida como ACTC84) se depositó en la ATCC en el pase 11 el 23 de julio de 2009 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-10231. La línea celular SM30 (también conocida como ACTC256) se depositó en la ATCC el 23 de julio de 2009 en el pase 12 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-10232. La línea celular 7SM0032 (también conocida como ACTC278) se depositó en la ATCC en el pase 12 el 23 de julio de 2009 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-10233. La línea celular E15 (también conocida como ACTC98) se depositó en la ATCC en el pase número 20 el 15 de septiembre de 2009 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-10341. La línea celular MEL2 (también conocida como ACTC268) se depositó en la ATCC en el pase número 22 el 1 de julio de 2010 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-11150. La línea celular SK11 (también conocida como ACTC250) se depositó en la ATCC en el pase número 13 el 1 de julio de 2010 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-11152. La línea celular 7PEND24 (también conocida como ACTC283) se depositó en la ATCC en el pase número 11 el 1 de julio de 2010 y tiene el Número de Acceso ATCC PTA-11149.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una comunicación y una descripción completas de cómo llevar a cabo y utilizar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los autores de la presente invención consideran su invención ni están destinados a representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

Ejemplo de Referencia 1. Análisis de micromatrices de líneas progenitoras embrionarias humanas clonales en un escrutinio de bajo rendimiento de condiciones de diferenciación condrogénica

Las líneas celulares 10RPE8, 4D20.8, 4D20.9, 4SKEL20, 7PEND12, 7PEND24, 7PEND30, 7PEND9, 7SKEL4, 7SKEL7, 7SM0025, 7SM0032, 7SM007, 7SM009, B16, C4.4, C4ELS5.1, C4ELS5.6, C4ELSR10, C4ELSR2, CM02, E109, E111, E120, E15, E164, E33, E44, E68, E69, E85, EN1, EN13, EN16, EN18, EN2, EN22, EN23, EN26, EN27, EN31, EN4, EN42, EN47, EN5, EN51, EN55, EN7, EN8, F15, J16, MEL2, MEL2, MW1, RAD20.16, RAD20.19, RAD20.4, RAD20.5, RAD20.6, RAPEND10, RAPEND15, RAPEND18, RASKEL8, RASM012, RASM019, SK11, SK17, SK18, SK25, SK31, SK35, SK43, SK44, SK46, SK47, SK49, SK50, SK52, SM17, SM2, SM22, SM28, SM28, SM30, SM33, SM8, T14, T20, T36, T42, T43, T44, T7, U31, W10, W11, W8, Z1, Z11, Z2, and Z3 se seleccionaron

como se describió anteriormente como "Protocolo de Diferenciación de Micromasa 1" y un subconjunto también se diferenció como "Diferenciación de Sedimentos", y "Diferenciación de Cuentas de Alginato". En resumen, los tipos de Células de control se incluyeron en el escrutinio, incluyendo: células madre mesenquimales de médula ósea humana, pase 3 (Lonza), células madre adiposas (ASC), células madre de pulpa dental (DPSC), fibroblastos dérmicos del prepucio (Xgene FB) y condrocitos articulares humanos normales (NHAC). Las células que se van a escrutar, así como los tipos de células de control descritos anteriormente, se sincronizaron en la detención del crecimiento o las condiciones condrogénicas de la micromasa y el sedimento en incubadoras con 5% de oxígeno ambiental como se describe en la presente memoria, así como en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 11/604.047 presentada el 21 de noviembre de 2006 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby". A modo de ejemplo, para las condiciones que inducen la sincronización en quiescencia, la línea celular 7PEND24 (ACTC283) se cultivó en medio MV2 endotelial Promocell con complementos a las concentraciones normalmente recomendadas por el fabricante y se comercializó como un kit completo (Núm. de Cat. C-22022) hasta que las células alcanzaron la confluencia. Al llegar a la confluencia, los medios se retiraron y se reemplazaron por los mismos medios Promocell pero con un 10% de la mezcla de complementos original. Después de tres días, los medios se aspiraron y se reemplazaron por los mismos medios (es decir, complementos normales al 10%) durante dos días adicionales (es decir, cinco días de condiciones de quiescencia en total). En el caso de la línea celular 4D20.8 (ACTC84), las células se cultivaron en medios DMEM con un complemento de FCS al 20% hasta que las células alcanzaron la confluencia. Al alcanzar la confluencia, el medio se retiró y se reemplazó por los mismos medios DMEM pero con 10% de la concentración original (es decir, FCS al 2%). Después de tres días, los medios se aspiraron y se reemplazaron por los mismos medios (es decir, DMEM con FCS al 2%) durante dos días adicionales (es decir, cinco días de condiciones de quiescencia en total) o se diferenciaron en condiciones condrogénicas como sedimentos o micromasas durante 1, 2, o 14 días. El ARN se recogió como se describe en la presente memoria y se analizó mediante qPCR y se hibridó con micromatrices Illumina para el análisis de expresión génica como se describe en la presente memoria. Las células madre mesenquimales de la médula ósea respondieron a las condiciones condrogénicas de sedimentos y micromasa con una marcada regulación por incremento de la expresión génica de los condrocitos. Los ejemplos de marcadores de diferenciación de condrocitos incluyen *MGP* y *PENK* que, si bien no son específicos del cartílago, se regulan por incremento durante la condrogénesis, y *COL2A1*, *MATN4*, *EPYC*, *COL9A2*, y *LECT1* que son relativamente específicos para el cartílago en desarrollo. Una comparación de la expresión génica en las condiciones entre los indiferenciados frente a los de 14 días, en las condiciones de micromasa en la línea celular 4D20.8 mostró una regulación por incremento de la expresión de *MGP* de >479x, *MATN4* de >10x, *PENK* de >369x, *COL2A1* de >60x, *EPYC* de >42x, *COL9A2* de >25x, *LECT1* de >24x, y de manera similar, con MSC, la diferenciación mostró una regulación por incremento de la expresión de *MGP* de 5x (aunque las MSC indiferenciadas expresaron niveles basales de expresión relativamente altos a diferencia de 4D20.8), *MATN4* de 20x, *PENK* de 6x (nuevamente, niveles relativamente altos en MSC indiferenciadas en comparación con la ausencia de expresión en 4D20.8 indiferenciado), *COL2A1* de 613x, *EPYC* de 48x, *COL9A2* de 117x, *LECT1* de 34x. Por el contrario, los fibroblastos dérmicos mostraron una regulación por incremento de la expresión de *MGP* de 37x, *PENK* de 369x, pero no hay expresión de *COL2A1*, *EPYC*, *LECT1*, o *COL9A2* antes o después del tratamiento experimental. Por lo tanto, a diferencia de los fibroblastos dérmicos, 4D20.8 expresó una amplia gama de genes específicos de cartílago, similares, aunque no idénticos a las MSC. De los 24.526 genes evaluados, 265 genes mostraron una mayor expresión durante la diferenciación de MSC, 191 aumentaron durante la diferenciación de D20.8, y solo 47 genes eran comunes. Por lo tanto, la línea celular 4D20.8 representa una línea celular distinta de las MSC, con una expresión del gen de homeobox *LHX8* específica del sitio del paladar y la mandíbula y sin expresión de *HOX* o *PITX1*, a diferencia de las MSC que no mostraron expresión de *LHX8*, sino una expresión del gen *HOX* caudal tal como *HOXA10*, *HOXB7*, *HOXC8*, y *HOXD13*, y la expresión de *PITX1* característica de las extremidades inferiores. La línea 7PEND24 también mostró inducción condrogénica a niveles más bajos.

Los niveles de inducción de *COL2A1* en el ensayo de micromatrices en las líneas antes y después de 14 días de las condiciones condrogénicas junto con MSC y controles de condrocitos articulares humanos normales (NHAC) se muestran en la Figura 2 en el gráfico titulado "*COL2A1*". Como también se puede ver en la Figura 2, el gen para *LECT1*, un componente común del cartílago también es inducido en las líneas, sin embargo, se expresa diferencialmente en las líneas. *CRTAC1*, un gen originalmente caracterizado como un marcador de cartílago permanente (a diferencia de los condrocitos hipertróficos) se expresa en NHAC, pero no en MSC, pero se expresa en las líneas celulares de la presente invención en diversos grados. El marcador *IHH* que se expresa en los condrocitos hipertróficos, no se expresa en los NHAC, se expresa en las MSC, pero no se expresa en las células de la presente invención, lo que es coherente con su diferencia de las MSC y potencialmente progenitores de cartílago estable. *CD74*, un gen originalmente caracterizado como un marcador de las MSC pero no de fibroblastos, se expresa en células madre adiposas (ASC), MSC, pero no en NHAC o las líneas celulares de la presente invención. Por último, *LHX8*, un marcador de mesénquima mandibular, no se expresa en NHACs, ACS, pero se expresa en células madre de pulpa dental (DPSC) de acuerdo con su origen en la cresta neural mandibular y se expresa en la línea 4D20.8.

Después de 14 días de micromasa y en un subconjunto de estas condiciones condrogénicas de sedimentos de líneas celulares, las líneas 7PEND24, 4D20.8, 7SM0032, MEL2, SK11, SM30 y E15 mostraron una expresión

marcadamente elevada de *COL2A1* tras la inducción de la diferenciación, expresando 4D20.8, 7SM0032, MEL2, E15 y SM30 niveles relativos más altos de transcripción que los condrocitos articulares humanos normales. Sorprendentemente, la línea SM30 expresa >1.000 el transcrito *COL2A1*. Las células madre mesenquimales de la médula ósea en el pase 3 expresaron poco o ningún transcrito, aunque se observó que esto variaba mucho con el lote y el número de pases de las células utilizadas, como es bien conocido en la técnica. No se observó expresión de *COL2A1* en ASC, DPSC o Xgene FB. Las líneas expresan combinaciones de marcadores variadas de marcadores tales como *TBX5* y *HAND2*, marcadores de mesodermo y de cresta neural y, por lo tanto, son útiles para modelar diversos tipos de condrogénesis y en la terapia clínica basada en células. Además, muestran variados genes homeobox específicos del sitio que generan las propiedades mecánicas únicas específicas del sitio de los cartílagos en el organismo. A modo de ejemplo no limitante, la línea celular 4D20.8 expresa fuertemente el gen marcador *LHX8*, un marcador de mesénquima perioral, tal como el que produce el paladar secundario, la reconstrucción de la mandíbula u otros derivados del mesénquima mandibular de la cresta neural, que incluyen, pero no se limitan a: la reparación del paladar hendido, la enfermedad periodontal, la reconstrucción de los brotes de los dientes mediante la contribución de células capaces de formar los componentes de la cresta neural de los dientes, la dermis de la región mandibular, los nervios periféricos o los melanocitos de la región mandibular, o la reparación de la atrofia gingival.

