

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 166**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2020** **PCT/EP2020/072237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2021** **WO21028335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2020** **E 20750291 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 4013466**

54 Título: **Método para la producción in vitro de tejido de cartílago hialino**

30 Prioridad:

**14.08.2019 EP 19191756**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2025**

73 Titular/es:

**VANARIX SA (100.00%)**  
**Avenue Mon-Repos 14**  
**1005 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**TIENG, VANNARY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 995 166 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la producción in vitro de tejido de cartílago hialino

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método novedoso para la producción *in vitro* de tejido de cartílago hialino ("Cartibeads"), y a usos terapéuticos y métodos de cribado que utilizan el tejido cartilaginoso así producido.

**Antecedentes de la invención**

10 El cartílago hialino está compuesto por células especializadas llamadas condrocitos, rodeadas por una matriz extracelular. Esta matriz es sintetizada y secretada por los condrocitos y está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo II, glicosaminoglicanos (GAG) y 60-80% de agua. El cartílago hialino tiene cuatro capas: capas superficial, intermedia, profunda y calcificada en la parte superior del hueso subcondral. Las propiedades biomecánicas del cartílago articular dependen en gran medida de la composición e integridad de la matriz extracelular.

15 El cartílago tiene una capacidad de autorreparación muy limitada y, tras una lesión, a menudo evoluciona hacia la osteoartritis (OA). El envejecimiento y los traumatismos repetitivos (p. ej., los que se producen durante la práctica deportiva intensiva) son los principales factores de riesgo para la degeneración del cartílago de la rodilla. La OA afecta a un gran número de personas y ocurre con mayor frecuencia en personas mayores (prevalencia > 10% en personas mayores de 60 años), mientras que las personas más jóvenes generalmente se ven afectadas por la OA después de lesiones articulares.

20 Los tratamientos quirúrgicos implican el reemplazo de la articulación por prótesis. Sin embargo, la vida útil de la prótesis se limita a 15-20 años. Además, el alivio del dolor no se atenúa por completo en la mayoría de los pacientes: del 20 al 30% de los pacientes con prótesis de rodilla siguen sintiendo molestias o dolor. Los tratamientos son en su mayoría paliativos y tienen como objetivo el alivio del dolor. Algunos agentes biológicos, como las células madre mesenquimales, el ácido hialurónico o la inyección de plasma rico en plaquetas, pueden retrasar el deterioro de las articulaciones, pero no promueven la regeneración de los tejidos.

25 Por el momento, las estrategias que utilizan andamios externos y sintéticos para rellenar el defecto no son satisfactorias e imitan de forma incompleta las propiedades biomecánicas del cartílago articular. Los tratamientos clásicos incluyen la cirugía de microfracturas para estimular la migración de las células madre a la zona lesionada o la implantación directa de condrocitos.

30 El procedimiento de microfracturas consiste en hacer orificios diminutos en el hueso subcondral con el objetivo de estimular la migración de las células madre mesenquimales desde la médula ósea al interior de un coágulo para formar nuevos condrocitos y reemplazar el tejido dañado.

35 En el implante de condrocitos autólogos (ACI), se extraían condrocitos del cartílago, se cultivaban en un número limitado de pases y se trasplantaban a la lesión. Para mejorar el método, se pueden usar matrices tales como colágeno porcino de tipo I/III o ácido hialurónico para cultivar los condrocitos (Kon E, et al., 2009, *The American journal of sports medicine* 37(1):33-41; Hettrich CM, Crawford D y Rodeo SA, 2008, 16(4):230-235). Estas matrices se aplican directamente sobre la lesión después del procedimiento de microfractura o se utilizan *in vitro* para cultivar condrocitos antes de la reimplantación (Ekkers JE, et al. 2013, *Osteoarthritis Research Society* 21(7):950-956).

40 Las terapias basadas en células que utilizan el trasplante de condrocitos autólogos (ACI) están indicadas para lesiones de cartílago de más de dos centímetros cuadrados (Armoiry X. et al. 2019, *Pharmacoeconomics* 37, 879-886). Los condrocitos representan una fuente de células lógicas para la regeneración del cartílago. De hecho, solo este tipo de células cartilaginosas están implicadas en el mantenimiento de la matriz de cartílago hialino.

45 Un desafío importante es que los condrocitos tienden a desdiferenciarse en células similares a fibroblastos en cultivo, dando como resultado una rápida pérdida de función, que generalmente ocurre en el segundo o tercer pase de células (Munirah, S. et al., 2010, *Tissue & cell* 42, 282-292) en sistemas de cultivo celular bidimensional. Los condrocitos desdiferenciados se caracterizan por la pérdida de la producción de glicosaminoglicanos (GAG) y colágeno tipo II, los principales constituyentes del cartílago hialino (Wu, L. et al. 2014, *Tissue Eng, Parte C Methods* 20, 160-168; Benya, P. D et al. 1978, *Cell*, 15, 1313-1321) que son sustituidos por colágeno de tipo I, presente en el fibrocartílago. De hecho, durante la etapa de amplificación, los condrocitos tienden a desdiferenciarse al perder su fenotipo original y se convierten en células similares a fibroblastos (células alargadas) con características similares a las de las células madre en la expresión génica (expresión de marcadores de superficie celular tales como CD73, CD90, CD105 utilizados para caracterizar las células madre mesenquimales (MSC)). Por ejemplo, los condrocitos extraídos del cartílago articular del paciente pierden rápidamente su capacidad condrogénica para sintetizar cartílago específico de matriz hialina después de unos pocos pases en cultivo *in vitro*. El fibrocartílago es biomecánicamente diferente del cartílago hialino y no se considera un tratamiento eficaz duradero porque conduce a una reparación disfuncional. Por el contrario, se sabe que las propiedades hialinas de los condrocitos se conservan en sistemas de cultivo tridimensionales (Benya, P. D. y Shaffer, J. D. 1982, *Cell* 30, 215-224), que imitan el entorno *in vivo*. Tay A G et al. describen que se compararon condrocitos de oído, nariz y costillas humanos con respecto a su idoneidad para generar

injertos de cartílago autólogos. Las células se expandieron durante dos pases en un medio que contenía suero bovino fetal al 10% sin (control) o con factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y PDGF-bb (TFP). Las células expandidas se cultivaron como sedimentos tridimensionales en un medio condrogénico exento de suero que contenía insulina, dexametasona y TGF- $\beta 1$ . Los condrocitos de las tres fuentes se aislaron con éxito, aumentaron su tasa de proliferación en respuesta a la TFP y se desdiferenciaron durante el pase (Tissue Engineering, Larchmont, NY, EE. UU., vol. 10, n.º 5-6., páginas 762-770).

La pérdida de la capacidad condrogénica en el cultivo es particularmente cierta en pacientes de edad avanzada. Por lo tanto, otro desafío para la terapia celular basada en condrocitos es la dificultad para expandir y diferenciar las células de los pacientes de edad avanzada, lo que limita su uso en esta población. En consecuencia, la mayoría de los ensayos clínicos limitan la inclusión de pacientes a los 55 años.

La idea de usar condrocitos para producir cartílago tiene sentido si la amplificación celular pudiera realizarse junto con el mantenimiento del fenotipo original. Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar un método estandarizado para la producción de cartílago que dé como resultado tejido cartilaginoso de tipo hialino de alta calidad (caracterizado por un alto nivel de detección de GAG), que imite las propiedades intrínsecas para pacientes de todas las edades

## Compendio de la invención

El principal logro del presente estudio es un método que puede revertir la pérdida del fenotipo de los condrocitos (desdiferenciación de condrocitos) durante la expansión. Esto resuelve un problema clave que se encuentra en la terapia celular que usa condrocitos como material de partida. Los presentes datos demuestran que un nuevo método de 3 etapas puede producir un cartílago de alta calidad con características hialinas, independientemente de la edad del paciente y del estado artrítico de la articulación.

El método de Cartibeads permite la expansión celular a partir de una muestra muy pequeña de cartílago extraído (~30 mg en el estudio preclínico con minicerdos de los autores de la invención), a diferencia de los 260 mg de media de la terapia celular convencional basada en condrocitos humanos (Brittberg, M. 2018. *Injury* 39 Suppl 1, S40-49), lo que reduce la morbilidad en el sitio donador. El presente método mostró una relación de GAG/Cartibead que es 20 veces mayor que la de los microtejidos de cartílago previamente descritos, lo que sugiere que estos microtejidos de cartílago son menos hialinos y contienen más fibrocartílago (Bartz, C. et al. 2016. *J Transl Med* 14, 317). De acuerdo con estos resultados, los autores de la invención obtuvieron en promedio una relación de GAG/ADN al menos tres veces superior a la de otros métodos publicados (Figura 2B) (Mumme, M. et al. 2016. *Lancet* 388, 1985-1994; Dang, P. N et al. 2014. *Tissue engineering. Parte A* 20, 3163-3175).

La rediferenciación se debía a la eliminación del FGF-2. Sin embargo, su eliminación en el cultivo 3D no era suficiente para inducir la síntesis de la matriz hialina en el método de 2 etapas. Lo más probable es que la rediferenciación de los condrocitos requiera la adhesión celular a un matraz recubierto con matriz y la inducción de vías de señalización celular específicas en el cultivo 2D.

Los autores de la invención han desarrollado un método novedoso para amplificar condrocitos en cultivo y hacer que recuperen su capacidad condrogénica independientemente de la edad del paciente a partir de un pequeño trozo de cartílago (~30 mg). En una primera etapa, las células se amplifican en un cultivo bidimensional sobre matriz extracelular con el apoyo de FGF-2, y luego se pre-rediferencian hacia el fenotipo original en una segunda etapa, eliminando el FGF-2 utilizado para la amplificación celular. En una etapa final, se logra la rediferenciación completa en un cultivo tridimensional (3D) con agregación celular espontánea para formar microtejidos. Al eliminar el factor de crecimiento FGF-2 en la segunda etapa específicamente en el cultivo 2D, los autores de la invención han demostrado sorprendentemente que los condrocitos comienzan a recuperar su función original sintetizando agregano, una proteína asociada con el GAG, y al mantener la eliminación del FGF-2 en la tercera etapa del cultivo 3D, el colágeno II es sintetizado en combinación con el GAG, produciendo así la matriz hialina específica del cartílago articular. Los autores de la invención demostraron además que la eliminación del FGF-2 induce la inactivación de la vía de señalización Wnt, preferiblemente la señalización Wnt7B después de la etapa de amplificación y, por lo tanto, permite la producción de cartílago hialino homogéneo que es altamente representativo del cartílago *in vivo*. Los autores de la invención demostraron que el Wnt7B se activa en medio de desdiferenciación (ME) y disminuye al menos 10 veces en medio de pre-rediferenciación (MR) y al menos 40 veces en medio de maduración (MI). El trasplante de microtejidos hialinos de alta calidad, con características lo más cercanas posible a las del cartílago nativo, es clave para prever el éxito a largo plazo en el tratamiento de las lesiones de cartílago (Negoro, T et al. 2018. *npj Regenerative Medicine* 3, 17; Madeira, C et al. 2015. *Trends in biotechnology* 33, 35-42).

Por lo tanto, el cartílago de ingeniería ("Cartibeads") tiene un alto potencial de integración total en la lesión del cartílago después del trasplante.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para la producción *in vitro* de tejido cartilaginoso hialino que comprende una primera etapa de cultivo de condrocitos, preferiblemente condrocitos aislados de un sujeto, más preferiblemente de tejido cartilaginoso de un sujeto humano o equino, en un sistema de cultivo adherente en un medio de cultivo de desdiferenciación que activa la ruta de señalización Wnt para obtener células de tipo fibroblástico, preferiblemente durante 10 a 15 días; una segunda etapa de cultivo de dichos condrocitos de tipo fibroblástico en un

sistema de cultivo adherente en un medio de cultivo de rediferenciación que inactiva la vía de señalización Wnt para obtener condrocitos con plena capacidad de resintetizar la matriz hialina, preferiblemente durante 4 a 8 días; y una tercera etapa de cultivo de dichos condrocitos obtenidos en la segunda etapa en un sistema de cultivo tridimensional en un medio de cultivo de inducción/maduración que mantiene la inactivación de la vía de señalización Wnt, preferiblemente durante 10 a 15 días.

En una realización preferida, dicho medio de cultivo de desdiferenciación comprende FGF-2, y dicho medio de cultivo de rediferenciación y medio de cultivo de inducción/maduración son medios exentos de FGF-2. Dicho medio de cultivo de desdiferenciación puede comprender al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en: PDGF-BB, TGF- $\beta$  y EGF. Dicho medio de cultivo de rediferenciación y dicho medio de cultivo de inducción/maduración pueden comprender TGF- $\beta$ , preferiblemente TGF- $\beta$ 3, más preferiblemente TGF- $\beta$ 3 y FGF-7. En otra realización, dicho medio de cultivo de rediferenciación puede comprender lisado plaquetario. En particular, todos los medios de cultivo descritos anteriormente pueden comprender suero. Dicho medio de cultivo de inducción/maduración puede comprender al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en: insulina, IGF-1, BMP-2, selenio, transferrina y etanolamina.

En una realización particular, dichos condrocitos se cultivan en la tercera etapa en una atmósfera de hipoxia que comprende menos de 10% de O<sub>2</sub> (v/v). En una realización, dichos condrocitos se cultivan en la etapa i) durante 10 a 15 días, en la etapa ii) durante 4 a 8 días, y/o en la etapa iii) durante 10 a 15 días. En una realización, dichos condrocitos de la etapa i) son condrocitos aislados de un sujeto, preferiblemente del tejido cartilaginoso de un sujeto humano o equino.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un tejido cartilaginoso de ingeniería en forma de esferoide (Cartibeads) que presenta un contenido de glicosaminoglicanos (GAG) por esferoide de entre 10 y 100  $\mu$ g/esferoide que se puede obtener mediante el método descrito anteriormente. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho tejido cartilaginoso de ingeniería y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al tejido cartilaginoso de ingeniería como se describió anteriormente o a la composición farmacéutica como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedad degenerativa del cartílago en un sujeto que lo necesite. En una realización, dicho tejido cartilaginoso de ingeniería o composición farmacéutica es para su uso en el trasplante autólogo en un sujeto que lo necesite. En otra realización, dicho tejido cartilaginoso de ingeniería o composición farmacéutica es para su uso en el trasplante alogénico en un sujeto que lo necesite.

Finalmente, la presente invención también se refiere a un método de cribado de moléculas que inhiben el proceso degenerativo del cartílago, que comprende poner en contacto el tejido cartilaginoso de ingeniería como se describió anteriormente con una o más moléculas candidatas y seleccionar las moléculas que inhiben el proceso degenerativo del cartílago.

## Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización de Cartibeads de ingeniería en un método de 3 etapas. a, Esquema del método de 3 etapas para la generación de Cartibeads derivados de condrocitos desdiferenciados: la etapa 1 (expansión), la etapa 2 (rediferenciación) se realizaron en 2D y en condiciones atmosféricas de oxígeno (21%), la etapa 3 (formación de Cartibead) se realizó en cultivo 3D y en condiciones hipóxicas de oxígeno (5%). b, figura de los estudios preclínicos: uso de Cartibeads humanos para evaluar su seguridad en ratones SCID y su eficacia en minicerdos. c, Análisis histológico de Cartibeads de muestras fijadas. Imágenes representativas de la tinción con safranina-O del GAG (panel superior) y fuerte inmunodetección del colágeno de tipo II (tinción con DAB, en el centro) que caracteriza el cartílago hialino, y detección débil de colágeno de tipo I (panel inferior) de Cartibeads obtenidos de 3 donantes independientes. Barra de escala 200  $\mu$ m. d, Cuantificación bioquímica del contenido de glicosaminoglicanos (GAG) en los Cartibeads expresado en  $\mu$ g/mg de tejido, determinado con el ensayo de azul de dimetilmetileno (DMMB), de 15 donantes (puntos negros) y de 3 controles de cartílago nativo (cuadrados), e, las propiedades biomecánicas de los Cartibeads se determinan por un ensayo de compresión (módulo de Young) que mide la elasticidad de los Cartibeads. Se representan las curvas de tensión-deformación de 3 donantes y muestran un aumento de la restricción con los Cartibeads más grandes.

Figura 2. Cantidad de GAG en Cartibeads de todos los donantes. a, Cuantificación bioquímica del contenido de GAG por Cartibead por ensayo de DMMB. b, Cuantificación bioquímica del contenido de GAG de Cartibead, normalizado respecto al contenido de ADN, expresado en la relación GAG/ADN ( $\mu$ g/ $\mu$ g).

Figura 3. Comparación de Cartibeads generados en niveles altos y bajos de oxígeno y en el método de 3 y 2 etapas. a, Vista macroscópica de los Cartibeads generados con el método de tres etapas en condiciones de bajo contenido de oxígeno para 3 donantes. b, La tinción con safranina O de GAG en las secciones de Cartibead se generó en cuatro condiciones diferentes para 1 donante. Los Cartibeads se generaron por el método de 3 y 2 etapas en condiciones de cultivo con niveles de oxígeno altos y bajos (21% y 5%). Las imágenes son representativas de 3 donantes. Barra de escala 200  $\mu$ m. c, Evaluación de la cantidad de GAG/Cartibead para 3 donantes en las 4 condiciones diferentes.

Figura 4. Estabilidad de los Cartibeads. a, Cuantificación bioquímica de GAG en los Cartibeads tras completar el método de 3 etapas y en los Cartibeads dejados durante 6 días adicionales a 37°C (incubadora con 5% de O<sub>2</sub>) y a 4°C y temperatura ambiente (TA) en recipientes cerrados. b, El número de células muertas dentro de los Cartibeads se evaluó cuantitativamente mediante una tinción con colorante rojo fluorescente. Los controles positivos para las células muertas eran Cartibeads tratados previamente con 10% de tritón antes de la tinción fluorescente. Barra de escala de 100 µm.

Figura 5. Mejora de las características hialinas de los Cartibeads de ingeniería a partir del método de 3 etapas en comparación con el método de 2 etapas. a, Esquema del método de 2 etapas para la generación de Cartibeads. Los condrocitos se expandieron en la etapa 1 en el medio E y se usaron directamente en la etapa 2 en el medio I para la generación de Cartibeads. b, Agrupamiento de anotaciones funcionales del análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes basado en la expresión de 3 etapas frente a 2 etapas. Los histogramas muestran el número de genes de cada familia de genes para los que se encontró un enriquecimiento significativo. En gris claro, los genes con mayor nivel de expresión en los Cartibeads del método de 3 etapas y en gris oscuro los genes con menor expresión. c, Visualización de los resultados de RNAseq con gráficos de volcán que muestran significación estadística (FDR<0,001) frente a la magnitud de cambio (cambio > 2 veces). El gráfico de volcán destaca los genes con cambios que son estadísticamente significativos, tales como *ACAN*, *COL2A1*, que aumentan en el método de tres etapas en comparación con el método de 2 etapas y *COL1A1* que disminuye. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01, d, e, f Datos del análisis de ARNseq que comparan los niveles de expresión del ARNm (en RPKM) para los genes *ACAN* (d), *COL2A1* (e) y *COL1A1* (f) en el método de 3 etapas y de 2 etapas. NA (no aplicable) se refiere a la ausencia de análisis debido a la ausencia de la propia etapa g, tinción con safranina-O de GAG en los Cartibeads producidos a partir del método de 3 etapas y el método de 2 etapas. Barra de escala 100 µm.

Figura 6. Expresión del marcador de MSC. a, Citometría de flujo que representa CD73, CD90 y CD105 de izquierda a derecha respectivamente. b, Estudio de diferenciación que compara el potencial de las células madre adiposas (ASC), células madre mesenquimales (MSC) y condrocitos para dar osteocitos, adipocitos y condrocitos. El rojo de alizarina S era un colorante usado para teñir depósitos de calcio, que son indicadores de osteocitos maduros (panel superior), lípidos neutros teñidos con aceite rojo O característicos de los adipocitos (panel central) y GAG teñido con safranina-O en condrocitos (panel inferior). Barra de escala de 100 µm.

Figura 7. La inhibición de la señalización WNT mejora la producción de componentes de la matriz hialina, a, Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes y agrupación funcional basada en los niveles de expresión diferenciales del medio R frente al medio E en el método de 3 etapas. El gráfico muestra el enriquecimiento para cada familia de genes (número de genes expresados diferencialmente). \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01, b, El gráfico de volcán de RNAseq resulta de condrocitos en el medio R frente al medio E en el método de 3 etapas. c. Los datos del análisis de RNAseq muestran la expresión del ARNm en RPKM para *ki67* (marcador proliferativo) (panel superior), *TCF4* (implicado aguas abajo de la vía wnt/beta catenina) (panel central) y *SOX9* (factor de transcripción implicado en la producción de matriz) (panel inferior). d, e, f Los datos del análisis de RNAseq muestran la expresión de ARNm en RPKM para *WNT5A* (d), *WNT5B* (e) y *WNT7B* (f) en condrocitos en medio E, R e I en el método de 3 y 2 etapas. NA (no aplicable) se refiere a la ausencia de análisis debido a la ausencia de la propia etapa. g, Las inmunotransferencias muestran la expresión de las proteínas indicadas en presencia del inhibidor de la señalización WNT XAV-939 (10 µM) en condrocitos. El histograma muestra el análisis densitométrico de la β-catenina y la axina en comparación con el control. h, i, La expresión del ARNm de *ACAN* y *COL2A1* se determinó mediante qPCR en condrocitos después de 4 días de cultivo en medio E, medio E+XAV-939 y en Cartibeads (método de 2 etapas) a partir de condrocitos cultivados en medio E y medio +XAV-839. j, Imagen representativa de la tinción con safranina-O del GAG en Cartibeads generados a partir de condrocitos cultivados en medio R (método de 3 etapas) y en medio E+XAV-939 (método de 2 etapas). Barra de escala 100 µm. k, El esquema resume la base molecular de la vía de señalización WNT en medio E y la inhibición de WNT cuando los condrocitos se cultivan en medio R o en medio E+XAV939, que permite la producción de una matriz hialina que contiene *ACAN* y colágeno de tipo II.

Figura 8. Viabilidad del injerto de Cartibeads en rodilla humana *ex vivo*. a, Vista macroscópica de un fémur distal después de artroplastia total de rodilla que muestra la lesión creada manualmente (izquierda) con un instrumento quirúrgico, los Cartibeads injertados el día 1 (centro), la lesión con las perlas 1 mes después del injerto (derecha) después del cultivo en rotación en el medio I. Barra de escala 4 mm, b, La tinción con safranina-O de GAG de una muestra de corte transversal del espécimen *ex vivo* muestra que los Cartibeads fusionados entre sí, permanecen hialinos y se integran con el cartílago nativo, como se muestra con un aumento mayor (panel izquierdo y derecho). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Barra de escala de 1 mm.

Figura 9. Ausencia de tumorigenicidad de los Cartibeads humanos tras injerto en ratones inmunodeficientes. a, Imagen representativa de un Cartibead (0,2 × 10<sup>6</sup> condrocitos/Cartibead) 2 meses después de la implantación (panel superior) y un tumor derivado de 5 perlas de A549 (0,2 × 10<sup>6</sup> células A549/perla) 6 semanas después del injerto (panel inferior) tras injerto subcutáneo en el lomo de los ratones (flechas negras, paneles de la izquierda). b, Desarrollo tumoral tras implante subcutáneo de 1 Cartibead, 1 o 5 perlas de células A549 por ratón SCID (n=10 a 14 ratones para un donante de Cartibead y 2x n=4 ratones por perlas de A549). c, Tinción con safranina-O de GAG en Cartibeads antes (panel central) y después del injerto (panel derecho). Barra de escala de 200 µm.