Ejemplo de Referencia 2

Como se ha demostrado previamente con las hMSC, se puede determinar la lesión y reparación del cartílago articular y el menisco después de la meniscectomía medial o lateral o la resección del LCA en ovejas utilizando la administración de células exógenas (Ghosh et al., Clin. Orthop., Vol. 252, pág. 101-113, 1990; Little et al., J. Rheumatol., Vol. 11, pág. 2199-2209, 1997. La tolerancia en ovejas a las células derivadas de hES se logra mediante el trasplante prenatal de células derivadas de hES. Las dosis crecientes de progenitores embrionarios derivados de hES-iPS, tales como 7PEND24, 7SM0032, SM30, E15, 4D20.8, así como los controles hMSC y HA, se inyectan en la articulación lesionada de la oveja en la que se ha inducido inmunotolerancia con uno o más portadores farmacéuticos, incluyendo Hextend, hialuronano, condroitin sulfato, quitina, quitosano u otro armazón/matriz (p. ej., menisco descelularizado). La tasa de reparación de la lesión se mide con el tiempo en respuesta a la dosis creciente. Las células trasplantadas se evalúan histológicamente en busca de evidencia de rechazo, formación de teratoma y eficacia en comparación con las MSC adultas humanas y el control de vehículo.

Ejemplo de Referencia 3 Ensayo de la estabilidad de los progenitores de condrocitos embrionarios durante un pase prolongado

Si bien los autores de la presente invención no pudieron hacer pasar las MSC de médula ósea adulta durante > 30 duplicaciones, cultivaron la línea celular de la presente invención designada 4D20.8 durante más de 33 pases. Los autores de la presente invención compararon la capacidad de las células para inducir cartílago medida por la expresión de *COL2A1* y analizada por medio de qPCR como se describe en la presente memoria en la etapa 12 y la etapa 33. Las células en el pase extendido produjeron niveles comparables de *COL2A1* a diferencia de los de las MSC en experimentos paralelos. La capacidad de aumentar a escala las células de los bancos de células de trabajo en el pase 12 durante otros 21 pases o más, donde cada pase es de 1,5 duplicaciones, corresponde a aproximadamente 52 duplicaciones o 2e50 células más grandes que las del banco de células de trabajo. Por lo tanto, las células tienen un potencial único de aumento a escala comercial para el trasplante alogénico en muchos pacientes.

Ejemplo de Referencia 4. Escrutinio de anticuerpos que reconocen antígenos CD en líneas condrogénicas seleccionadas de la presente invención

Las líneas celulares condrogénicas de la presente invención se analizaron de mediante rendimiento medio frente a una biblioteca de anticuerpos para antígenos CD y el porcentaje de células positivas se muestra a continuación (Tabla 2) demostrando la utilidad general de los antígenos pronosticados descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 11/604.047 presentada el 21 de noviembre de 2006 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby"; y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 12/504.630 presentada el 16 de julio de 2009 y titulada "Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby". Sin embargo, también se pueden identificar excepciones. En particular, los anticuerpos contra el antígeno CD56 (NCAM1) se unen al 80% de las células en la línea 4D20.8 mientras que este se une a una minoría de las otras líneas sometidas a prueba. Esto es coherente con los niveles relativamente altos de NCAM1 (ID de sonda Illumina 4040725) en los datos de micromatrices. Por lo tanto, los anticuerpos contra CD56 son útiles en la purificación por afinidad de células con los marcadores de expresión génica de la línea 4D20.8 descritos en la presente memoria.

ES 2 778 750 T3

Tabla 2

% de Células Positivas (Control de isotipo sustraído)						
Marcador	4D20,8 p21	7SMOO32 p15	7PEND24 p18	SM30 p15	SK11 p16	E15 p27
αβTCR	0,00	0,00	2,29	1,04	0,32	0,15
β2-microglobulina	85,68	86,80	91,52	95,28	90,30	92,06
CD25	68,81	0,71	26,60	1,09	0,22	17,30
CD26	26,60	(1,03)	4,26	3,91	2,92	66,10
CD40	8,47	(1,05)	9,73	4,42	41,84	79,70
CD49d	86,26	18,48	85,29	94,74	87,16	92,03
CD54	72,67	18,12	78,54	83,44	89,88	92,65
CD56	79,76	0,58	25,49	3,64	14,85	0,88
CD62L	8,69	11,38	84,53	12,32	10,85	3,20
CD66 (a, b, c, d)	13,93	(6,10)	44,83	6,31	22,13	13,95
CD66b	41,26	23,39	77,70	24,49	63,33	4,17
CD70	73,85	12,50	37,38	17,59	10,45	14,82
CD75	1,97	19,36	92,08	6,34	6,17	83,25
CD77	43,87	23,18	73,22	3,00	3,50	0,00
CD81	89,96	96,94	88,86	95,82	92,59	93,19
CD87	84,20	24,08	88,25	93,21	92,55	61,99
CD90	89,78	15,69	0,03	87,52	17,18	92,69
CD94	83,91	7,90	49,67	1,08	2,01	1,11
CD95	32,25	16,45	31,96	2,65	18,79	91,87
CD97	6,81	0,00	0,00	1,01	11,55	61,00
CD99R	12,69	19,97	4,99	2,64	25,51	57,54
CD100	6,42	0,40	12,08	3,31	0,00	0,47
CD104	53,36	0,73	0,86	84,89	1,12	68,38
CD108	60,08	2,83	88,36	80,03	88,41	49,56
CD119	55,21	0,92	64,49	46,03	64,72	72,66
CD121a	(2,05)	1,78	4,21	26,94	64,47	27,23
CD121b	0,00	0,30	5,17	1,08	4,28	0,00
CD130	50,74	7,24	65,11	55,31	63,29	61,93
CD133	2,56	54,84	9,88	2,17	3,66	0,00
CD141	87,72	3,89	82,09	95,37	70,32	89,28
CD158a	78,45	0,00	6,66	0,00	0,00	0,00
CD172b	70,42	5,74	89,09	77,41	87,06	60,38
CD195	46,67	28,43	78,15	8,27	27,56	26,37
CD197	30,21	4,54	50,27	3,30	4,06	5,90
CD200	29,13	0,00	2,11	6,61	66,61	0,00
CD201	86,37	73,21	85,31	62,43	79,90	80,94
CD209	19,10	66,53	51,85	27,17	47,70	22,49
CD220	49,88	(0,53)	23,21	10,99	26,64	60,61

% de Células Positivas (Control de isotipo sustraído)						
Marcador	4D20,8 p21	7SMOO32 p15	7PEND24 p18	SM30 p15	SK11 p16	E15 p27
CD273	40,48	3,67	65,30	43,16	62,46	71,83
CD274	28,55	18,05	72,08	78,66	91,11	91,10
Desmina	3,18	53,60	2,88	5,10	12,17	1,28
Disialogangliósido GD2	85,00	0,39	0,11	56,45	0,00	12,53
hu MSC (W7C6)	68,07	23,94	27,06	66,18	15,80	88,08
hu MSC y NPC (W4A5)	19,92	63,10	58,92	61,08	44,78	6,30
hu TNAP (W8B2)	6,76	24,86	6,46	2,93	13,65	3,67
MIC A/B	84,61	50,65	85,94	89,29	88,55	0,10
TROP-2	1,33	0,00	17,14	3,75	0,00	89,79

Ejemplo de Referencia 5. Descubrimiento de una línea progenitora condrogénica positiva para NNAT

La línea celular E15 (también conocida como ACTC98) en el pase 17 se expandió mediante pases seriados en medio DMEM con un complemento de suero al 20%, que es el mismo medio en el que originalmente se expandió clonalmente (véase la Tabla I Complementaria, West et al., 2008, Regenerative Medicine vol. 3(3) pág. 287-308. En los pases 14 y 17, las células se sincronizaron en quiescencia eliminando el medio una vez que las células habían alcanzado la confluencia y reemplazando los medios con DMEM de nueva aportación complementado con una reducción de suero diez veces mayor (2%). Después de tres días, se aspiró el medio y se reemplazó por DMEM de nueva aportación complementado con FCS al 2% durante dos días más. Las células en el mismo pase se colocaron en placa tanto en condiciones de micromasa como en sedimentos para inducir condrogénesis como se describe en la presente memoria. Después de 14 días de cultivo de micromasa, la línea celular E15, y los controles de condrocitos articulares humanos normales (NHAC) cultivados en las mismas condiciones, se sometieron a ensayo por medio de qPCR para determinar los marcadores específicos de expresión (véase el Ejemplo 6, más abajo). Se observó que E15 expresaba >10.000 más ARNm de COL2A1 que los controles de NHAC. Las micromasas del día 14 se fijaron y se tiñeron con Safranina O como se describe a continuación. Las muestras se tiñeron fuertemente para el proteoglicano del cartílago. Para caracterizar adicionalmente las células, el ARN se hibridó a micromatrices Illumina como se describe en la presente memoria.

Ejemplo de Referencia 6. Puntuación del Escrutinio de bajo rendimiento para progenitores condrogénicos por qPCR

Las líneas celulares de la presente invención designadas 10RPE8, 4D20.8, 4D20.9, 4SKEL20, 7PEND12, 7PEND24, 7PEND30, 7PEND9, 7SKEL4, 7SKEL7, 7SM0025, 7SM0032, 7SM007, 7SM009, B16, C4.4, C4ELS5.1, C4ELS5.6, C4ELSR10, C4ELSR2, CM02, E109, E111, E120, E15, E164, E33, E44, E68, E69, E85, EN1, EN13, EN16, EN18, EN2, EN22, EN23, EN26, EN27, EN31, EN4, EN42, EN47, EN5, EN51, EN55, EN7, EN8, F15, J16, MEL2, MEL2, MW1, RAD20.16, RAD20.19, RAD20.4, RAD20.5, RAD20.6, RAPEND10, RAPEND15, RAPEND18, RASKEL8, RASM012, RASM019, SK11, SK17, SK18, SK25, SK31, SK35, SK43, SK44, SK46, SK47, SK49, SK50, SK52, SM17, SM2, SM22, SM28, SM28, SM30, SM33, SM8, T14, T20, T36, T42, T43, T44, T7, U31, W10, W11, W8, Z1, Z11, Z2, y Z3 se expandieron in vitro >21 duplicaciones de la expansión clonal ya que se aislaron a partir de las células derivadas de hES, sincronizadas en quiescencia creciendo hasta la confluencia y reemplazando los medios por medios complementados con una reducción de 10 veces en suero u otros mitógenos como se describe en la presente memoria. El ARN se extrajo de estas células como control. En un escrutinio de bajo rendimiento para células capaces de desarrollar condrogénesis in vitro, las células se cultivaron en condiciones de micromasa para inducir condrogénesis como se describe en la presente memoria durante 14 días. El ARN de cada una de estas dos condiciones se convirtió en ADNc y a continuación se examinó la expresión de genes comúnmente asociados con la condrogénesis (es decir, *COL2A1*, *COMP*, *CILP*, *SCX*, *CRTL1*, *SOX9*, *BARX2*). Se obtuvieron sondas de pares de cebadores específicos de gen de Invitrogen. Las muestras para la prueba se prepararon en placas de reacción de 96 pocillos Optical convencionales (Applied Biosystems Carlsbad, CA, PN 4306737) que consistían en 30 ng de ARN equivalente de ADNc, 0,4 µM por cebador, agua destilada Ultra-Pure (Invitrogen), diluida 1:1 con 12,5 ul de Mezcla Maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems Carlsbad, CA, Núm. de Cat. 4367659) que incorpora la ADN polimerasa AmpliTaq Gold en un volumen de reacción total de 25 ul. La qPCR en tiempo real se ejecutó utilizando el Sistema de PCR en Tiempo Real Applied Biosystems 7500 con el soporte lógico SDSv1.2. Las condiciones de amplificación se establecieron a 50°C durante 2 min. (fase 1), 95°C durante 10 min. (fase 2), 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, después 60°C durante 1 minuto (fase 3), con una fase de disociación a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos (fase 4). Los valores de Ct para los productos de amplificación de los genes de interés se normalizaron al valor de Ct promedio de 3 genes constitutivos (GAPD, RPS10 y GUSB), y se analizó la expresión génica en relación con la de los Condrocitos Articulares Humanos Normales (Lonza) de rodilla de pase temprano y células madre mesenquimales de médula ósea humana

cultivadas.

Los conjuntos de cebadores utilizados para detectar genes condrogénicos fueron los descritos anteriormente: la expresión de *Col2A1* expresado como expresión doble en comparación con los condrocitos articulares humanos normales de pase temprano cultivados para las líneas escrutadas se muestra en la Figura 1. Los condrocitos articulares humanos normales (NHAC) de pase temprano se establecieron como valor 1,0. El nivel de expresión de *COL2A1* cuantificado como inducción doble en comparación con los NHAC, no estaba notablemente elevado en la mayoría de las líneas celulares, sino sorprendentemente elevado en un pequeño subconjunto de líneas, a saber, 7SM0032 réplica técnica 2 (expresión de NHAC 154x), 7SM0032 réplica biológica 2 (expresión de NHAC 137x), 4D20.8 2 réplica biológica (expresión de NHAC 130x), SM30 (expresión de NHAC 1287x), SM30 réplica biológica 2 (expresión de NHAC 13.494x), SM30 réplica técnica 2 (expresión de NHAC 1168x), E15 (expresión de NHAC 10.809x), E15 réplica técnica 2 (expresión de NHAC 9810x), MEL2 (expresión de NHAC 22x) y SK11 (expresión de NHAC 4x).

Sorprendentemente, hubo poca o ninguna correlación de la inducción de *COL2A1* con marcadores de uso común para mesénquima condrogénico tal como *SOX9*. Del mismo modo, se especuló que marcadores tales como *AQP1*, que era un marcador de células mesenquimales condrogénicas, estaba presente a un valor de RFU de fibroblastos dérmicos del prepucio que no inducía *COL2A1* en condiciones condrogénicas de micromasa y estaba ausente en las líneas celulares de la presente invención antes y después de la diferenciación. Por ejemplo, antes de la diferenciación, la expresión de *AQP1* estaba ausente (RFU 135 que es el fondo) en la línea SM30, ausente (RFU de 126) en SK11 y ausente (RFU 139) en la línea E15, a 18-21 duplicaciones de expansión clonal (véase West et al., 2008, Regenerative Medicine vol. 3(3) pág. 287-308, Tabla Complementaria II). Tampoco el nivel de expresión de *SOX9* en las líneas celulares indiferenciadas de la presente invención tuvo valor predictivo para pronosticar si una línea celular de la presente invención era susceptible de condrogénesis. De hecho, no se pudieron encontrar genes en las líneas indiferenciadas antes de la diferenciación que se correlacionaran suficientemente con el potencial de estas líneas para convertirse en condrocitos para pronosticar tal resultado. La diversidad de marcadores de expresión génica dentro del grupo de SK11, 7SM0032, 4D20.8, MEL2, SM30 y E15, incluyendo la expresión génica de homeobox específica del sitio, sugiere que cada línea represente un tipo único y distinguible de progenitor condrogénico. También resultó sorprendente que muchos de los genes comúnmente utilizados como marcadores de condrogénesis in vitro tales como *COMP* y *CILP* fueran inducidos en las condiciones de cultivo de una manera inespecífica en prácticamente cualquier tipo de células, incluyendo los fibroblastos dérmicos cultivados, independientemente de si dichos fibroblastos dérmicos, por ejemplo, eran capaces de experimentar una verdadera condrogénesis en las mismas condiciones que evidenciaba la expresión de *COL2A1* y de mostrar evidencia histológica de formación de cartílago. Además, las líneas celulares SK11, 7SM0032, 4D20.8, MEL2, SM30 y E15 se distinguían claramente de las MSC de médula ósea cultivadas en lo que respecta a los marcadores de expresión génica tanto antes como después de la diferenciación. Mientras que las MSC de la médula ósea se describen comúnmente como positivas para *ALCAM* (*CD166*), las líneas celulares de la presente invención en el estado indiferenciado tal como SK11, 7SM0032, 4D20.8, MEL2, SM30 y E15 mostraron que la expresión de *CD166* estaba ausente (RFU 125 que es el fondo) en la línea SM30, ausente (RFU de 164) en SK11 (véase West et al., 2008, Regenerative Medicine vol. 3(3) pág. 287-308, Tabla Complementaria II). Otra diferencia de las líneas celulares de la presente invención en comparación con las MSC, a modo de ejemplo no limitante, es la expresión de *CD74* que se ha demostrado que es un marcador más preciso de MSC que muchos de los marcadores de uso común que en realidad no son específicos (Ishii et al, 2005 BBRC 332:297-303). Como se muestra en la Tabla 3, las MSC indiferenciadas de hecho expresaron niveles muy altos de transcrito de *CD74*, las células madre de adipocitos también expresaron *CD74* a niveles más bajos, las células madre de pulpa dental expresaron *CD74* en los límites de detección, pero el transcrito no se detectó en absoluto en células indiferenciadas de la presente invención capaces de inducir *COL2A1*, incluyendo SK11, 7SM0032, 4D20.8, MEL2, SM30 y E15, ni en fibroblastos dérmicos cultivados ni en la línea progenitora embrionaria no condrogénica 7SM007. Un ejemplo adicional no limitante que demuestra la diversidad de las líneas y las notables diferencias con los tipos de células madre adultas estudiados en la presente memoria, es la expresión del gen de desarrollo *NNAT* (NM_181689.1) expresado a altos niveles en la línea celular E15, pero no en células madre adultas tales como MSC, células madre de adipocitos, células madre de pulpa dental o fibroblastos dérmicos. Otro ejemplo no limitante más de las diferencias sobresalientes de las líneas celulares de la presente invención capaces de inducir la expresión de *COL2A1* a partir de los tipos de células madre en la técnica se puede observar midiendo la expresión del gen *KCNK2* (NM_001017425.2) que se sabe que es un marcador de las MSC. Como se muestra en la Tabla 3, *KCNK2* se expresaba a niveles altos en las MSC, células madre de adipocitos y células madre de pulpa dental, pero no fue detectable en varias de las líneas de la presente invención capaces de inducir la expresión de *COL2A1* tales como SM30, E15, 4D20.8, MEL2 y SK11. También se observa una diferencia notable de las líneas celulares de la presente invención y las MSC derivadas de médula ósea en genes que indican diferencias terapéuticas importantes en los tipos de células. Las MSC sufren transformaciones en condrocitos hipertróficos cuando se diferencian in vitro. Los condrocitos hipertróficos expresan genes útiles para inducir la angiogénesis y proporcionan una matriz temporal que después es invadida por los osteoblastos para producir hueso. Por lo tanto, las MSC no funcionan bien cuando se inyectan en la articulación, o se trasplantan de otro modo al cartílago articular, en un esfuerzo por regenerar ese tejido para el tratamiento del trauma del cartílago articular, la artritis o usos relacionados. Las líneas celulares de la presente invención, cuando son inducidas por las condiciones condrogénicas en la presente memoria, inducen muy poca o ninguna expresión de *IHH*, un marcador de condrocitos hipertróficos, mientras que las MSC expresan niveles muy altos del transcrito *IHH*. De manera similar, la

5 línea 4D20.8 no expresa niveles detectables de *COL10A1*, otro marcador de condrocitos hipertróficos, mientras que las MSC expresan niveles muy altos del transcrito. Por lo tanto, las líneas celulares de la presente invención, tales como 7SM0032, 4D20.8, SM30 y E15 muestran marcadores de que son superiores a las MSC en su capacidad para diferenciarse a cartílago permanente para la reparación de la patología del cartílago articular. En la Tabla 3 se muestran otros ejemplos no limitantes de las diferencias en las líneas SK11, 7SM0032, 4D20.8, MEL2, SM30 y E15 en comparación con las MSC de médula ósea humana cultivada, células madre de adipocitos y células madre adultas de pulpa dental, o se pueden observar comparando los marcadores de expresión génica de las células con los descritos en la presente memoria, tal como en la Tabla 3. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las líneas celulares identificadas en este escrutinio son novedosas, que los marcadores comúnmente utilizados para identificar las MSC no pronostican la capacidad condrogénica en líneas celulares progenitoras embrionarias humanas, y que actualmente no existen marcadores que puedan pronosticar que dichas líneas celulares sean el pequeño subconjunto de líneas que responderían a estímulos condrogénicos al expresar marcadores verdaderos de condrogénesis. Se proporciona evidencia en el Ejemplo 7 de la evidencia histológica de formación de cartílago.

Tabla 3

15 Una comparación de los marcadores de expresión génica en células madre de adipocitos humanos (ACS), células madre mesenquimales de médula ósea humana (MSC), células madre de pulpa dental humana (DSPC), fibroblastos de prepucio humano cultivados (Fibro), una línea hEP clonal que no es capaz de inducir *COL2A1* 7SMOO7, y los progenitores embrionarios humanos SM30, E15, 4D20.8, 7SMOO32, MEL2 y SK11 capaces, cada uno, de inducir la expresión de *COL2A1*. Los números son los valores de RFU. La expresión negativa se indica mediante recuadros sombreados. (ND significa Sin Datos).