Figura 10. Integración de injertos hialinos en la rodilla de minicerdos después del trasplante de Cartibeads autólogos.

a, El esquema describe el sitio principal de la biopsia utilizado para la generación de Cartibeads y la cirugía secundaria que combina la creación de 5 lesiones/rodilla y el trasplante de Cartibeads autólogos. b, Cuantificación bioquímica de GAG ( $\mu\text{g}/\text{cartilago}$ ) para los 6 minicerdos. c-d, Vista macroscópica (panel izquierdo) y tinción con safranina-O de GAG de secciones de rodilla del minicerdo (panel central), los segmentos aumentados muestran la remodelación del tejido a los 3 y 6 meses después del trasplante. Los sitios de trasplante están marcados con un círculo negro, mientras que el círculo blanco representa la lesión vacía como control (panel derecho). La tinción representativa de la lesión trasplantada (panel central) y la lesión vacía (panel derecho) se muestra a los tres meses (c) y seis meses (d). Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

Figura 11. El trasplante de Cartibeads de cerdo en minicerdos genera un injerto hialino integrado. a, Tinción de GAG con safranina-O en los Cartibeads antes del trasplante (panel superior, barra de escala de 200  $\mu\text{m}$ ) y vista macroscópica de la rodilla (panel central) y tinción con safranina-O del GAG en la lesión injertada (panel inferior, barra de escala de 200  $\mu\text{m}$ ) para los 6 minicerdos utilizados en este estudio.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para la producción *in vitro* de tejido cartilaginoso que comprende tres etapas de cultivo de condrocitos como se describe a continuación.

Los condrocitos provienen de células mesenquimales que tienen un fenotipo característico basado principalmente en el tipo de matriz extracelular que producen. Las células precursoras producen colágeno de tipo I, pero cuando se comprometen con el linaje de los condrocitos, disminuyen la producción de colágeno de tipo I y comienzan a sintetizar colágeno de tipo II, que constituye una proteína sustancial de la matriz extracelular hialina. Además, los condrocitos comprometidos producen proteoglicanos, que son agregados asociados a los glicosaminoglicanos que están altamente sulfatados.

El término "condrocito", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula diferenciada (condrocito comprometido) obtenida del cartilago con plena capacidad para sintetizar matriz hialina. El término condrocito designa los cultivos primarios (recién aislados de biopsias), así como las células expandidas *in vitro*, incluidos los modificados genéticamente, immortalizados, seleccionados, conservados, etc.

#### Aislamiento de condrocitos del sujeto

Los condrocitos se aíslan de biopsias de tejido cartilaginoso maduro según métodos convencionales, usando, por ejemplo, digestión enzimática del tejido tal como tripsina, quimotripsina, collagenasa, desoxirribonucleasa, elastasa e hialuronidasa. El tejido cartilaginoso puede ser un trozo muy pequeño, preferiblemente de menos de 5 mm de diámetro (equivalente a ~30 mg). El tejido cartilaginoso es preferiblemente de mamífero, más preferiblemente cartilago humano o cartilago equino. El tejido cartilaginoso se puede recoger de un donante sano o de un paciente, preferiblemente de la rodilla, tobillo, cadera, dedo, hombro, más preferiblemente la rodilla o el tobillo del paciente.

#### Primera etapa: cultivo adherente en medio de desdiferenciación

Los condrocitos aislados se cultivan primero en un sistema de cultivo adherente en un medio de cultivo de desdiferenciación.

El sistema de cultivo adherente adecuado para usar en el método según la invención puede ser un sistema de cultivo en monocapa adherente o un sistema de cultivo en células nutrientes, preferiblemente un sistema de cultivo en monocapa adherente. El sistema de cultivo puede estar en cualquier forma adecuada para el método según la invención, en particular en forma de un matraz, una placa de múltiples pocillos o un plato.

Según una realización preferida, el sistema de cultivo adherente es un sistema de cultivo en monocapa adherente. Este sistema comprende un soporte sólido, por ejemplo vidrio o plástico, normalmente recubierto con una matriz o un sustrato que promueve la adherencia celular. El sustrato puede ser un sustrato proteico que consiste en factores de unión y que promueve la adhesión de las células al soporte. Estos factores de unión pueden seleccionarse en particular de poli-L-lisina, colágeno, fibronectina, laminina o gelatina.

Las matrices que imitan la matriz extracelular y que son adecuadas para usar en el método según la invención son bien conocidas por el experto en la técnica y hay muchas variedades disponibles en el mercado. Estas matrices comprenden, por ejemplo, matrices de tipo Matrigel™, Geltrex®, CellStart™ u otras matrices que comprenden una o más proteínas de anclaje tales como colágeno, laminina, fibronectina, elastina, proteoglicanos, aminoglicanos o vitronectina. También se pueden usar matrices tridimensionales de tipo hidrogel.

Según una realización preferida, la matriz es de tipo Matrigel™ o sustrato CellStart™.

Los condrocitos se cultivan en un sistema de cultivo adherente en un medio que permite amplificar y desdiferenciar las células a un estado precursor/indiferenciado, denominado estado fibroblástico (morfología de tipo fibroblástico). En particular, el medio de desdiferenciación es un medio de cultivo que permite tanto la proliferación como la desdiferenciación de los condrocitos a células de tipo fibroblástico, también denominadas condrocitos de tipo

fibroblástico, que son condrocitos desdiferenciados con una morfología de células de tipo fibroblástico y que presentan características de células madre. Preferiblemente, el medio de desdiferenciación permite desdiferenciar los condrocitos en células de tipo fibroblástico que expresan marcadores de superficie de células madre mesenquimales tales como CD105, CD90 y/o CD73. Las células de tipo fibroblástico son condrocitos desdiferenciados que han perdido la capacidad de sintetizar la matriz hialina (colágeno 2 y GAG). El medio de desdiferenciación es un medio basal que comprende al menos uno o más componentes que permiten que los condrocitos se amplifiquen y se desdiferencien a un estado indiferenciado.

Hay numerosos medios basales disponibles en el mercado y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Este medio puede ser un medio mínimo que comprenda particularmente sales minerales, aminoácidos, vitaminas y una fuente de carbono esencial para las células y un sistema tampón para regular el pH. El medio basal que puede usarse en el método según la invención incluye, por ejemplo, pero no se limita a, medio DMEM/F12, medio DMEM, medio RPMI, medio F12 de Ham, medio IMDM y medio DMEM KnockOut™ (Life Technologies).

Dependiendo del medio usado, puede ser necesario o deseable añadir glutamina, vitamina C, uno o más antibióticos tales como estreptomycin, penicilina y/o antimicóticos tales como Fungizone (anfotericina B).

Según la invención, el medio de desdiferenciación activa la ruta de señalización Wnt.

En estado activo, el ligando Wnt se une a los receptores frizzled y a su correceptor, la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas (LRP) 5/6. Esto activa dishevelled (DSH), que posteriormente inhibe la actividad de la GSK3β y la fosforilación de la β-catenina. La β-catenina se transloca al núcleo, donde interacciona con los factores de transcripción TCF/LEF (factor de transcripción específico de células T/factor de unión al potenciador linfóide). En estado inactivo, la β-catenina es fosforilada por la glucógeno sintasa quinasa (GSK) 3β y la β-catenina fosforilada sufre la posterior ubiquitinilación y degradación proteasomal.

En una realización preferida, el medio de desdiferenciación es un medio basal que comprende un compuesto que activa la señalización Wnt, preferiblemente la señalización Wnt7B.

La activación de la ruta de señalización Wnt puede determinarse midiendo en condrocitos desdiferenciados el nivel de expresión del ARN de wnt, en particular de wnt7B, wnt5A o wnt5B, preferiblemente el ARN de wnt7b y los genes diana posteriores de la vía de señalización Wnt, tales como el TCF4. La vía de señalización Wnt se activa en las células cuando el nivel de expresión del gen diana es al menos 1,5 veces mayor o 2, 3, 4, 5 veces mayor que en las células cultivadas sin dicho compuesto.

El nivel de expresión del ARNm puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Normalmente, estos métodos comprenden medir la cantidad de ARNm. Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la muestra se extrae primero de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, usando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas de unión a ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído luego se detecta mediante hibridación (p. ej., análisis de transferencia Northern), amplificación (p. ej., RT-PCR) o secuenciación (RNA-Seq).

El nivel de la proteína de los genes diana también puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Normalmente, estos métodos comprenden poner en contacto una muestra de células, preferiblemente un lisado celular, con una pareja de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína del gen diana presente en la muestra. La pareja de unión es generalmente un anticuerpo policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. La cantidad de proteína se puede medir, por ejemplo, mediante transferencias Western semicuantitativas, inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA, ensayos de tipo biotina/avidina, radioinmunoensayo, inmunoelectroforesis o inmunoprecipitación o mediante matrices de proteínas o anticuerpos.

En particular, el compuesto capaz de activar la ruta de señalización Wnt puede ser una proteína Wnt que se une a un receptor Wnt o un antagonista de GSK-3β de molécula pequeña, preferiblemente WNT7B, WNT5A o WNT5B, más preferiblemente WNT7B.

Dicho compuesto capaz de activar la ruta de señalización Wnt se puede seleccionar del grupo que consiste en: cloruro de litio (N.º CAS 7447-41-8), CHIR99021 (CAS N.º 252917-06-9), SB-216763 (CAS N.º 280744-09-4), BIO (6-bromoindirubin-3'-oxima) (N.º CAS 667463-62-9).

En una realización preferida, dicho compuesto es FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) también conocido como bFGF o forma básica del factor de crecimiento de fibroblastos.

La activación de la vía de señalización Wnt permite amplificar y desdiferenciar las células condrocitos a células de tipo fibroblástico. En una realización preferida, el medio de desdiferenciación comprende al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ng/ml de FGF-2. Preferiblemente, el medio comprende de 5 a 100 ng/ml de FGF-2, preferiblemente 20 ng/ml de FGF-2.

Según la invención, se puede usar cualquier molécula, tal como un polipéptido, que actúe sobre los condrocitos de manera similar a la molécula FGF2 en al menos un aspecto, preferiblemente para amplificar condrocitos en los métodos de la invención.

Los componentes adicionales que ayudan a los condrocitos a amplificar y rediferenciar las células a un estado indiferenciado no están particularmente restringidos y pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo del propósito. Algunos ejemplos del componente incluyen las proteínas morfogénicas óseas (BMP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1). Cada uno de los otros componentes descritos anteriormente se puede usar solo, o se puede usar una pluralidad de ellos en combinación con un compuesto capaz de activar la ruta de señalización Wnt.

En una realización particular, el medio de rediferenciación puede comprender además uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en: EGF, TGF- $\beta$  y PDGF-BB y cualquier combinación de los mismos. En esta realización, el EGF, PDGF-BB y TGF- $\beta$  están presentes cada uno en concentraciones en el intervalo de 1 a 100 ng/ml, preferiblemente en el intervalo de 5 a 50 ng/ml. En una realización más particular, dicho TGF- $\beta$  es TGF- $\beta$ 3.

En una realización particular, en los métodos según la invención, los condrocitos humanos se cultivan en un medio de rediferenciación que comprende FGF-2, PDGF-BB y TGF- $\beta$ 3, preferiblemente entre 5 y 100 ng/ml de FGF-2, entre 1 y 100 ng/ml de PDGF-BB y entre 1 y 100 ng/ml de TGF- $\beta$ 3, más preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de FGF-2, entre 5 y 50 ng/ml de PDGF-BB y entre 5 y 50 ng/ml de TGF- $\beta$ 3.

En otra realización particular, en los métodos según la invención, los condrocitos equinos se cultivan en un medio de rediferenciación que comprende FGF-2 y EGF, preferiblemente entre 5 y 100 ng/ml de FGF-2, y entre 1 y 100 ng/ml de EGF, más preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de FGF-2 y entre 5 y 50 ng/ml de EGF.