20

Gen	ASC	MSC	DPSC	SM30	E15	4D20.8	7SMO032	MEL2	SK11	7PEND24	Fibro	7SMO07
SOX9	+ 717	+ 112 8	+ 639	+/- 214	+ 452	+ 250	+ 139 7	+ 269	+ 386	+ 559	+ 322	+ 731
LHX8	- 81	- 76	+ 987	- 84	ND	+ 119 4	- 81	- 73	- 79	- 156	- 80	- 93
AQP1	- 108	- 102	- 105	- 105	- 139	- 97	- 106	- 104	- 109	- 97	- 96	- 99
CD166	+ 141 0	+ 290 1	+ 4031	- 125	+ 341	+ 292 1	+ 326 5	+ 263 3	+ 185 2	+ 226 1	+ 1733	+ 231 5
ENG	+ 349 7	+ 552 1	+ 1296	+ 236 9	+ 453	+ 279 8	+ 230 2	+ 185 6	+ 820	+ 726	+ 1729	+ 102 6
CD90	+ 473 9	+ 665 9	+ 1627 0	+/- 282	+ 742	+ 358 9	+ 902	+ 788	+ 617	- 100	+ 1343 9	+ 280 1
ITGA2	+ 563	+ 970	+/- 216	- 131	- 176	- 140	+ 426	- 52	- 184	+ 505	+/- 280	+/- 276
CD74	+ 990	+ 509 3	+/- 220	- 131	- 135	- 88	- 97	- 36	- 108	- 125	- 117	- 150
KCNK 2	+ 170 7	+ 202 5	+ 470	- 107	- 139	- 193	+ 382	- 39	- 106	- 108	+ 833	+ 280
NNAT	- 133	- 93	- 166	- 105	+ 109 0	- 94	- 117	- 100	- 99	- 134	- 101	- 93

Ejemplo de Referencia 7. Confirmación histológica e inmunoquímica de la formación de cartílago

5 Las líneas celulares de la presente invención, tales como las descubiertas en el escrutinio de bajo rendimiento en el
Ejemplo 6 anterior, muestran una inducción moderada a robusta de *COL2A1* tal como 7PEND24, 7SMO032, MEL2,
10 MSC, células madre de adipocitos y otras líneas celulares tales como fibroblastos dérmicos del prepucio, Z11, células madre de pulpa dental, 7SMO07, E44 y otras se
expusieron a condiciones condrogénicas de micromasa y sedimentos como se describe en la presente memoria
durante tiempos variables que incluían 1, 8, 14 y 21 días, y un subconjunto de dichos sedimentos cuando se
15 transfirieron a la cápsula renal de ratones SCID para promover la diferenciación extendida. Dichas micromasas y
sedimentos se fijaron en formalina y se analizaron histológicamente con tinciones H&E, tinción de proteoglicanos con
Safranina O como se describió anteriormente, y para *COL2A1* inmunorreactivo utilizando anticuerpo específico y
anticuerpo no específico como control. Se observó una fuerte reactividad con Safranina O y/o inmunorreactividad
con *COL2A1* en los sedimentos del día 14 y 21 de la línea 4D20.8 y una fuerte tinción con Safranina O en las
micromasas del día 14 de la línea E15. Sorprendentemente, la línea celular RAD20.6 mostró inmunorreactividad con
20 *COL2A1* y tinción con Safranina O en un sedimento del día 14. La Figura 2 muestra un ejemplo de la tinción con
Safranina O de células madre de tejido adiposo en comparación con las líneas 4D20.8 en el pase 14 en
comparación con las MSC en el pase 6, todo el día 21 de diferenciación en forma de un sedimento e inmunotinción
con controles de isotipo en sedimentos del día 14 de las líneas 4D20.8 y MSC.

Ejemplo de Referencia 8.

Las líneas celulares de la presente invención susceptibles de condrogénesis se sometieron a prueba para determinar la capacidad de reparar el cartílago articular de la siguiente manera: se explantó tejido articular humano donado. Se centrifugaron 5×10^5 células de las líneas SM30, E15 y 4D20.8 en un tubo cónico de 15 ml a 400 X g durante 5 minutos en FBS/DMEM/F12 al 10%, y se incubaron durante la noche para generar agregados celulares. Se extrajeron tapones cilíndricos de seis mm de diámetro de los explantes articulares con el Sistema Arthrex Single Use OATS (Naples, FI). Se utilizó una cureta quirúrgica para provocar defectos de espesor parcial de aproximadamente 2 mm de tamaño en la superficie articular. Los defectos se rellenaron con agregados celulares de SM30, E15 y 4D20.8 o controles que consistían en condrocitos articulares humanos primarios, cultivos en masa de condrocitos derivados de hES o células madre adultas derivadas de tejido adiposo (hASC). Los explantes de cartílago se incubaron en FBS/DMEM/F12 al 10%, en presencia o ausencia de TGF β 3. Después de 4 semanas, los explantes se fijaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con Safranina O para obtener la puntuación. Los niveles de expresión génica y las tinciones de la matriz en líneas celulares clonales seleccionadas fueron mayores utilizando las líneas celulares progenitoras clonales SM30, E15 y 4D20.8 que en hESC y ASC heterogéneas, y se acercaron a los niveles observados en las hAC. En los explantes de cartílago, el tejido de reparación se parecía al cartílago articular y estaba bien integrado en el tejido anfitrión circundante.

Ejemplo de Referencia 9

Las líneas celulares de la presente invención susceptibles de condrogénesis se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para experimentar condrogénesis en una matriz artificial. Las células de las líneas celulares 4D20.8 y 7PEND24 se expandieron, se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad, se lavaron con NaCl (155 mM), se centrifugaron nuevamente, y el sedimento se resuspendió a 20×10^6 en alginato al 1,2% (Lonza). La suspensión celular se introdujo en una jeringa de 1 ml y, a través de una aguja de 22 g, se dispuso gota a gota en un baño de CaCl₂ baño (102 mM). La gelificación es inmediata. Las cuentas se lavaron 3-5x con NaCl (155 mM), a continuación se lavaron una vez con Medio condrogénico (sin TGF) después de la inmersión en medio condrogénico. Las cuentas se colocaron en múltiples pocillos de placas de 6 pocillos y se alimentaron tres días a la semana durante 14 días. Las cuentas se lavaron a continuación con NaCl varias veces antes de la despolimerización por exposición al citrato de sodio (55 mM) durante 20 minutos. Después de centrifugar, el sedimento celular se lisó con RLT (Qiagen) y se extrajo el ARN total utilizando micro kits RNeasy (Qiagen) seguido de una etapa de trituración utilizando QiaShredder para mejorar el rendimiento. La expresión de *COL2A1* se determinó por qPCR como anteriormente. En el caso de la línea celular 4D20.8, hubo un aumento de 51 veces en la expresión de *COL2A1* en comparación con las condiciones normales de micromasa. En la línea celular 7SM0032, hubo un aumento de 2,88 veces en la expresión de *COL2A1* utilizando RGD-alginato en comparación con condiciones normales de micromasa. En el caso de la línea celular SK11, hubo un aumento de 179 veces en la expresión de *COL2A1* utilizando alginato en comparación con condiciones normales de micromasa. Además del alginato Lonza, también se prepararon cuentas de alginato unido a RGD (NovaMatrix). En el caso de 7PEND24, aunque solo indujo débilmente *COL2A1* en condiciones de micromasa, en las cuentas de alginato mostró un aumento de 45 veces en comparación con las condiciones de micromasa. 7PEND24 encapsulado en el complejo RGD-alginato no mostró una mejora de la expresión de *COL2A1* sobre las condiciones de micromasa, pero mostró una expresión 17 veces mayor de *COL2A1* en comparación con los condrocitos articulares humanos normales (NHAC). Del mismo modo, 7SM0032 que solo era débilmente condrogénico en condiciones de micromasa, expresó de manera robusta *COL2A1* en cuentas de RGD-alginato.

Utilizando la plataforma Illumina, el alginato RGD mostró una impresionante regulación por incremento de 449 veces de *COL2A1* en la línea 4D20.8.

Ejemplo de Referencia 10

Para determinar la estabilidad de las líneas a lo largo de los pases en serie *in vitro*, las líneas celulares 4D20.8, E15, SM30 y hbmMSC se sometieron a pases en serie con aislamiento periódico de ARN en el estado indiferenciado y en 14 micromasas y cuentas de alginato como se describió anteriormente (Ejemplo 9). La línea celular 4D20.8 en el pase 33 en comparación con P12 en cuentas de alginato mostró aproximadamente los mismos niveles de *COL2A1* mientras que hbmMSC no se pudieron comparar en pases comparables debido a la senescencia.

Ejemplo de Referencia 11 Implantación s.c. in vivo de hEP condrogénicos encapsulados en alginato

Las líneas progenitoras de células hES 4D20.8, E15, SM30, 7PEND24, MEL2 y controles de MSC de médula ósea humana, y los fibroblastos cutáneos del Gen x se aumentaron a escala, se desprendieron, se sedimentaron y se resuspendieron en preparaciones de alginato (Lonza al 1,2% o NovaMatrix al 1,5% con alginato unido a péptido RGD) a 20×10^6 células/ml. Para la gelificación y la encapsulación celular, se utilizó una jeringa estéril de 1 ml y la suspensión de alginato, después de cargarla en la jeringa, se descargó a través de una aguja 22G gota a gota en solución de CaCl₂ (102 mM) o se colocó en moldes de silicona en forma de fémur humedecidos previamente con CaCl₂ y a continuación se cubrieron con CaCl₂ 102 mM para una gelificación rápida completa.

Las construcciones con forma de fémur se retiraron de los moldes y se lavaron con NaCl (155 mM), al igual que las

cuentas de alginato (aproximadamente 1-2 mm de diámetro), seguido de inmersión en medio de diferenciación condrogénica que contenía dexametasona 0,1 uM y TGFβ3 recombinante humano (10 ng/ml). Las construcciones y las cuentas se alimentaron los lunes, miércoles y viernes. Doce días después las construcciones se implantaron s.c. en el hombro de ratones NOD-SCID y el día catorce se implantaron las cuentas de manera similar.

- 5 Seis semanas después de la implantación, el tejido se extirpó, se fijó con paraformaldehído al 4% durante 24 horas y a continuación se sumergió en alcohol del 70%.

La observación macroscópica reveló que ciertas construcciones de hEPC y cuentas eran fácilmente distinguibles de la fascia normal que subyace a la piel que adquiere una apariencia blanquecina. Explantes ilustrativos para el explante de alginato 4D20.8 (Figura 4A).

- 10 Para la evaluación histológica, las muestras se incluyeron en parafina, se seccionaron en secciones de 4um a intervalos de aproximadamente 100 um y se colocaron en portaobjetos que después se tiñeron con hematoxilina y eosina.

La Figura 5 muestra imágenes histológicas ilustrativas que muestran un aspecto similar a los condrocitos similar al del cartilago hialino para las líneas celulares 4D20.8 y E15.

- 15 **TABLA 4.**

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
MA03	50	B-26	B26	Illumina 1	4	71
MA03	51	B-2	B2	Illumina 1	9	69
MA03	52	B-29	B-29	Illumina 1	13	52
MA03	53	B-7	B7	Illumina 1	9	68
MA03	54	B-17	B17	Illumina 1	8	54
MA03	55	B-3	B3	Illumina 1	4	74
MA03	56	B-6	B6	Illumina 1	15	55
MA03	57	B-25	B25	Illumina 1	4	73
MA03	58	B-11	B11	Illumina 1	4	72
MA03	59	B-16	B16	Illumina 1	7	65
MA03	60	B-28	B28	Illumina 1	12	84
MA03	61	B-30	B30	Illumina 1	14	25
MA03	62	2-2	2-2 (Rep1), 2-2 (Rep2), 2.2	Illumina 1	1	89 (Rep1), 90 (Rep2)
MA03	63	2-1	2.1	Illumina 1	1	88
MA03	64	6-1	6.1	Illumina 1	9	70
MA03	65	B-12	B12	Illumina 1	12	82
MA03	66	B-4	B4	Illumina 1	5	83
MA03	67	B-14	B14	Illumina 1	NA	NA
MA03	68	5-4	5.4	Illumina 1	122	32
MA03	69	4-2	4.2	Illumina 1	11	37
MA03	70	2-3	2.3	Illumina 1	23	94
MA03	71	B-15	B15	Illumina 1	6	22
MA03	72	CM50-4	CM50.4	Illumina 1	NA	NA
MA03	73	CM0-3	CM0.3	Illumina 1	22	85
MA03	74	CM0-5	CM0.5	Illumina 1	22	86
MA03	75	CM50-5	CM50.5	Illumina 1	22	87

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
MA03	76	CM50-2	CM50.2	Illumina 1	NA	NA
MA03	77	CM0-2	CM0.2	Illumina 1	21	49
MA03	78	CM30-2	CM30.2	Illumina 1	10	42
MA03	79	CM20-4	CM20.4	Illumina 1	23	93
MA03	80	E26	E26	Illumina 1	NA	NA
MA03	81	E71	E71	Illumina 1	NA	NA
WA09	82	4-D20-9	4-D20-9	Illumina 1	NA	NA
WA09	83	4-SKEL-19	4-SKEL-19	Affymetrix	NA	NA
WA09	84	4-D20-8	4-D20-8	Affymetrix	NA	NA
MA03	85	E34	E34	Affymetrix	NA	NA
MA03	86	E51	E51	Illumina 1	36	24
WA09	87	C4.4	C4.4	Affymetrix	NA	NA
MA03	88	E3	E3	Illumina 1	30	75
MA03	89	E73	E73	Illumina 1	30	80
MA03	90	E93	E93	Illumina 1	NA	NA
MA03	91	E57	E57	Illumina 1	30	79
WA09	92	C4 ELSR #14	C4 ELSR #14	Illumina 1	NA	NA
MA03	93	E76	E76	Affymetrix	NA	NA
MA03	94	E17	E17	Illumina 1	NA	NA
MA03	95	E40	E40	Illumina 1	32	28
MA03	96	E8	E8	Affymetrix	NA	NA
MA03	97	E67	E67	Illumina 1	30	76
MA03	98	E15	E15	Illumina 1	26	26
MA03	99	E45	E45	Illumina 1	34	47
MA03	100	E72	E72	Illumina 1	7	66
MA03	101	E69	E69	Illumina 1	28	16
MA03	102	E75	E75	Illumina 1	7	67
MA03	103	M10	M10	Affymetrix	NA	NA
MA03	104	M13	M13	Affymetrix	NA	NA
MA03	105	E19	E19	Illumina 1	29	27
WA09	106	T44	T44	Illumina 1	114	18
MA03	107	E61	E61	Illumina 1	NA	NA
WA09	108	C4 ELSR #18	C4 ELSR #18	Illumina 1	41	97
WA09	109	RA-SKEL-8	RA-SKEL-8	Illumina 1	78	147
WA09	110	4-SKEL-8	4-SKEL-8	Affymetrix	NA	NA
WA09	111	RA-PEND-15	RA-PEND-15	Illumina 1	NA	NA
MA03	112	E108	E108	Affymetrix	NA	NA
MA03	113	E35	E35	Illumina 1	NA	NA
MA03	114	E33	E33	Illumina 1	31	46

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
MA03	115	E80	E80	Affymetrix	NA	NA
MA03	116	E84	E84	Illumina 1	30	78
MA03	117	E109	E109	Affymetrix	NA	NA
WA09	118	C4 ELS5 #6	C4 ELS5 #6	Illumina 1	38	9
MA03	119	J8	J8	Illumina 1	65	96
WA09	120	T43	T43	Illumina 1	114	17
MA03	121	E10	E10	Illumina 1	NA	NA
WA09	122	RA-PEND-6	RA-PEND-6	Illumina 1	NA	NA
WA09	123	RA-PEND-10	RA-PEND-10	Affymetrix	NA	NA
WA09	124	RA-SKEL-3	RA-SKEL-3	Illumina 1	NA	NA
WA09	125	RA-SKEL-21	RA-SKEL-21	Affymetrix	NA	NA
WA09	126	4-SKEL-4	4-SKEL-4	Affymetrix	NA	NA
WA09	127	4-SKEL-20	4-SKEL-20	Affymetrix	NA	NA
WA09	128	RA-PEND-4	RA-PEND-4	Illumina 1	NA	NA
WA09	129	RA-PEND-18	RA-PEND-18	Affymetrix	NA	NA
WA09	130	C4 ELS5 #1	C4 ELS5 #1	Illumina 1	16	98
WA09	131	C4 ELSR #12	C4 ELSR #12	Illumina 1	18	99
MA03	132	E163	E163	Illumina 1	NA	NA
WA09	133	C4 Mesen. # #3	C4 Mesen. # #3	Illumina 1	20	45
MA03	134	G6	G6	Illumina 1	NA	NA
WA09	135	C4 ELS5 #5	C4 ELS5 #5	Illumina 1	17	100
MA03	136	J16	J16	Illumina 1	64	95
WA09	137	SK46	SK46	Illumina 1	92	186
WA09	138	SK47	SK47	Illumina 1	93	184
WA09	139	EN2	EN2	Illumina 1	47	167
WA09	140	EN26	EN26	Illumina 1	49	160
WA09	141	EN31	EN31	Illumina 1	52	172
WA09	142	SM2	SM2	Illumina 1	98	115
WA09	143	SM4	SM4	Illumina 1	105	109
WA09	144	EN4	EN4	Illumina 1	54	163
WA09	145	EN5	EN5	Illumina 1	57	162
WA09	146	SK52	SK52	Illumina 1	81	203
WA09	147	SK43	SK43	Illumina 1	81	202
WA09	148	SK30	SK30	Illumina 1	88	176
WA09	149	SM42	SM42	Illumina 1	107	116
WA09	150	SM28	SM28	Illumina 1	101	112
WA09	151	SM49	SM49	Illumina 1	109	114
WA09	152	C4 ELSR #10	C4 ELSR #10	Affymetrix	NA	NA

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
WA09	153	RA-SKEL-11	RA-SKEL-11	Illumina 1	NA	NA
WA09	154	RA-SMO-12	RA-SMO-12	Illumina 1	NA	NA
WA09	155	RA-D20-16	RA-D20-16	Illumina 1	72	58
WA09	156	SM22	SM22	Illumina 1	99	110
WA09	157	SK5	SK5	Illumina 1	94	148
WA09	158	SK18	SK18	Illumina 1	84	185
WA09	159	SK50	SK50	Illumina 1	81	199
WA09	160	SK54	SK54	Illumina 2	89	135
MA03	161	J4	J4	Illumina 1	NA	NA
WA09	162	SK17	SK17	Illumina 1	83	3
WA09	163	SK26	SK26	Illumina 1	85	198
WA09	164	SK31	SK31	Illumina 2	89	134
WA09	165	SK32	SK32	Illumina 1	90	189
WA09	166	SM25	SM25	Illumina 1	100	107
WA09	167	C4 ELSR # 2 (Bio 1)	C4 ELSR # 2 (Bio 1)	Illumina 1	19	102
WA09	167	C4 ELSR # 2 (Bio 2)	C4 ELSR # 2 (Bio 2)	Illumina 1	19	103
WA09	167	C4 ELSR # 2 (Bio 3)	C4 ELSR # 2 (Bio 3)	Illumina 1	19	101
WA09	168	SK3	SK3	Illumina 1	NA	NA
WA09	169	SK53	SK53	Illumina 1	82	193
MA03	170	E44	E44	Illumina 1	33	12
MA03	171	E65	E65	Affymetrix	NA	NA
MA03	172	J13	J13	Illumina 1	63	5
WA09	173	EN1	EN1	Illumina 1	45	154
WA09	174	EN13	EN13	Illumina 1	43	149
WA09	175	EN42	EN42	Illumina 1	55	164
WA09	176	EN47	EN47	Illumina 1	56	152
WA09	177	SM27	SM27	Illumina 1	NA	NA
MA03	178	E50	E50	Illumina 1	35	56
MA03	179	E30 (Bio1)	E30 (Bio1)	Affymetrix	NA	NA
MA03	179	E30 (Bio2)	E30 (Bio2)	Illumina 1	30	77
MA03	180	E122	E122	Affymetrix	NA	NA
WA09	181	SK61	SK61	Illumina 1	82	190
WA09	182	SM17	SM17	Illumina 1	96	122
WA09	183	SM33	SM33	Illumina 1	104	125
WA09	184	EN7	EN7	Illumina 1	43	150
WA09	185	EN55	EN55	Illumina 1	61	161
WA09	186	T7	T7	Illumina 2	86	14

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
WA09	187	EN22	EN22	Illumina 1	NA	NA
WA09	188	SK58	SK58	Affymetrix	NA	NA
WA09	189	MW2	MW2	Illumina 1	67	187
WA09	190	SK8	SK8	Illumina 1	95	195
WA09	191	SK20	SK20	Illumina 1	NA	NA
WA09	192	SK60	SK60	Illumina 1	82	191
WA09	193	MW6	MW6	Illumina 1	68	188
WA09	194	Z11 (Rep 1)	Z11 (Rep 1)	Illumina 1	139	104
WA09	194	Z11 (Rep 2)	Z11 (Rep 2)	Illumina 1	139	105
WA09	195	Z6	Z6	Illumina 1	138	120
WA09	196	W10	W10	Illumina 1	42	166
WA09	197	W11	W11	Illumina 1	117	157
WA09	198	T36	T36	Illumina 1	113	20
WA09	199	EN27	EN27	Illumina 1	50	159
WA09	200	Z7	Z7	Illumina 1	138	118
WA09	201	SM44	SM44	Illumina 1	108	113
WA09	202	EN38	EN38	Illumina 1	53	171
WA09	203	SK1	SK1	Illumina 1	79	182
WA09	204	SK44	SK44	Illumina 1	81	201
WA09	205	SK57	SK57	Illumina 1	87	197
MA03	206	J2	J2	Affymetrix	NA	NA
MA03	207	E68	E68	Illumina 1	37	11
MA03	208	E169	E169	Illumina 1	28	15
MA03	209	E164	E164	Illumina 1	27	53
WA09	210	T42	T42	Illumina 1	113	21
WA09	211	T14	T14	Illumina 1	111	19
WA09	212	RA-D20-6	RA-D20-6	Affymetrix	NA	NA
WA09	213	Z8	Z8	Illumina 1	100	108
WA09	214	SK40	SK40	Illumina 1	91	183
WA09	215	EN11	EN11	Illumina 1	42	165
WA09	216	EN18	EN18	Illumina 1	45	153
WA09	217	EN23	EN23	Illumina 1	NA	NA
WA09	218	SK14	SK14	Illumina 1	82	192
WA09	219	SK10	SK10	Illumina 1	80	181
WA09	220	EN51	EN51	Illumina 1	59	173
WA09	221	EN16	EN16	Illumina 1	44	158
MA03	222	E53	E53	Illumina 1	NA	NA
MA03	223	E111	E111	Illumina 1	24	48
WA09	224	SK49	SK49	Illumina 1	NA	NA