Según una realización preferida, el medio de rediferenciación comprende además suero de origen animal. En una realización preferida, se usa suero autólogo. También es posible utilizar suero xenogénico o alogénico. En particular, para el cultivo de condrocitos humanos, se puede usar suero autólogo del paciente humano o suero humano combinado. En una realización particular, para el cultivo de condrocitos equinos, se puede usar suero de ternero fetal. El medio comprende preferiblemente entre 2 y 20%, preferiblemente de 5 a 15%, más preferiblemente 10% de suero.

Según una realización particular, los condrocitos se ponen en contacto con el medio de rediferenciación durante 10 a 20 días, preferiblemente durante 10 a 15 días.

Las células preferiblemente se subcultivan de forma regular para evitar que el cultivo alcance la confluencia, es decir, que cubra toda la superficie disponible. De hecho, la confluencia induce un cese de la proliferación y cambios metabólicos no deseados. Las células pueden subcultivarse usando técnicas convencionales bien conocidas por el experto en la técnica. En particular, se pueden desprender de la matriz o del soporte mediante la acción de enzimas tales como la colagenasa IV o mediante pase mecánico en PBS o cualquier otra solución exenta de enzimas que contenga EDTA (p. ej.: ReleSR, (STEMCELL Technologies)), o mediante la acción de un medio de desprendimiento de células comercial tal como TrypLE™ Express (Life Technologies), recoger por centrifugación, disociar mecánicamente y sembrar de nuevo en un nuevo sistema de cultivo.

Segunda etapa: cultivo adherente en medio de rediferenciación

Al inactivar la vía de señalización Wnt utilizada en el medio de rediferenciación para la amplificación celular en una segunda etapa intermedia del cultivo, los autores de la invención mostraron sorprendentemente que, tras el cultivo en sistema tridimensional, los condrocitos recuperaban su fenotipo original completo y su plena capacidad para sintetizar matriz hialina.

Por lo tanto, el método según la invención comprende además una etapa intermedia de cultivo de las células de tipo fibroblástico obtenidas en la primera etapa, en un sistema de cultivo adherente como se describió anteriormente con un medio de rediferenciación que inactiva la vía de señalización Wnt, preferiblemente la vía de señalización Wnt7B, Wnt5A o Wnt5B, preferiblemente la vía de señalización Wnt7B. Los condrocitos se ponen en contacto con este medio de rediferenciación para invertir el fenotipo fibroblástico y rediferenciar las células de tipo fibroblástico a condrocitos con plena capacidad para sintetizar matriz hialina. En esta segunda etapa, las células cambian su morfología y se vuelven menos alargadas, más grandes, con un retículo endoplásmico granular aparente en el citoplasma al microscopio óptico, lo que indica un alto nivel de actividad de síntesis de proteínas. Los condrocitos comienzan a reexpresar el agregano, un proteoglicano asociado con el GAG. El colágeno II no se reexpresa al final de la segunda etapa.

Preferiblemente, el contacto se lleva a cabo simplemente cambiando el medio de cultivo. Alternativamente, se puede llevar a cabo subcultivando en un sistema de cultivo adherente como se describió anteriormente que comprende el medio de reversión.

Según una realización, el sistema de cultivo adherente es un sistema de cultivo monocapa adherente como se describió anteriormente. Según una realización preferida, la matriz es de tipo Matrigel™ o sustrato CellStart™.



En una primera realización, el medio de rediferenciación puede ser un medio de rediferenciación que comprende medio basal en el que se elimina el compuesto que activa la vía de señalización Wnt como se describió anteriormente.

Al eliminar un compuesto, se pretende que dicho medio de rediferenciación comprenda el compuesto en una concentración que no permita la activación de la vía de señalización Wnt.

- 5 En una realización más preferida, dicho medio de rediferenciación es un medio de rediferenciación exento de FGF-2. Dicho medio de rediferenciación exento de FGF-2 comprende un medio basal que comprende menos de 0,5 ng/ml de FGF-2, preferiblemente menos de 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ng/ml de FGF-2.

En otra realización, dicho medio de rediferenciación es un medio basal que comprende un inhibidor de la ruta de señalización Wnt.

- 10 Dicho inhibidor de la ruta de señalización Wnt puede ser una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en: compuestos dirigidos a la proteína Dvl, tales como NSC668036 (N.º CAS 144678-63-7), 3289-8625 (N.º CAS 294891-81-9), J01-017a, TMEM88, KY-02061, KY-02327, BMD4702 (N.º CAS 335206-54-7), Niclosamida (N.º CAS 50-65-7), DK-520, Sulindac (N.º CAS 38194-50-2); compuestos que se dirigen al complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina tales como pirvinio (N.º CAS 7187-62-4); compuestos naturales tales como derricina (N.º CAS 34211-25-1),  
15 derricidina (N.º CAS 38965-74-1), ácido carnósico (N.º CAS 3650-09-7); compuestos que se dirigen al indicador de transcripción TCF/LEF tal como ICG-001 (N.º CAS 847591-62-2), PNU-74654 (N.º CAS 113906-27-7), Windorphen (N.º CAS 19881-70-0); compuestos que se dirigen a Pren tales como IWP-L6 (N.º CAS 1427782-89-5), Wnt-C59 (N.º CAS 1243243-89-1), LGK974 (N.º CAS 1243244-14-5), ETC-159 (N.º CAS 1638250-96-0), compuestos que se dirigen a TNKS tales como XAV939 (N.º CAS 284028-89-3), E7449 (N.º CAS 1140964-99-3), preferiblemente XAV939.

- 20 En otra realización, los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también se pueden usar para disminuir el nivel de expresión génica de al menos una proteína implicada en la señalización de la vía Wnt. En una realización preferida, dicha expresión génica de proteína de señalización Wnt puede reducirse introduciendo en una célula un ARN bicatenario pequeño (ARNbc), o un vector o construcción que provoque la producción de un ARN bicatenario pequeño, de manera que la vía de señalización Wnt sea inactivada (es decir, interferencia de ARN o ARNi). Los métodos para seleccionar un ARNbc apropiado o un vector que codifique el ARNbc son bien conocidos en la técnica para los genes cuya  
25 secuencia es conocida (p. ej., véanse Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); Patentes de EE. UU. N.º 6,573,099 y 6,506,559; y las publicaciones internacionales de patente N.º WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836).

- En otra realización, el ARN de horquilla corta (ARNhc) también se puede usar para disminuir el nivel de expresión  
30 génica de la proteína de señalización Wnt. Un ARN de horquilla corta (ARNhc) es una secuencia de ARN que hace un giro de horquilla estrecho y que se puede utilizar para silenciar la expresión del gen objetivo mediante interferencia de ARN (ARNi). La expresión del ARNhc en las células se logra normalmente suministrando plásmidos o mediante vectores virales o bacterianos. La elección del promotor es esencial para lograr una expresión sólida del ARNhc. Al principio, se usaron promotores de la polimerasa III como U6 y HI; sin embargo, estos promotores carecen de control  
35 espacial y temporal. Así pues, ha habido un cambio hacia el uso de promotores de la polimerasa II para regular la expresión del ARNhc.

En una realización preferida, el ARNip se usa para disminuir el nivel de expresión génica de Wnt5B, Wnt7B, Wnt5A o  $\beta$ -catenina, preferiblemente Wnt7B.

- 40 El medio de cultivo basal puede ser un medio mínimo que comprende particularmente sales minerales, aminoácidos, vitaminas y una fuente de carbono esencial para las células y un sistema tampón para regular el pH. El medio basal que puede usarse en el método según la invención incluye, por ejemplo, pero no se limita a, medio DMEM/F12, medio DMEM, medio RPMI, medio F12 de Ham, medio IMDM y medio DMEM KnockOut™ (Life Technologies).

- En una realización particular, el medio de rediferenciación es un medio de rediferenciación exento de FGF-2 que  
45 comprende un medio basal que comprende menos de 0,5 ng/ml de FGF-2 y comprende al menos uno o más componentes que promueven que las células de tipo fibroblástico se rediferencien en condrocitos.

En una realización particular, el medio de rediferenciación comprende factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), más preferiblemente TGF- $\beta$ 3. Preferiblemente, el medio de rediferenciación comprende entre 1 y 100 ng/ml de TGF- $\beta$ 3, más preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de TGF- $\beta$ 3.

- 50 En una realización más particular, el medio de rediferenciación comprende además FGF-7, también conocido como factor de crecimiento de queratinocitos. El FGF-7 participa en la proliferación celular y en la diferenciación celular. Preferiblemente, el medio de rediferenciación comprende entre 1 y 100 ng/ml de FGF-7, más preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de FGF-7.

Según una realización particular, el medio de rediferenciación usado comprende además suero de origen animal como se describió anteriormente.

- 55 En una realización preferida, dicho TGF- $\beta$ , FGF-7 y/o suero se sustituyen por lisado plaquetario. El lisado plaquetario

es un suplemento de cultivo celular rico en factores de crecimiento derivado de las plaquetas de la sangre después de ciclos de congelación/descongelación. El ciclo de congelación/descongelación hace que las plaquetas sean lisadas, liberando una gran cantidad de factores de crecimiento necesarios para la expansión celular. En una realización preferida, el medio de rediferenciación comprende entre 5 y 20%, preferiblemente 10% de lisado plaquetario. En una realización preferida, dicho lisado plaquetario es un lisado plaquetario humano combinado.

Los componentes que pueden afectar a la diferenciación de los condrocitos no están particularmente restringidos y pueden seleccionarse adecuadamente según el propósito. Los ejemplos del componente incluyen insulina, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento transformante  $\beta$ , proteínas morfogénicas óseas (BMP), selenio, transferrina, etanolamina, factores de crecimiento derivados de las plaquetas. Cada uno de los otros componentes descritos anteriormente se puede usar solo, o se puede usar una pluralidad de ellos en combinación.

Según una realización particular, los condrocitos se ponen en contacto con el medio de rediferenciación durante 2 a 10 días, preferiblemente durante 3 a 7 días, más preferiblemente 7 días.

Las células se pueden subcultivar de forma regular para evitar que el cultivo alcance la confluencia, es decir, que cubra toda la superficie disponible. De hecho, la confluencia induce un cese de la proliferación y cambios metabólicos no deseados. Las células se pueden subcultivar usando técnicas convencionales bien conocidas por el experto en la técnica como se describió anteriormente.

Tercera etapa: Sistema de cultivo 3D en medio de inducción/maduración

Para permitir la formación de tejido cartilaginoso, los condrocitos obtenidos en la segunda etapa se cultivan luego en un sistema de cultivo tridimensional en un medio de maduración también denominado medio de inducción. En esta etapa, los condrocitos producen su propia matriz extracelular para formar tejido cartilaginoso, en particular comienzan a sintetizar colágeno de tipo II. El tejido cartilaginoso obtenido es un tejido tridimensional de tamaño variable, que puede denominarse esferoide. Dicho esferoide está compuesto por células contenidas en el esferoide y por una matriz hialina formada por estas células.

El medio de maduración es un medio basal que comprende al menos uno o más componentes que permiten a los condrocitos producir matriz hialina y formar tejido cartilaginoso.

En particular, el medio de maduración inactiva la vía de señalización Wnt. En una realización, el medio de maduración comprende medio basal en el que se elimina el compuesto que activa la vía de señalización Wnt como se describió anteriormente. En otra realización, dicho medio de maduración es un medio basal que comprende un inhibidor de la vía de señalización Wnt como se describió anteriormente.

En una realización preferida, dicho medio de maduración es un medio basal en el que se elimina el factor de crecimiento FGF-2. En otros términos, el medio de maduración es un medio basal que comprende menos de 0,5 ng/ml de FGF-2, preferiblemente menos de 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ng/ml de FGF-2.

Los componentes que pueden afectar a la diferenciación de condrocitos no están particularmente restringidos y pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo del propósito. Los ejemplos del componente incluyen factores de crecimiento TGF- $\beta$ , insulina, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento de transformación  $\beta$ , proteínas morfogénicas óseas (BMP), selenio, transferrina, etanolamina, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento derivados de plaquetas. Cada uno de los otros componentes descritos anteriormente se puede usar solo, o se puede usar una pluralidad de ellos en combinación.

Según una realización particular, el medio de maduración es un medio de cultivo basal, tal como se describió anteriormente, que comprende además TGF- $\beta$ , preferiblemente TGF- $\beta$ 3.

Preferiblemente, el medio de maduración comprende entre 1 y 100 ng/ml de TGF- $\beta$ 3, más preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de TGF- $\beta$ 3.

Según una realización, el medio de maduración de condrocitos es un medio de cultivo basal que comprende TGF- $\beta$ 3, IGF-1, BMP-2 e insulina. Preferiblemente, el medio de maduración de condrocitos comprende TGF- $\beta$ 3, insulina, IGF-1, BMP-2, selenio, transferrina y etanolamina, más preferiblemente TGF- $\beta$ 3, insulina, selenio, transferrina y etanolamina.

Preferiblemente, el medio de maduración comprende entre 1 y 100 ng/ml de TGF- $\beta$ 3, preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de TGF- $\beta$ 3, entre 1 y 100 ng/ml de IGF-1, preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de IGF-1, y/o entre 1 y 100 ng/ml, preferiblemente entre 5 y 50 ng/ml de BMP-2.

Según una realización particular, los condrocitos se cultivan en un sistema de cultivo tridimensional en un medio de maduración durante 10 a 20 días, preferiblemente durante 10 a 15 días.

El cultivo 3D permite que las células se conecten entre sí con el fin de favorecer la síntesis de matriz extracelular por los condrocitos. El sistema de cultivo 3D puede ser estático o dinámico. El método estático implica proporcionar a las células una modalidad para formar agregados debido a fuerzas físicas estáticas. Los métodos estáticos incluyen, pero

no se limitan a, el método de la gota colgante, cultivo en líquido sobre sustrato no adherente, tal como un recubrimiento fino de agar o agarosa, cultivo en placas de superficie de baja adhesión. Los métodos dinámicos implican agregación celular forzada. Los métodos dinámicos incluyen, pero no se limitan al cultivo en matraces giratorios, el recipiente de pared giratoria y el cultivo en sedimento. En una realización preferida, el sistema de cultivo 3D es un cultivo en sedimento. En el cultivo en sedimento, los condrocitos se distribuyen en placas y se centrifugan para agregar las células y formar un sedimento.

En una realización preferida, el cultivo 3D en medio de maduración se realiza en atmósfera de hipoxia para mejorar la formación de cartílago. En una realización preferida, los condrocitos se cultivan en sistema de cultivo 3D en un medio de maduración en una atmósfera de menos de 10% (v/v) de O<sub>2</sub>, más preferiblemente menos de 7% de O<sub>2</sub>, más preferiblemente al 5% de O<sub>2</sub>.

Las células se mantienen en el medio de maduración de los condrocitos hasta obtener tejido cartilaginoso. Como se usa en el presente documento, el cartílago se refiere al cartílago hialino. Durante este período, y de manera convencional, el medio de cultivo puede cambiarse regularmente, preferiblemente cada 2 o 3 días.

La calidad del tejido cartilaginoso obtenido se puede evaluar midiendo el contenido de glicosaminoglicanos (GAG) y colágeno II en el tejido cartilaginoso de ingeniería. La calidad y cantidad del tejido cartilaginoso también se pueden determinar midiendo la cantidad de GAG/microtejido o mediante la relación GAG/ADN bicatenario. La presencia de GAG, colágeno o ADN bicatenario puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el GAG puede revelarse mediante la coloración con safranina-O o, más cuantitativamente, mediante una valoración de GAG utilizando el ensayo de azul de dimetilmileno (DMMB). El colágeno II se puede evaluar mediante inmunotinción o mediante un ensayo más cuantitativo como el ELISA.

Por lo tanto, opcionalmente, el método según la invención puede comprender una etapa adicional que consiste en medir o evaluar la presencia de GAG y/o colágeno II en el tejido cartilaginoso de ingeniería.

#### Tejido cartilaginoso de ingeniería (Cartibeads)

La presente invención también se refiere al tejido cartilaginoso de ingeniería que se puede obtener por el método según la invención. Según la invención, dicho tejido cartilaginoso de ingeniería está en una forma de esferoide que presenta un contenido de glicosaminoglicanos (GAG) por esferoide de entre 10 y 100 µg/esferoide.

La presente invención se refiere a tejido cartilaginoso de ingeniería en forma de esferoide en donde dicho esferoide presenta un contenido de GAG por esferoide de al menos 15, 16, 17, 18, 19 o 20 µg/esferoide, entre 10 y 100 µg/esferoide, más preferiblemente entre 15 y 60 µg/esferoide.

La presente invención se refiere a tejido cartilaginoso de ingeniería en forma de esferoide en donde dicho esferoide presenta una relación GAG/ADN bicatenario de al menos 10, 15 o 20, preferiblemente entre 10 y 100, más preferiblemente entre 10 y 80.

Dicho esferoide de tejido cartilaginoso tiene un diámetro de 1 a 2 mm y comprende entre 50.000 y 250.000 células, preferiblemente 200.000 células.

#### Composición farmacéutica

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el tejido cartilaginoso de ingeniería de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables deben ser compatibles con las células y pueden ser, por ejemplo, un medio de cultivo, una solución tampón o una solución salina.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es adecuada para la administración parenteral, preferiblemente por vía subcutánea, en particular para la administración directamente en el cartílago o tejido óseo. La composición farmacéutica puede formularse de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende el tejido cartilaginoso de la invención, encapsulado en una matriz biocompatible.

La composición farmacéutica también puede comprender uno o más compuestos activos adicionales, por ejemplo, compuestos que se sabe que mejoran la supervivencia o proliferación celular o previenen la contaminación.

#### Aplicación terapéutica

Según otro aspecto más, la presente invención se refiere al tejido cartilaginoso de ingeniería de la invención o a la composición farmacéutica que comprende dicho tejido cartilaginoso de ingeniería para uso terapéutico, en particular para el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago en un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al tejido cartilaginoso de ingeniería de la invención para usar en el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago en un sujeto que lo necesite. También se refiere a una composición farmacéutica según la invención para usar en el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago en un sujeto que lo necesite.

5 La presente invención es particularmente adecuada para el trasplante de tejido cartilaginoso autólogo en un sujeto que lo necesite. En el trasplante de tejido cartilaginoso de ingeniería autólogo de la invención, los condrocitos se aíslan primero de dicho sujeto, preferiblemente de una biopsia de tejido cartilaginoso maduro de dicho sujeto. A continuación, los condrocitos se cultivan según el método de la invención para obtener tejido cartilaginoso de ingeniería autólogo y se usan para el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago en dicho paciente.

10 Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del tejido cartilaginoso de ingeniería autólogo de la invención o a una composición farmacéutica que comprende dicho tejido cartilaginoso de ingeniería autólogo para el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago en un sujeto que lo necesite.

En otra realización, se puede usar trasplante alogénico en un sujeto que lo necesite.

15 Como se usan en el presente documento, las expresiones "defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago" incluyen, pero no se limitan a, lesiones del cartílago, artrosis, reumatismo u osteoartritis.

En una realización particular, el tejido cartilaginoso de ingeniería de la invención o composición farmacéutica del mismo está indicado para pacientes afectados por una lesión focal del cartílago articular o una osteoartritis temprana, con el fin de retrasar o evitar la artroplastia total de rodilla, que no se propone habitualmente para pacientes menores de 60 años debido a la limitada vida útil de la prótesis. Por lo tanto, en una realización preferida, los defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago son una lesión focal del cartílago articular o la osteoartritis temprana.

20 El término "tratamiento", como se usa en este documento, se refiere a una mejoría o desaparición de los síntomas, tales como la disminución del dolor y la movilidad, una ralentización de la progresión de la enfermedad, un cese de la evolución de la enfermedad o una desaparición de la enfermedad. Este término también incluye tanto el tratamiento preventivo como el curativo.

Como se usa aquí, el término "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento se refiere a mamíferos. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento descritos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates no humanos tales como simios, chimpancés, monos y orangutanes, animales domesticados, incluidos perros y gatos, así como ganado tal como caballos, vacas, cerdos, ovejas y cabras, u otras especies de mamíferos incluyendo, sin limitación, camellos, ratones, ratas, cobayas, conejos, hámsteres y similares. En una realización particular, dicho sujeto es un ser humano o caballo.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente para disminuir los síntomas del dolor o aumentar la movilidad de un sujeto que presenta defectos del cartílago y/o enfermedades degenerativas del cartílago.

35 En una realización preferida, se van a administrar de 10 a 50 esféroides del tejido cartilaginoso de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro por cm<sup>2</sup> de lesión para cubrirla completamente.

Los esféroides se autoadhieren al hueso subcondral y al borde interno de la lesión condral.

40 El tejido cartilaginoso de ingeniería o la composición farmacéutica de la invención pueden administrarse injertando directamente dicho cartílago en la superficie del cartílago o la matriz de soporte o en el entorno local del cartílago o la matriz de soporte del sujeto.

El tejido cartilaginoso de ingeniería o la composición farmacéutica de la invención se pueden administrar al sujeto mediante un procedimiento quirúrgico de articulación abierta o mediante artroscopia, preferiblemente mediante artroscopia para permitir una recuperación más rápida de los pacientes.

45 Una vez trasplantados *in vivo*, los condrocitos del interior del tejido cartilaginoso responden a las cargas mecánicas al continuar produciendo matriz con el fin de llenar el espesor completo del defecto hasta la superficie del tejido dañado y tienen el potencial de fusionarse entre sí *in vivo* para formar un tejido cartilaginoso homogéneo.

Kit

También se describe un kit para la producción *in vitro* de tejido cartilaginoso. Este kit comprende:

50 - un primer recipiente que contiene uno o más compuestos presentes en el medio de desdiferenciación como se describió anteriormente, preferiblemente FGF-2, más preferiblemente FGF-2 y un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en EGF, TGF-β3 y PDGF-BB y cualquier combinación de los mismos,

- un segundo recipiente que contiene uno o más compuestos presentes en el medio de rediferenciación como se

describió anteriormente, preferiblemente TGF $\beta$ 3, más preferiblemente TGF $\beta$ 3 y FGF-7, dicho TGF- $\beta$ 3 y/o FGF-7 pueden reemplazarse por lisado plaquetario, y

- 5 - un tercer recipiente que contiene uno o más compuestos presentes en el medio de maduración como se describió anteriormente, preferiblemente TGF- $\beta$ 3, más preferiblemente TGF- $\beta$ 3 y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: IGF-1, BMP-2, insulina, selenio, transferrina y etanolamina y cualquier combinación de los mismos, de nuevo más preferiblemente TGF- $\beta$ 3 e insulina, selenio, transferrina y etanolamina.

- 10 Preferiblemente, el kit comprende recipientes, cada uno de los cuales comprende uno o más compuestos en una concentración o en una cantidad que facilita la reconstitución y/o el uso del medio de diferenciación y/o maduración y la implementación del método según la invención. El kit también puede comprender un recipiente que contiene un medio basal como se describió anteriormente.

El kit también puede comprender un sistema de cultivo adherente, en particular en forma de un matraz, una placa multipocillo o un plato.

El kit también puede comprender instrucciones que indiquen los métodos para preparar y/o usar los medios de diferenciación o maduración para la producción *in vitro* de tejido cartilaginoso según el método de la invención.

- 15 También se describe el uso del kit según la invención para la producción *in vitro* de condrocitos según los métodos de la invención.

Método para cribar moléculas de interés terapéutico.