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
WA09	225	SM8	SM8	Illumina 1	110	106
WA09	226	RA-D20-5	RA-D20-5	Illumina 1	74	57
WA09	227	RA-D20-24	RA-D20-24	Affymetrix	NA	NA
WA09	228	W7	W7	Affymetrix	NA	NA
WA09	229	4-D20-14	4-D20-14	Illumina 1	NA	NA
WA09	230	RA-D20-19	RA-D20-19	Illumina 1	73	59
WA09	231	T20	T20	Affymetrix	NA	NA
WA09	232	RA-SMO-19	RA-SMO-19	Illumina 1	NA	NA
MA03	233	M11	M11	Affymetrix	NA	NA
WA09	234	EN9	EN9	Illumina 1	NA	NA
WA09	235	Q7	Q7	Illumina 1	71	194
WA09	236	U31	U31	Illumina 1	116	64
WA09	237	EN19	EN19	Illumina 1	46	175
WA09	238	C4 ELS5 #8	C4 ELS5 #8	Illumina 1	39	8
WA09	239	Q8	Q8	Illumina 1	NA	NA
WA09	240	SK25	SK25	Affymetrix	NA	NA
WA09	241	EN20	EN20	Affymetrix	NA	NA
WA09	242	MW1	MW1	Illumina 2	66	4
WA09	243	C4 ELSR #13	C4 ELSR #13	Illumina 1	40	10
WA09	244	Z3	Z3	Affymetrix	NA	NA
WA09	245	W8 (Rep 1)	W8 (Rep 1)	Illumina 1	120	151
WA09	245	W8 (Rep 2)	W8 (Rep 2)	Affymetrix	NA	NA
WA09	246	SK28	SK28	Illumina 1	87	196
MA03	247	E120	E120	Illumina 1	25	44
WA09	248	SM51	SM51	Illumina 1	NA	NA
WA09	249	EN8	EN8	Illumina 1	NA	NA
WA09	250	SK11	SK11	Illumina 1	81	200
WA09	251	EN43	EN43	Affymetrix		
WA09	252	4-D20-3	4-D20-3	Affymetrix	NA	NA
WA09	253	EN44	EN44	Illumina 1	NA	NA
WA09	254	EN50	EN50	Illumina 1	58	178
WA09	255	Z2	Z2	Illumina 1	140	117
WA09	256	SM30	SM30	Illumina 1	103	124
WA09	257	EN53	EN53	Illumina 1	60	179
WA09	258	SK27	SK27	Illumina 1	86	13
WA09	259	U18	U18	Illumina 1	115	62
WA09	260	SM35	SM35	Illumina 1	NA	NA
WA09	261	EN25	EN25	Illumina 1	48	174
WA09	262	C4 ELSR 6	C4 ELSR 6	Affymetrix	NA	NA

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
WA09	263	Z1	Z1	Illumina 1	138	119
MA03	264	F15	F15	Affymetrix	NA	NA
WA09	265	RA-SKEL-9	RA-SKEL-9	Illumina 1	NA	NA
MA03	266	E85	E85	Affymetrix	NA	NA
WA09	267	W4	W4	Illumina 1	88	177
WA09	268	MEL-2	MEL-2	Affymetrix	NA	NA
WA09	269	LS2	LS2	Illumina 1	NA	NA
WA09	270	7-SKEL-4	7-SKEL-4	Illumina 2	129	130
WA09	271	7-SKEL-7	7-SKEL-7	Illumina 2	129	132
WA09	272	7-PEND-9	7-PEND-9	Illumina 2	125	128
WA09	273	7-PEND-16	7-PEND-16	Illumina 2	125	127
WA09	274	7-SKEL-6	7-SKEL-6	Illumina 2	129	131
WA09	275	LS3	LS3	Illumina 1		
WA09	276	7-SMOO-19	7-SMOO-19	Illumina 2	131	140
WA09	277	7-SMOO-29	7-SMOO-29	Illumina 2	134	141
WA09	278	7-SMOO-32	7-SMOO-32	Illumina 2	135	136
WA09	279	7-SMOO-33	7-SMOO-33	Illumina 1	NA	NA
WA09	280	7-SMOO-4	7-SMOO-4	Illumina 1	NA	NA
WA09	281	7-SMOO-9	7-SMOO-9	Illumina 2	134	142
WA09	282	7-SMOO-17	7-SMOO-17	Illumina 1	NA	NA
WA09	283	7-PEND-24	7-PEND-24	Illumina 2	124	156
WA09	284	7-SKEL-32	7-SKEL-32	Illumina 1	NA	NA
WA09	285	7-SMOO-13	7-SMOO-13	Illumina 1	NA	NA
WA09	286	7-SMOO-25	7-SMOO-25	Illumina 2	132	168
WA09	287	7-SMOO-12	7-SMOO-12	Illumina 2	130	138
WA09	288	7-PEND-30	7-PEND-30	Illumina 2	126	126
WA09	289	7-SKEL-25	7-SKEL-25	Illumina 1		
WA09	290	7-SMOO-6	7-SMOO-6	Illumina 2	136	139
WA09	291	7-SMOO-26	7-SMOO-26	Illumina 2	133	137
WA09	292	7-SMOO-22	7-SMOO-22	Illumina 1	NA	NA
WA09	293	7-SMOO-8	7-SMOO-8	Illumina 1	NA	NA
WA09	294	7-SKEL-14	7-SKEL-14	Illumina 1	NA	NA
WA09	295	7-SKEL-11	7-SKEL-11	Illumina 1	NA	NA
WA09	296	7-SKEL-2	7-SKEL-2	Illumina 2	127	129
WA09	297	7-SKEL-22	7-SKEL-22	Illumina 2	128	133
WA09	298	7-SMOO-7	7-SMOO-7	Illumina 2	137	1
WA09	299	7-PEND-12	7-PEND-12	Illumina 2	124	155
WA09	300	7-SMOO-27	7-SMOO-27	NA	NA	NA
WA09	301	7-PEND-13	7-PEND-13	NA	NA	NA

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
WA09	302	7-PEND-11	7-PEND-11	NA	NA	NA
WA09	303	7-PEND-15	7-PEND-15	NA	NA	NA
WA09	304	7-PEND-32	7-PEND-32	NA	NA	NA
WA09	305	7-PEND-26	7-PEND-26	NA	NA	NA
WA09	306	7-SKEL-24	7-SKEL-24	NA	NA	NA
WA09	307	7-PEND-10	7-PEND-10	NA	NA	NA
WA09	308	7-PEND-23	7-PEND-23	NA	NA	NA
	309	10-RPE-9	10-RPE-9	NA	NA	NA
	310	10-RPE-8	10-RPE-8	NA	NA	NA
WA09	311	RA-PEND-19	RA-PEND-19	NA	NA	NA
MA03	N/A	X4.1	X4.1	Illumina 1	3	29
MA03	N/A	X4.3	X4.3	Illumina 1	3	31
MA03	N/A	B-10	B-10	Illumina 1	3	30
MA03	N/A	B-1	B-1	Illumina 1	2	39
MA03	N/A	X4	X4	Illumina 1	121	40
MA03	N/A	X5	X5	Illumina 1	123	81
MA03	N/A	B-20	B-20	Illumina 1	6	23
MA03	N/A	B-22	B-22	Illumina 1	10	41
MA03	N/A	X6	X6	Illumina 1	10	43
MA03	N/A	CM10.1	CM10.1	Illumina 1	11	33
MA03	N/A	X2	X2	Illumina 1	11	34
MA03	N/A	B-27	B-27	Illumina 1	11	35
MA03	N/A	B-9	B-9	Illumina 1	11	36
MA03	N/A	X4.4	X4.4	Illumina 1	11	38
MA03	N/A	E31	E31	Illumina 1	21	51
MA03	N/A	CM10-4	CM10-4	Illumina 1	23	91
MA03	N/A	CM30-5	CM30-5	Illumina 1	23	92
MA03	N/A	EN28	EN28	Illumina 1	51	170
WA09	N/A	Q4	Q4	Illumina 1	69	143
WA09	N/A	Q6	Q6	Illumina 1	70	180
WA09	N/A	RA-PEND-17 (Bio 1)	RA-PEND-17 (Bio 1)	Illumina 1	75	146
WA09	N/A	RA-PEND-17 (Bio 2)	RA-PEND-17 (Bio 2)	Affymetrix		
WA09	N/A	RA-SKEL-18 (Rep 1)	RA-SKEL-18 (Rep 1)	Illumina 1	76	144
WA09	N/A	RA-SKEL-18 (Rep. 2)	RA-SKEL-18 (Rep. 2)	Affymetrix	NA	NA
WA09	N/A	RA-SKEL-6	RA-SKEL-6	Illumina 1	77	145
WA09	N/A	SM19	SM-19	Illumina 1	97	121
WA09	N/A	SM29	SM-29	Illumina 1	102	111

ES 2 778 750 T3

Líneas celulares de hES parentales (WA09 o MA03)	Núm. ACTC	Línea celular	Sinónimos de línea celular	Grupo de micromatriz	Número de grupo NMF	Orden NMF
WA09	N/A	SM40	SM-40	Illumina 1	106	123
WA09	N/A	T23	T-23	Illumina 1	112	60
WA09	N/A	T4	T-4	Illumina 1	112	61
WA09	N/A	U30	U-30	Affymetrix	116	63
WA09	N/A	W2	W-2	Illumina 1	118	169
WA09	N/A	W3	W-3	Illumina 1	119	2
MA03	N/A	E11	E-11	Illumina 1	21	50
WA09	N/A	SK15	SK15	Affymetrix	NA	NA
MA03	N/A	E55	E55	Affymetrix	NA	NA
MA03	N/A	E132	E132	Affymetrix	NA	NA
WA09	N/A	RA-SMO-10	RASMO10	Affymetrix	NA	NA
WA09	N/A	RA-SMO-14	RASMO14	Affymetrix	NA	NA
WA09	N/A	W9	W9	Affymetrix	NA	NA
WA09	N/A	MW4	MW4	Affymetrix	NA	NA
WA09	N/A	SK16	SK16	Affymetrix	NA	NA

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, es evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden realizar en esta ciertos cambios y modificaciones.

5 En consecuencia, lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la materia podrán idear diversas disposiciones que, aunque no se describen o muestran explícitamente en la presente memoria, incorporan los principios de la invención. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional que se mencionan aquí están destinados principalmente a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los autores de la presente invención para avanzar en la técnica, y se deben interpretar que no se limitan a tales ejemplos y condiciones específicamente mencionados. Por otra parte, se pretende que todas las declaraciones en la presente memoria que mencionan principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como ejemplos específicos de la misma, abarquen tanto sus equivalentes estructurales como funcionales. Además, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto equivalentes actualmente conocidos como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura. No se pretende que el alcance de la presente invención, por lo tanto, se limite a las realizaciones ilustrativas mostradas y descritas en la presente memoria.