También se describe el uso del tejido cartilaginoso de la invención para cribar moléculas de interés terapéutico.

- 20 Las moléculas de interés terapéutico pueden ser, en particular, moléculas que inhiben el proceso degenerativo en la enfermedad degenerativa del cartílago. Estas moléculas pueden usarse particularmente en el tratamiento o la prevención de defectos del cartílago o enfermedades degenerativas del cartílago, como se describió anteriormente.

También se describe un método para cribar moléculas de interés que comprende

- i) poner en contacto el tejido cartilaginoso de la invención con moléculas candidatas, y
- ii) seleccionar las moléculas que tienen la actividad deseada.

- 25 La presente invención se refiere en particular a un método para cribar moléculas que inhiben el proceso degenerativo del cartílago que comprende:

- i) poner en contacto el cartílago de la invención con una o más moléculas candidatas, y
- ii) seleccionar las moléculas que inhiben el proceso degenerativo del cartílago.

- 30 La producción de tejido cartilaginoso puede evaluarse mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, métodos que comprenden medir el GAG o el colágeno II.

Dependiendo de la naturaleza de las moléculas buscadas, los condrocitos usados para producir el tejido cartilaginoso pueden obtenerse de un sujeto sano o un sujeto que tiene un defecto del cartílago o enfermedad degenerativa del cartílago como se definió anteriormente.

- 35 Otras características y ventajas de la invención se harán más evidentes tras la lectura de los siguientes ejemplos dados a modo de ilustración no limitativa.

## Ejemplos

Material y métodos

Productos químicos

XAV939 se obtuvo de Sigma y se usó en una concentración de 10  $\mu$ M durante 4 días en cultivo 2D en medio E.

- 40 Producción de Cartibeads

En los ejemplos se han usado los siguientes medios descritos en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de los medios utilizados en los ejemplos.

Medio	Origen de los condrocitos	Composición
Medio de desdiferenciación (medio 1, también denominado medio E)	Condrocitos humanos	-DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -aminoácidos no esenciales -10% de suero humano combinado -FGF-2 20 ng/ml -PDGF-BB 10 ng/ml -TGF beta 3 5 ng/ml; o -DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -aminoácidos no esenciales -10% de suero humano combinado -FGF-2 20 ng/ml
	Condrocitos equinos	-DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -aminoácidos no esenciales -10% de suero de ternero fetal -FGF-2 20 ng/ml -EGF 20 ng/ml.
Medio de rediferenciación (también denominado medio de compromiso condrogénico) (medio 2, también denominado medio R)	Condrocitos humanos	-DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -aminoácidos no esenciales -10% de lisado plaquetario humano combinado
	Condrocitos equinos	-DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -Aminoácidos no esenciales -10% de suero de ternero fetal

Medio	Origen de los condrocitos	Composición
Medio de maduración (medio 3, también denominado medio I)	Condrocitos humanos	-DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -Aminoácidos no esenciales -ITS-X (insulina, selenio, transferrina, etanolamina) 1x -TGF beta 3 10-100 ng/ml -IGF 10-100 ng/ml -BMP-2 10-100 ng/ml o -DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -Aminoácidos no esenciales -ITS-X (insulina, selenio, transferrina, etanolamina) 1x -TGF beta 3 10-100 ng/ml
	Condrocitos equinos	-DMEM 4,5 g/l de glucosa -Glutamax -Aminoácidos no esenciales -ITS-X (insulina, selenio, transferrina, etanolamina) 1x -TGF beta 3 10-100 ng/ml -IGF I 10-100 ng/ml -BMP-2 10-100 ng/ml

#### Recogida de muestras

Las muestras de cartílago humano se obtuvieron de donantes que dieron su consentimiento vital (edad de 18 a 80 años), después de procedimientos ortopédicos para diversas indicaciones (Tabla 2).

5

Tabla 2: Características de los donantes incluidos sexo, edad y patología.

ID	Sexo	Edad	Patología
Donante 1	M	21	Traumatismo
Donante 2	M	47	Traumatismo
Donante 3	M	29	Traumatismo
Donante 8	F	65	Artrosis de rodilla
Donante 9	M	80	Artrosis de rodilla
Donante 13	F	64	Artrosis de rodilla
Donante 14	M	69	Artrosis de rodilla
Donante 15	M	87	Necrosis del cóndilo femoral

ID	Sexo	Edad	Patología
Donante 17	F	28	Traumatismo (luxación rotuliana)
Donante 18	M	58	Lesión focal degenerativa
Donante 19	F	60	Artrosis de rodilla
Donante 20	M	38	Osteocondritis disecante
Donante 21	M	68	Artrosis de rodilla
Donante 23	M	63	Artrosis de rodilla
Donante 24	F	74	Artrosis de rodilla
Donante 27	M	82	Artrosis de rodilla
Donante 31	M	76	astrágalo (artrosis de tobillo)
Donante 37	F	70	astrágalo (artrosis de tobillo)
Donante 39	M	74	astrágalo (artrosis de tobillo)

El cartílago recogido se transfirió al laboratorio en un recipiente estéril en solución salina normal (NaCl al 0,9%) a temperatura ambiente. La recogida de muestras de cartílago humano fue aprobada por el Comité de Ética de Suiza (BASEC, 2016-00656).

- 5 Los cartílagos de minicerdos se obtuvieron del soporte troclear lateral (~30 mg), extraído de la rodilla derecha de los minicerdos.

El cartílago (~ 30 mg) se cortó en trozos pequeños (1 mm) para facilitar la extracción de condrocitos mediante digestión enzimática, luego se puso en rotación a 37 °C durante la noche, con collagenasa de tipo II (400 U/ml, ThermoFisher) en el medio E que contenía antibiótico (gentamicina, 50 ug/ml) y antifúngico (anfotericina B o fungizone®, 0,250 ug/ml).

#### 10 Cultivo celular y producción de Cartibeads

- Las células se lavaron y se sembraron en placas (p0) en matraces T25 cm<sup>2</sup> previamente recubiertos con matriz extracelular (MaxGel™, Sigma), luego se cultivaron durante 12 a 16 días en medio E con gentamicina y fungizone®, que se retiraron después de 5 días de expansión celular. Todos los cultivos celulares 2D se realizaron en matraces recubiertos con matriz extracelular. En la confluencia, las células se sometieron a pase en 1 T75 (p1) y se dividieron posteriormente en 2x T75 (p2) para alcanzar la confluencia. En esta etapa, se pueden congelar células como respaldo (p3). Tras la expansión celular en el medio E (etapa 1), las células se cultivaron durante 7 días en medio R, en la etapa 2, donde se observó una disminución de su crecimiento antes de proceder al cultivo 3D en la etapa 3. En la etapa 3, se recolectaron los condrocitos y se añadieron al medio I para obtener 0,2 x 10<sup>6</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos cónicos (~20 x 10<sup>6</sup> células/placa). Las placas de 96 pocillos se centrifugaron 5 min a 300 g para permitir la agregación celular y la formación de Cartibeads después de 15 días en cultivo 3D. Los Cartibeads se obtuvieron a partir de condrocitos hasta el pase 8. Estas perlas se retiraron de las placas de 96 pocillos y se combinaron entre sí y se pueden mantener en el medio I de 4 a 23°C (temperatura ambiente) durante hasta 6 días con una alta estabilidad.

#### Cuantificación de GAG

- El contenido de glicosaminoglicanos (GAG) se evaluó mediante el ensayo de azul de dimetilmetileno (DMMB) (Sigma, 341088). El sulfato de condroitina A (Sigma, C9819) se usó para generar 6 patrones, con concentraciones que variaban de 0 a 50 µg/ml. El sulfato de condroitina C (Sigma, C4384) se usó para generar un Control de calidad interno (ICQ) bajo y alto, con concentraciones de 15 y 35 µg/ml, respectivamente. Los Cartibeads se digirieron con proteinasa K (1 mg/ml) (Promega, V3021) en Tris-HCl, 50 mM, pH 8 (Sigma), durante 15±2 horas a 56°C. La digestión enzimática se detuvo por incubación a 97°C durante 15 minutos. La muestra resultante se diluyó después (1/5-1/10) en Tris-HCl, 50 mM, pH 8 para el ensayo. Se leyeron 100 µl de patrones, ICQ y muestras con un espectrofotómetro por triplicado (λ = 525 nm) después de 5 minutos de reacción con 1 ml de solución de DMMB. A continuación, el contenido de GAG se normalizó con respecto a la cantidad de ADN, que se midió con el ensayo Picogreen-Qubit. Los patrones y los ICQ se prepararon a partir del ADN del timo de ternero en dos preparaciones separadas. Los patrones y los ICQ se prepararon en tampón de Tris-HCl 200 mM, EDTA 20 mM, pH 7,5 (TE); las muestras son las de la digestión con proteinasa K, luego se diluyeron 1/15 en tampón TE. Para este ensayo, se tomaron 100 µl de patrón, ICQ y luego muestra y se dividieron por triplicado. Luego se añadieron 100 µl de PicoGreen Quant-It® diluido a 1/200 (ThermoFisher, P11496). La muestra se incubó luego durante 5 minutos, tiempo durante el cual el intercalante forma complejos con el ADN. Finalmente, la lectura se realizó en el fluorómetro Qubit 4 (ThermoFisher, Q33238), con un máximo de excitación a



485 nm.

#### Viabilidad celular de Cartibeads

Se analizó la viabilidad de las muestras mediante un ensayo utilizando un colorante fluorescente rojo, Zombie Aqua™ (Biolegend, 423101), que es un colorante fluorescente reactivo con aminas que no es permeable para las células vivas pero que penetra en las células con membranas comprometidas, permitiendo así evaluar las células vivas frente a las muertas. Se recogieron muestras del 3D al final de la etapa 3, luego se lavaron con PBS, luego se añadió colorante Zombie diluido en PBS (1:100) durante 20 minutos, las muestras se mantuvieron en la oscuridad. Posteriormente, las muestras se cortaron por medio de un micrótopo criostático con un grosor de 3 µm y se montaron en portaobjetos Superfrost Plus. Posteriormente, se fijaron con formol al 4% y luego se trataron con Hoechst (Molecular probe, H3570Thermofisher) diluido en PBS (1:2000) durante 10 minutos. El control del ensayo se logró añadiendo Triton™ (Sigma, X100-100ML) al 10% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) antes de comenzar la etapa con el colorante Zombie.

#### Tinción inmunohistoquímica

Para la tinción inmunohistoquímica de tejidos cartilaginosos y Cartibeads insertados en parafina fijados con formalina, los bloques de parafina que contenían las muestras se cortaron con el micrótopo a 5 µm. Los portaobjetos se secaron durante la noche a 47°C. Los portaobjetos se desparafinaron con xilol y se rehidrataron con baños de alcohol consecutivos (concentraciones de 100%, 95% y 70%). Se utilizaron dos técnicas de desenmascaramiento. Para el cartílago nativo procedente de minicerdos, los autores de la invención usaron una solución de 20 mg/ml de hialuronidasa en tampón de fosfato 0,1 M, puesta en portaobjetos durante 1 hora a 37°C. Los portaobjetos se enjuagaron en PBS dos veces durante 5 minutos para eliminar la hialuronidasa. Las muestras de Cartibeads se sumergieron en un baño tampón de citrato 0,01 M a pH = 6, se calentaron 3 veces, 5 minutos cada vez en microondas a 620 W y, a continuación, se enfriaron en un baño de hielo durante 20 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron luego en PBS durante 5 minutos. Después se usaron los anticuerpos primarios (Colágeno I Abcam, ab6308; Colágeno II Abcam ab85266 y ThermoFisher MAS-12789). Hay que indicar que los dos anticuerpos de colágeno de tipo II que se utilizaron mostraron resultados similares. Los anticuerpos se pusieron en diferentes muestras, diluidas 1:100 en Tritón:PBS al 0,3% durante 1 hora. Tras enjuagar durante 5 minutos con PBS, se usó un anticuerpo secundario, uno anti-ratón conjugado con biotina (Vector lab, BA-2000), anti-IgG de conejo (Vector lab BA-1000) y un sistema de detección de peroxidasa avidina-biotina con sustrato de 3,3'-diaminobencidina (Vector Labs). Las muestras se contratiñeron con hematoxilina. La deshidratación se logró deshidratando vigorosamente agitando la rejilla 10-20 veces en baños de alcohol (concentración 95% y 100%), seguido de un baño de xilol hasta el ensamblaje de los portaobjetos con resina Eukitt (lote A1113, KinDo1500). Para la obtención de imágenes se utilizaron un microscopio confocal Nikon Eclipse C1 así como un Nikon Eclipse TE2000-E.

#### Tinción con safranina-O

Se realizó una tinción con safranina-O de esferas de cartílago y muestras insertadas en parafina fijadas en formalina de cartílago nativo, con el fin de revelar los glicosaminoglicanos (GAG) en cortes de parafina de 5 µm. Los portaobjetos se desparafinaron con xilol y se rehidrataron mediante baños de alcohol consecutivos (concentración del 100%, 95% y 70%) con un baño final de agua destilada de 5 minutos. A continuación, se usó la tinción con hematoxilina para la contratinción del núcleo, seguida de un lavado de 5 minutos con agua corriente caliente. Se usó verde rápido (Sigma F7252) para teñir el citoplasma y luego se lavó con ácido acético. Los portaobjetos se lavaron inmediatamente con agua destilada. Se aplicó safranina-O al 0,1% en un baño de agua (Sigma S2255) para teñir los GAG durante dos minutos y medio, luego se lavaron repetidamente con agua destilada. La deshidratación se logró agitando enérgicamente la rejilla 10-20 veces en baños de alcohol (concentración 95% y 100%), seguido de un baño de xilol hasta el ensamblaje de los portaobjetos con resina Eukitt (lote A1113, KinDo1500).

#### Evaluación de multipotencia

MSC/ASC/condrocitos humanos expandidos en monocapa se diferenciaron en el destino condrogénico, adipogénico y osteogénico para evaluar su multipotencia. La diferenciación osteogénica se evaluó mediante la tinción de rojo de alizarina S (Merck, TMS-008-C). La diferenciación adipogénica se evaluó usando tinción de rojo aceite O (Sigma, 01391) y la condrogénica se evaluó usando tinción de Safranina-O (Sigma, S2255) /verde rápido (Sigma F7252).

#### Mediciones biomecánicas

Los ensayos de compresión se llevan a cabo con una máquina de tracción-empuje MTS Criterion (modelo 42) equipada con una celda de carga de 1 N en perlas de cartílago que varían de 0,68 mm a 1,54 mm de diámetro y en cartílago nativo. La velocidad de compresión se ajustó a 0,01 mm.s<sup>-1</sup> con una compresión de carga máxima impuesta a 0,2 N; se usaron un máximo de diez perlas por ensayo con el fin de aumentar el área superficial detectada. Se fabricó un sistema de soporte original a medida para evitar el deslizamiento de las perlas y garantizar una compresión isotrópica durante el ensayo. La fuerza de compresión en función del desplazamiento se midió como datos sin procesar. A continuación, se calculó la curva de tensión-deformación para estimar el módulo de Young del cartílago, teniendo en cuenta la pendiente del conjunto de datos en el régimen lineal, dividida por el área superficial de la muestra y el número de perlas con fines de normalización. El cálculo del módulo de Young se realizó como se describe a continuación:

$$E = \sigma / \epsilon,$$

donde  $\sigma$  es la tensión de compresión (kPa), E es el módulo de Young (kPa) y  $\epsilon$  la deformación (sin unidad) correspondiente al alargamiento normalizado.

#### Inmunotransferencia

- 5 Las células se lisaron durante 30 min en hielo en un tampón RIPA enfriado con hielo (Life Technologies), complementado con inhibidores de fosfatasa y proteasa (cóctel completo de antiproteasas; Roche). La proteína (10  $\mu$ g) se separó por SDS-PAGE (BioRad) y se transfirió a membranas de PVDF (Amersham). Las transferencias se detectaron con antifosfo- $\beta$ -catenina (Cell Signaling; 5651T), TCF-4 (Cell Signaling; 2569), axina1 (Cell Signaling; 2087),  $\beta$ -actina HRP (Sigma-Aldrich) y GADPH (Cell Signaling; 2118) (1:1000), seguidos de los anticuerpos de conejo o ratón conjugados con HRP (1:5000).

#### Citometría de flujo

- 15 Se fijaron 100.000 células con PFA al 4% y luego se tiñeron para detectar CD73-CFS, CD90-APC y CD105-PerCP (Cell Sigma) durante 1 hora a TA en tampón FACs (BSA-azida-PBS). Se adquirió un mínimo de 10.000 células vivas con un citómetro de flujo Gallios y el análisis se realizó usando el software FlowJo. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes para CD73 y CD90. Se realizaron dos experimentos independientes para CD105. Para la estrategia de selección de poblaciones, primero se seleccionaron las células vivas, luego se identificaron las células individuales basándose en el FSC-W y el FSC-A para eliminar los dobletes. La tinción positiva se definió basándose en el control negativo IgG-CFS, IgG-APC e IgG-PerCP para CD73-CFS, CD90-APC y CD105-PerCP, respectivamente.

#### 20 RNASeq

- Como se describió previamente, se utilizó el SR100, bibliotecas TruSeqHT Stranded, Illumina HiSeq 4000 y el control de calidad de la secuenciación se realizó con FastQC v.0.11.5 (Cosset, E. et al., 2016. *Biomaterials* 107, 74-87). La distribución de la calidad a lo largo de las lecturas se evaluó y validó para todas las muestras. La referencia hg38 humana del UCSC se usó para mapear las lecturas con el alineador STAR v.2.5.3a respecto al genoma de referencia.
- 25 La tasa de mapeo promedio fue de 93,54%. Las métricas del transcriptoma se evaluaron con las herramientas Picard v.1.141 y el análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete de análisis estadístico R/Bioconductor edgeR v. 3.18.1 (Gentleman, R. C. et al. 2004. *Genome Biol* 5, R80, Huber, W. et al. 2015. *Nat Methods* 12, 115-121). En resumen, los recuentos se normalizaron de acuerdo con el tamaño de la biblioteca y se filtraron. Los genes que tenían un recuento superior a 1 cuenta por millón de lecturas (cpm) en al menos 3 muestras se conservaron para el análisis.
- 30 El número genético bruto del conjunto era 26.485. Los genes mal expresados o no expresados se separaron por filtración. El conjunto de datos final consistía en 13.884 genes. Los ensayos de genes expresados diferencialmente se hicieron con Exact Test utilizando una distribución binomial negativa. Los valores p de los genes expresados diferencialmente se corrigen según el error de ensayos múltiples con un FDR de 5% (tasa de descubrimientos falsos). La corrección utilizada es Benjamini-Hochberg (BH). Los ensayos de genes expresados diferencialmente se hicieron con edgeR utilizando una distribución binomial negativa. El valor p de los genes expresados diferencialmente se corrigió según el error de ensayos múltiples utilizando la tasa de descubrimientos falsos (FDR) de Benjamini-Hochberg (BH).

El análisis Panther se utilizó para determinar el enriquecimiento de cada familia de genes (número de entidades) (Mi, H. et al. 2017. *Nucleic Acids Res* 45, D183-D189).

#### 40 Extracción de ARN y RT-PCR

El aislamiento del ARN total se realizó usando el kit RNeasy de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se midió usando un espectrómetro. Se usaron 500 ng de ARN total para sintetizar el ADNc utilizando el kit de reactivos PrimeScript RT (Takara) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 45 La PCR en tiempo real se realizó con la mezcla maestra PowerUp SYBR Green (Applied Biosystems) utilizando el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific) en las instalaciones principales de la plataforma Genomic (Universidad de Ginebra). Primero, se llevaron a cabo los ensayos de eficacia para todos los cebadores para su validación antes de usarlos. El nivel relativo de cada muestra se normalizó, al menos, respecto a 2 genes de mantenimiento (*ALAS1*). Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo, al menos, por triplicado técnico y biológico, y se determinaron los valores promedio del ciclo umbral (CT).

#### 50 Trasplante de Cartibeads humanos en ratones SCID/NOD para un estudio de seguridad

Se usaron cincuenta y seis ratones macho SCID/NOD para ensayar la seguridad de las presentes Cartibeads normalizadas. Cuarenta y cuatro ratones recibieron Cartibeads humanos por implantación subcutánea. Se usó un grupo de control, donde 8 animales recibieron células de adenocarcinoma A549 agregadas, denominadas perlas (el número de ratones por grupo se resumió en la Tabla 3).

Tabla 3. Lista de donantes de Cartibeads trasplantados en ratones SCID. Se inyectaron Cartibeads de diferentes donantes y pases de células (de 3 a 6) por vía subcutánea en ratones SCID/NOD (n=de 8 a 14 ratones por grupo).

La línea celular de adenocarcinoma A549 se usó como control positivo y produjo 100% de tumores. Tras la eutanasia de los animales a los 6 meses, ninguno de los ratones mostró pérdida de peso debido al trasplante de Cartibead, anomalía por palpación ni ningún signo de sufrimiento. Además, no se observó ninguna anomalía ni evidencia de la presencia de tumores en los pulmones, corazón, hígado, riñones y bazo.

Microtejidos de	Pase de células	Ratones trasplantados	Tumor (6 meses)
Donante n.º 1 (M, 29)	p6	10	0
Donante n.º 2 (M, 47)	p3	10	0
Donante n.º 4 (M, 38)	P6	14	0
Donante n.º 12 (F, 74)	P4	10	0
Donante n.º 13 (F, 60)	P3	10	0
A549 (adenocarcinoma)		8	100% (6 semanas)

Todos los Cartibeads humanos implantados se cultivaron de acuerdo con el método de 3 etapas normalizado y se trasplantaron de la misma manera. La anestesia general se logró con isoflurano al 4%, seguido de isoflurano al 2% bajo máscara con oxígeno al 5%. Desinfección local de la piel después del afeitado de la espalda con alcohol al 70%. Se realizó una incisión cutánea de 0,5 cm caudalmente desde el polo occipital. Los tejidos producidos (Cartibeads y perlas de adenocarcinoma) de 200.000 células cada uno se implantaron por vía subcutánea con una pipeta estéril (1 perla/animal). La piel después se cerró con pegamento quirúrgico (Histoacryl, B. Braun Surgical S.A.). Con el fin de localizar el sitio y la orientación de la muestra de piel, los autores de la invención realizaron un tatuaje de 4 puntos cardinales con una aguja estéril de calibre 26 y tinta de tatuaje verde. Los ratones de los grupos de control se sacrificaron a las 4 a 6 semanas, mientras que se realizó un seguimiento de los ratones del grupo de Cartibeads de hasta 6 meses. Se extrajeron piel y órganos y fueron examinados por dos miembros del estudio en cada etapa. Todas las muestras se conservaron 1/3 en formol al 4% y 2/3 se secaron a -20°C. Los procedimientos con animales fueron aprobados por la Oficina Veterinaria Federal de Suiza (GE/12/18)

#### Matriz de hibridación genómica comparativa

La estabilidad genómica también se determinó comparando fibroblastos dérmicos humanos normales tratados con FBS al 10% o PRP al 10% durante 6 días usando hibridación genómica comparativa (CGH) de matrices. El ADN se extrajo usando el minikit QIAGEN QIAamp DNA (Qiagen, Hilden) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La CGH de matrices se realizó utilizando el kit de micromatrices de CGH Agilent SurePrint G3 Human 4\_44K (ID de diseño 014950) con un espaciado mediano total entre sondas de 43 Kb (Agilent Technologies). La resolución práctica era de aproximadamente 200 kb. El ADN del paciente y el ADN de un control del mismo sexo (1 µg de cada uno) se marcaron con Cy3-dUTP y Cy5-dUTP, respectivamente (kit de marcado Sure Tag, Agilent Technologies). Los productos marcados se purificaron mediante filtros Amicon Ultra 30 K (Millipore). La hibridación se realizó de acuerdo con el protocolo proporcionado por Agilent. El ADN del paciente y del control se combinaron y se hibridaron con 2 mg de ADN Cot-I humano a 65°C con rotación durante 24 h. Las matrices se analizaron usando un escáner de micromatrices Agilent SureScan y el software Agilent Feature Extraction (v11.5), y los resultados se presentaron mediante el Agilent Genomic Workbench (v.7.0).