10

15

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> BioTime Inc.
West, Michael D.
Sternberg, Hal
Chapman, Karen B.
- <120> Métodos y composiciones para la condrogénesis in vitro e in vivo utilizando líneas celulares progenitoras embrionarias
- 10 <130> BIOT-024WOB
- <150> US 61/349,088
<151> 27-05-2010
- 15 <150> US 61/243,939
<151> 18-09-2009
- 20 <150> US 61/226,237
<151> 16-07-2009
- <160> 92
- <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- 25 <210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Cebador sintético
- 35 <400> 1
ccgacagcaa cgtggtctt 19
- <210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Cebador sintético
- 45 <400> 2
caggtggcc cagatgatg 19
- <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<223> Cebador sintético
- 55 <400> 3
tgctcagatt gcaaaagtgg 20
- <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Cebador sintético
- 65

<400> 4
 tatctgggaa acccacgaag 20

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 5
 cctggtcctg gaagtacat 20

15 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 6
 ccatgttgtc cactcaccag 20

25 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 7
 atccgtagag agcacggaga 20

35 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 8
 ggactctca tgggacaaga 20

45 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 9
 ggcaatagca gggtcacgta ca 22

55 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 10
 cgataacagt cttgccccac tt 22

5 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 11
 tggcctgaga cagcatga 18

15 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 12
 agtgttgga gccagattg 19

25 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 13
 atccgtagag agcacggaga 20

35 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 14
 ggactctca tggacaaga 20

45 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 15
 tacgactaca cggaccacca 20

55 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 16
 tcaaggtcga gtagctgtg 20
 5 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 17
 tccagctaca tctcgacct 20
 15 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 18
 cggctctgc tcaacttct 20
 25 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 19
 ggacttgct cagtctctgg 20
 35 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 20
 tgggatgga gttctcttg 20
 45 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 21
 ggctccaag gagtaagacc 20
 55 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador sintético
 65

<400> 22
 aggggtctac atggcaactg 20

5 <210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 23
 atttggctgt ggacgtggt 19

15 <210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 24
 tttggctgta agttattca atgc 24

25 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 25
 aaacgattgc agggttcac 20

35 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 26
 ctctcgctgg tgactgtca 20

45 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 27
 tctaccccaa tccagcaaac 20

55 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 28
 gttgggagcc agattgcat 20

5 <210> 29
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 29
 15 cacactggta agtggggcaa gaccg 25

 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 30
 25 acgaggctct cactggtgaa 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 31
 35 tgagtcctca agcctcctgt 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 32
 45 tggctgcag cagttgattc 20

 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 33
 55 acagctgggg acattagtg 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 34
 gtggaatgca gaggtggtt 20

5 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 35
 gctaagggtg aaaggggtc 20

15 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 36
 ctccaggatc acctttgga 20

25 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 37
 ggactctgtc acaccacct 20

35 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 38
 agctcggaga tgtcgtgtt 20

45 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 39
 agcatcattc ggctgttacc 20

55 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 40
 ctgaggggtg gaactgtagc 20

5 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 41
 cccatcagca tccttcat 20

15 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 42
 tgtagatgct cctgccacag 20

25 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 43
 accacgcttc ctatgtgacc 20

35 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 44
 tgttgtaact ggggtgcaaa 20

45 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 45
 tcgagggttt gatggacttc 20

55 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 46
 catcttctcc cctcattcca 20

5 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 47
 tggcaacaaa atcagcagag 20

15 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 48
 gccattgtca acagcagaga 20

25 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 49
 cctccaaggc aataggatca 20

35 <210> 50
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 50
 gctgcgcttg atctcgctc 19

45 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 51
 tgatctgcag tggctcattc 20

55 <210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 52
 aaaagagccc agctttgtga 20

5 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 53
 gtgctaaagg tgccaatggt 20

15 <210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 54
 accaggttca ccgctgttac 20

25 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 55
 gtgctaaagg tgccaatggt 20

35 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 56
 ctctctgctt tccttctct 20

45 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 57
 tcccaatctt gccttcattc 20

55 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 58
 gtcacggaac gccactaggt 20

5 <210> 59
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 59
 15 tcgaggacag cgaggcc 17

<210> 60
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 60
 25 tcgagggtgt agcgtgtaga ga 22

<210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 61
 35 caaggcacca tctccaggaa 20

<210> 62
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 62
 45 aaagggtatt tgggcagca tatt 24

<210> 63
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 63
 55 ttccacaagc acaaactta cacat 25

<210> 64
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 64
 gtgaaactga gtttgtata acctctcagt 30

5 <210> 65
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 65
 15 accagattga ccatattgat ga 22

 <210> 66
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 66
 25 ggacagatcc agctcaacc 19

 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 67
 35 aggcaagcaa aggagatgaa 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 68
 45 tgggtgtctg agaggcacag 20

 <210> 69
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 69
 55 actgagtcat ttgcagtgtt ttctgcc 27

 <210> 70
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 70
 gtgggctgat ccctccagg t 21

5 <210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 71
 tggcactgca ctggtagga 20

15 <210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 72
 aaggctggga gcccgctact 20

25 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 73
 tgagtctca agcctcctgt 20

35 <210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 74
 cctctgtctc cttgcaggtc 20

45 <210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 75
 ggccgggaga ccgtgtgtg 20

55 <210> 76
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sintético

65 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 76
 tggggctcgc ggtccagtaa 20

5 <210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

15 <400> 77
 tacgcctgga gagtggggcg 20

20 <210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador sintético

30 <400> 78
 tggggctcgc ggtccagtaa 20

35 <210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

45 <400> 79
 tcgtgggtcc caggggtgaa 20

50 <210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Cebador sintético

60 <400> 80
 gacctggagg gcctgtgcg 20

65 <210> 81
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <223> Cebador sintético

75 <400> 81
 tgctgccccca tctgccaac 20

80 <210> 82
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

85 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 82
 cctgcaggtc cctgaggccc 20

5 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

15 <400> 83
 agggccagga tgtccgcaa 20

20 <210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador sintético

30 <400> 84
 tctgccacga ggtccagggg 20

35 <210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

45 <400> 85
 cggggc gatg gcaccttgt 20

50 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Cebador sintético

60 <400> 86
 gatagaggcg gtggggcca 20

65 <210> 87
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <223> Cebador sintético

75 <400> 87
 acaatgacgg agtccctgac 20

80 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

85 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 88
 tctgcatcaa agtcgtctg 20

5 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 89
 15 gagtcagaga cgaacagcc 20

<210> 90
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 90
 25 agtcccagag actgagccaa 20

<210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 91
 35 gcgcaagtga aggctcgat 20

<210> 92
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 92
 45 gtttgagga gatgctctg ttg 23

50

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una línea celular progenitora embrionaria clonal para su uso en un método *in vivo* de generación de cartílago, comprendiendo la composición:
 - 5 (a) una línea celular progenitora embrionaria que expresa COL2A1 y es negativa para la expresión de CD74; y
 - (b) un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método *in vivo* de generación de cartílago.
2. Una composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la línea celular progenitora embrionaria también es negativa para la expresión de uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en: CD90, CD166, ITGA2, KCNK2 y combinaciones de los mismos.
- 10 3. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la línea celular progenitora embrionaria es adicionalmente negativa para la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: los genes HOX y PITX1.
4. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la línea celular progenitora embrionaria genera cartílago en ausencia de expresión del marcador COL10A1.
- 15 5. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método comprende administrar la composición de la línea celular progenitora embrionaria en el sitio del daño del cartílago donde está presente el daño del cartílago.
6. Una composición para su uso según la reivindicación 5, donde el daño del cartílago es daño del cartílago articular.
- 20 7. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el portador farmacéuticamente aceptable comprende una composición seleccionada del grupo que consiste en: Hetastarch; hialuronano y polímeros del mismo; condroitin sulfato; colágeno tipo I; colágeno tipo II; colágeno tipo III; polianhídrido, poliortoéster, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos; alginato; agarosa; poloxámeros; fibrina; quitina y quitosano y combinaciones de los mismos.
- 25 8. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la línea celular progenitora embrionaria se cultiva previamente en condiciones inductoras de condrocitos antes de la administración al sujeto.
9. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende adicionalmente medir la tasa de reparación del cartílago dañado a lo largo del tiempo.
- 30 10. El uso de un cultivo celular de una línea celular progenitora embrionaria purificada clonalmente que expresa COL2A1 y es negativa para la expresión de CD74 en condiciones de producción de cartílago, en un método *in vitro* de producción de cartílago.
11. El uso según la reivindicación 10, en donde la línea celular progenitora embrionaria también es negativa para la expresión de uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en: CD90, CD166, ITGA2 y KCNK2.
- 35 12. El uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la línea celular progenitora embrionaria es adicionalmente negativa para la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: los genes HOX y PITX1.
13. El uso según la reivindicación 12, en donde la línea celular progenitora embrionaria genera cartílago en ausencia de expresión del marcador COL10A1.
- 40 14. El uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la condición de producción de cartílago se selecciona entre una o más del grupo de condiciones de producción de cartílago que consisten en: condiciones de cultivo de condrocitos; impregnación de la línea celular progenitora embrionaria en matrices sintéticas o vehículos de inmovilización reabsorbibles biológicos; y colocación de la línea celular progenitora embrionaria en una estructura moldeada.
15. El uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el cartílago producido por la línea celular progenitora embrionaria se puede trasplantar a un sujeto.
- 45 16. Un kit que comprende:
 - (a) una línea celular progenitora embrionaria clonal que expresa COL2A1 y es negativa para la expresión de CD74; y
 - (b) reactivos para inducir la producción de cartílago a partir de la línea celular.
- 50 17. El kit de la reivindicación 16, en donde los reactivos para inducir la producción de cartílago comprenden reactivos de cultivo de condrocitos.

18. Una composición que comprende una línea celular progenitora embrionaria clonal que expresa COL2A1 y es negativa para la expresión de CD74; y reactivos para inducir la producción de cartílago a partir de la línea celular.

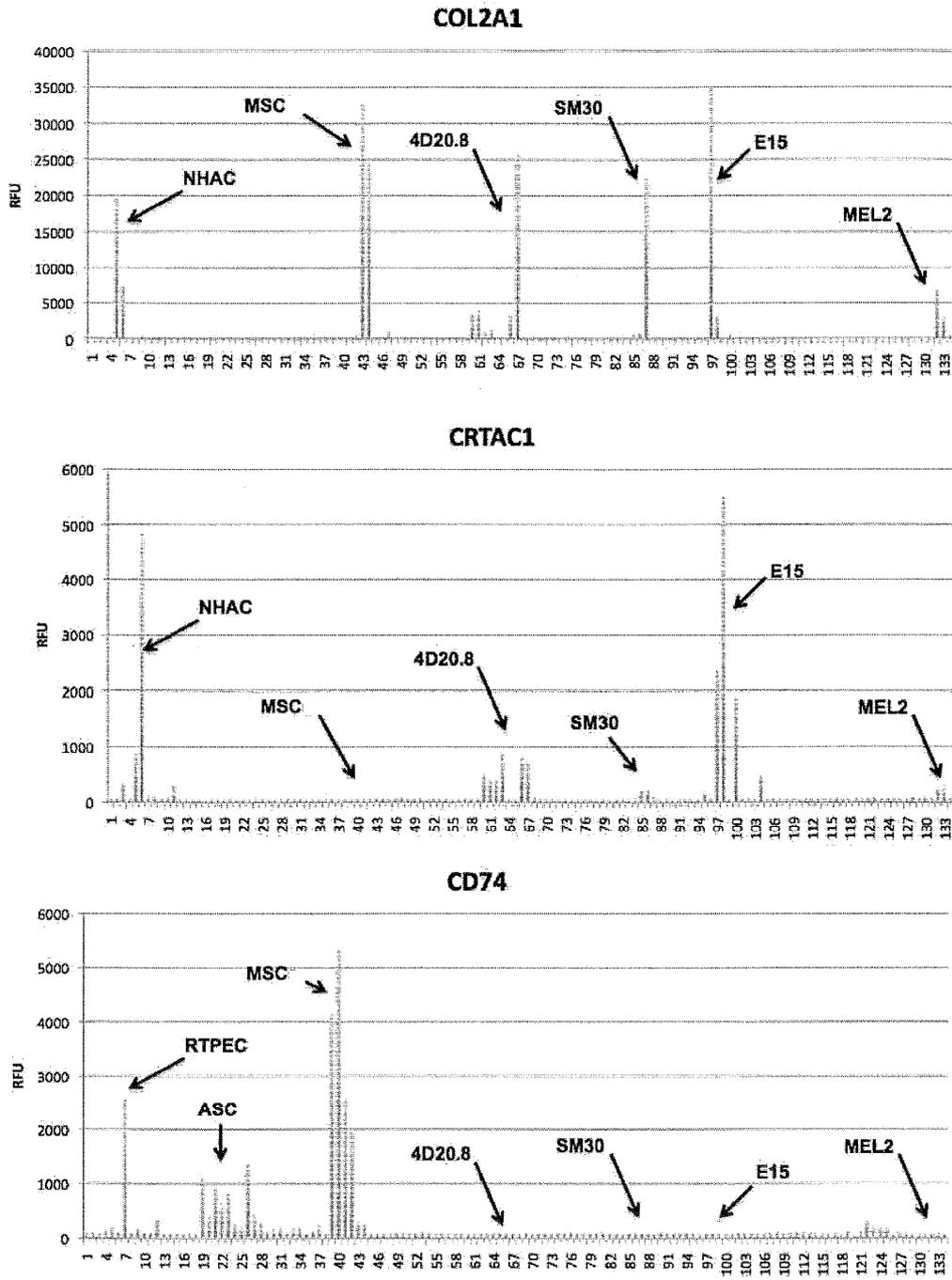


Fig. 2A

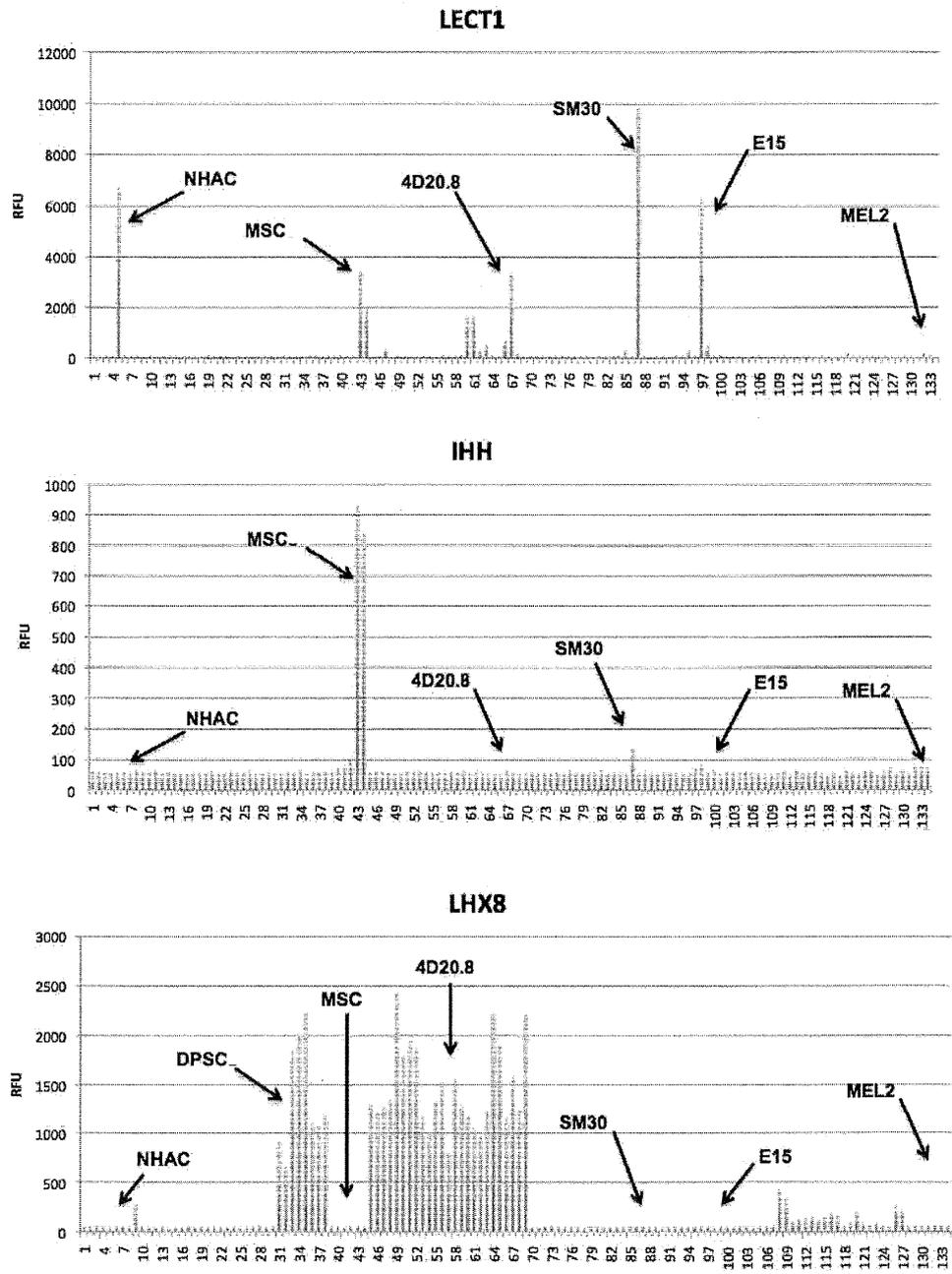


Fig. 2B

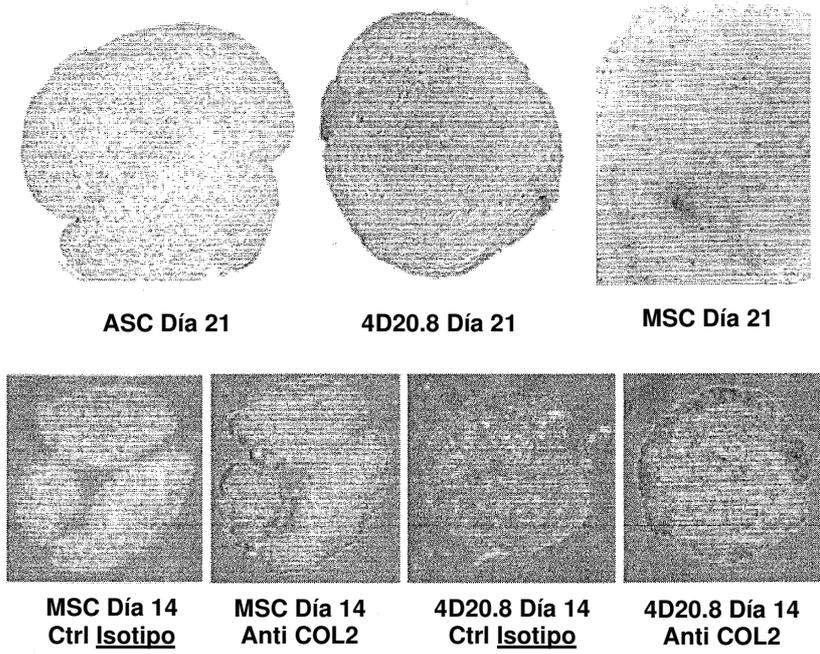
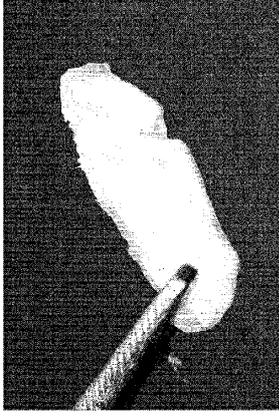


Fig. 3

A. 4D20.8: Implante en RGD-alginato extirpado



Implante extirpado inicial

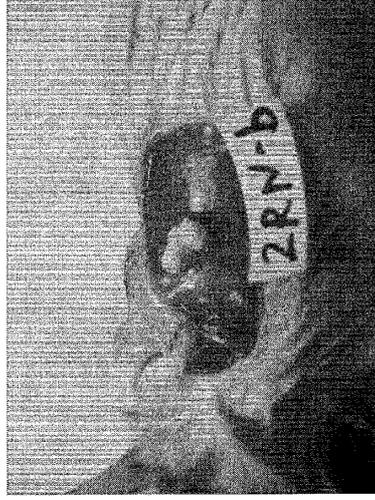


Implante extirpado recortado

B.



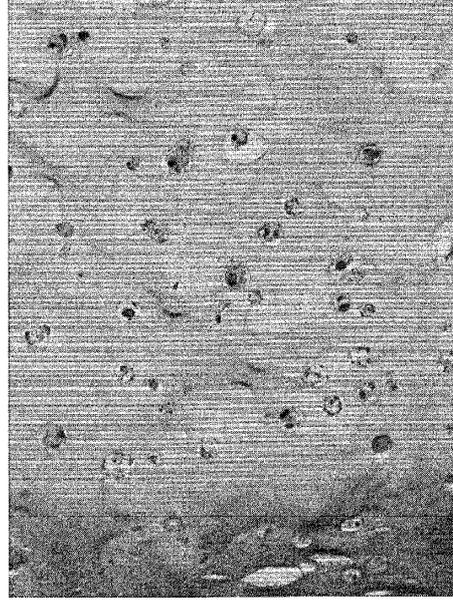
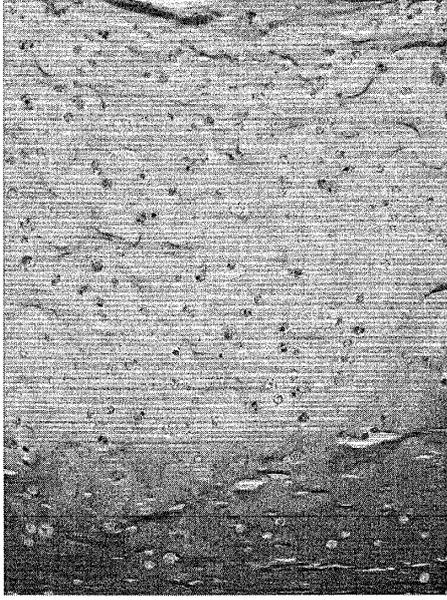
SM30 encapsulado en RGD Alginato



E15 encapsulado en RGD Alginato

Fig. 4

E15 (Superior 10x, Inferior 20x)



4D20.8 (Superior 10x, Inferior 20x)

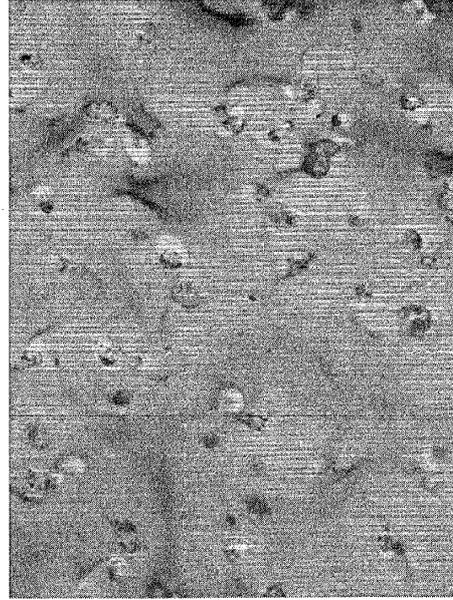


Fig. 5