#### Trasplante de Cartibeads autólogos en minicerdos para el estudio de eficacia

En el estudio se utilizaron seis minicerdos hembras adultas (37-48 kg). Los animales se anestesiaron con sevoflurano y se les administró un antibiótico profiláctico por vía intravenosa (cefazolina: 2 g/kg) 30 minutos antes de la incisión. Se operaron bajo narcosis completa y se extubaron 5 minutos después del cierre de la piel. La desinfección de la piel se repitió tres veces y se realizó un drapeado aséptico con paños quirúrgicos descargables.

#### Etapas 1 cirugía

Para la primera cirugía se optó por un abordaje pararrotuliano super-lateral. La extracción del cartílago se realizó en el borde superolateral de la faceta troclear lateral para evitar posibles conflictos con lesiones posteriores del cartílago durante la segunda etapa quirúrgica. Las biopsias de cartílago se pusieron en una solución de medio de cultivo E para su posterior procesamiento. Se realizó un cierre escalonado. No se aplicó ningún vendaje.

#### Etapas 2 cirugía

De cinco a 6 semanas después de la extracción del cartílago, los minicerdos se sometieron a una segunda cirugía mediante un abordaje del tendón pararrotuliano medial (Bonadio, M. B. et al., 2017. *J Exp Orthop* 4, 11). Mediante

este enfoque, se crearon dos lesiones en la tróclea femoral medial y lateral, cada una en todos los minicerdos, excepto en uno, debido a la extensión del sitio donante. El tamaño de las lesiones era de 6 mm de diámetro y se crearon con un pequeño raspador, luego se rellenaron completamente con una sola capa de 4-5 Cartibeads. Para una fijación más rápida, se añadió una capa delgada de Tisseel (Baxter) a cada defecto. Luego se creó una quinta lesión en el cóndilo femoral medial y se rellenó con Cartibeads de manera idéntica. En cada animal se mantuvo 1 lesión vacía en una ubicación diferente como lesión de control negativo. Se realizó un cierre escalonado. No se aplicó ningún vendaje.

#### Rehabilitación

Se permitió soportar todo el peso tan pronto como terminó la narcosis sin restricción de ninguna actividad.

#### Eutanasia

- 10 Tres minicerdos se sacrificaron a los 3 meses después de la segunda cirugía, y los otros tres se sacrificaron a los 6 meses. La rodilla operada se amputó y el fémur distal se puso en una solución de formaldehído para su posterior análisis.

Los procedimientos con animales fueron aprobados por la Oficina Veterinaria Federal de Suiza (GE/60/18)

#### Resultados

- 15 Ingeniería y caracterización de Cartibeads

En este estudio, los autores de la invención generaron microtejidos de cartílago, denominados Cartibeads, con características mejoradas del cartílago hialino, que se definen por el contenido de GAG y la expresión de colágeno II. El método de Cartibeads es un protocolo innovador de 3 etapas (Figura 1A), que consiste en (etapa 1) la expansión de condrocitos en cultivo bidimensional (2D) caracterizado por la dediferenciación celular seguida de (etapa 2) la rediferenciación celular en 2D, definida como compromiso condrogénico, y finalmente (etapa 3) un cultivo tridimensional (3D) que permite la formación de Cartibeads por agregación de condrocitos. Por lo tanto, los condrocitos humanos se extrajeron enzimáticamente del material de desecho quirúrgico y se cultivaron en 2D en condiciones de oxígeno atmosférico (21%) en las etapas 1 y 2, seguido de cultivo 3D en nivel bajo de oxígeno (5%).

- 25 Los condrocitos se vuelven "fibroblásticos" con características de células madre en la expresión génica y expresan marcadores de superficie de células madre mesenquimales (CD105, CD90, CD73) (Figura 6). En tres semanas, es posible obtener de 100.000 células extraídas, de 60 a 100 millones de células después del cultivo en el medio 1 (medio E).

- 30 La segunda etapa corresponde a la "reversión" del fenotipo fibroblástico hacia el fenotipo de condrocito después de la etapa de amplificación celular masiva. Las células se siembran en placas de rediferenciación (medio 2) durante 3 a 7 días. El día 0, se siembran en placa 2 millones de células en un matraz T75 cm<sup>2</sup> para alcanzar la confluencia y las células se mantienen confluentes hasta el día 4 al día 8 antes de separarlas para su cultivo 3D. De un matraz T75 cm<sup>2</sup>, se obtienen de 6 a 10 millones de células en la etapa 2. En comparación, en la primera etapa en el medio de dediferenciación, se obtienen de 12 a 16 millones de células en un T75 cuando alcanzan la confluencia. La eliminación del factor de crecimiento FGF-2 en el medio de rediferenciación (Medio R) disminuye el crecimiento de las células y permite la reversión del fenotipo y la rediferenciación hacia la diferenciación completa de condrocitos. Las células cambian su morfología en la segunda etapa de cultivo y se vuelven menos alargadas, más grandes, con retículo endoplásmico granular aparente en el citoplasma al microscopio óptico, lo que indica un alto nivel de actividad de síntesis de proteínas. Los condrocitos comienzan a reexpresar agregano, un proteoglicano asociado con el GAG (datos RNAseq). En esta segunda etapa en el cultivo 2D, el colágeno II todavía no es reexpresado.

- 40 En una tercera etapa, las células se desprenden del cultivo en el medio 2 (medio R) y se siembran en cultivo 3D. Se dispensan de 100.000 a 200.000 células en placas de 96 pocillos cónicos de polipropileno en medio de cultivo de rediferenciación (medio 3, también denominado medio I). Las placas de 96 pocillos se centrifugan 5 min, 300 g para agregar las células y formar un sedimento. Las placas de 96 pocillos están hechas de material de polipropileno para evitar que las células se peguen a la superficie del pocillo. El cultivo se incuba en atmósfera de hipoxia (5% de O<sub>2</sub>) para aumentar la producción de cartílago hialino durante 15 días antes de usar los microtejidos.

- Los Cartibeads obtenidos por ingeniería a partir de condrocitos tienen potencial como ATMP para el tratamiento de lesiones condrales. Por lo tanto, para evaluar su seguridad y eficacia, los autores de la invención usaron modelos animales (ratones SCID y minicerdos) (Figura 1B). Para caracterizar mejor los Cartibeads, se realizaron análisis cualitativos histológicos. Se mostró la presencia de características hialinas con una distribución homogénea de GAG teñidos con safranina-O y se correlacionó con una fuerte inmunodetección del colágeno de tipo II, mientras que el colágeno de tipo I era débil (Figura 1C).

- Los autores de la invención pudieron obtener por ingeniería tejidos cartilaginosos (denominados Cartibeads) de calidad similar a partir de donantes de hasta 80 años de edad, incluyendo de pacientes con osteoartritis (OA). El análisis cuantitativo de Cartibeads puso de manifiesto un alto contenido de GAG, que era independiente de la edad del paciente y del estado osteoartítico de la articulación (Figura 1D, Tabla 2). Los autores de la invención midieron un promedio

de 40 µg de GAG/Cartibead y un promedio de GAG/ADN 50 (10;140) (Figura 2).

Para caracterizar las propiedades biomecánicas de los Cartibeads, los autores de la invención usaron un aparato con un molde adaptado hecho a medida para cuantificar la elasticidad de los Cartibeads después de un ensayo de compresión. El módulo de Young se calculó dividiendo la tensión de compresión por la deformación en la parte elástica de la curva (alargamiento normalizado) (Lee, J. K. et al. 2017, *Nature Materials*, 16:864-873). Este método se usa comúnmente para ensayar la elasticidad del cartílago y refleja su composición de matriz extracelular (ECM). Los autores de la invención observaron un aumento de la resistencia a la contracción con los Cartibeads que contenían más GAG, lo que sugiere un beneficio al aumentar la cantidad de GAG (Figura 1E), lo que está en línea con otros estudios publicados (Omelyanenko, N. P. et al. 2018, *Cartilage*, 1947603518798890).

Dado que se sabe que el factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-1α) induce componentes de la ECM (Madeira et al. 2015, *Trends in Biotechnology*, 33:35-42), los autores de la invención evaluaron el efecto de los niveles bajos de oxígeno durante el cultivo 3D (5% de oxígeno) en la calidad de los Cartibeads en comparación con las condiciones atmosféricas. Como era de esperar, los resultados mostraron una mejora de la calidad hialina de las perlas de cartílago en condiciones de bajo nivel de oxígeno (Figura 3A-C). Hay que indicar que las condiciones de cultivo estándar en condiciones atmosféricas corresponden de hecho a hiperoxia, ya que el nivel de oxígeno registrado en el tejido cartilaginoso nativo es entre 0,5-5%, dependiendo de la profundidad (Lafont, J. E. 2010, *Int. J. exp. Pathol.* 91(2):99-106).

En la terapia celular, la estabilidad de los componentes celulares del material que se va a trasplantar es esencial. Por lo tanto, los autores de la invención evaluaron la estabilidad de los Cartibeads en diferentes condiciones, así como la proporción de células viables. Los autores de la invención compararon la cantidad de GAG en los Cartibeads el día 0 después del final de la etapa de maduración, con los Cartibeads mantenidos a 4°C y 23°C durante 6 días adicionales (Figura 4A). Los resultados mostraron que la concentración de GAG se mantuvo inalterada, 55 µg/Cartibead en promedio, a lo largo del tiempo y variación de temperatura indiferente, lo que indica estabilidad. Solo se detectó un pequeño número de células muertas (13%) en estas condiciones, lo que sugiere una buena supervivencia de los condrocitos en los Cartibeads (Figura 4B).

Los análisis transcriptómicos del método de Cartibeads de 3 etapas identificaron un nivel bajo de expresión de genes WNT como una vía clave que implicaba la calidad de la matriz hialina.

En un intento de identificar las vías moleculares implicadas en la mayor producción de cartílago hialino, se comparó el método de Cartibeads de 3 etapas con un método de 2 etapas, utilizado de forma clásica en la ingeniería de tejidos (Figura 5A). En términos de morfología, el método de 3 etapas dio como resultado Cartibeads de color blanco más grandes (diámetro de 1-2 mm) que el método de 2 etapas (diámetro de 0,5-1 mm) y una mayor cantidad de GAG/perla (Figura 2A-C). La mejora de la calidad hialina de Cartibeads en el método de 3 etapas se debió principalmente a la introducción de una etapa adicional después de una expansión celular extensa con FGF-2. Esta etapa, correspondiente a una etapa de inanición, utilizaba un medio "R", que no contiene FGF-2, y facilita así la rediferenciación de los condrocitos y la producción de matriz hialina. En ambos métodos, la etapa final consiste en cultivos 3D durante 2 semanas en el medio de maduración I que contiene suplementación de TGF-β3 (Figura 5A).

Para entender los mecanismos moleculares que permiten la producción de Cartibeads, los autores de la invención realizaron un análisis de secuenciación de ARN (RNAseq) utilizando 3 muestras de donantes en cada etapa crítica de ambos métodos. El ARN se extrajo en diferentes puntos temporales para el método de Cartibeads de 3 etapas: (i) final de la etapa 1 (condrocitos amplificados, medio E), (ii) final de la etapa 2 en medio R, y (iii) después de 15 días para la etapa 3 (perlas, medio I). Para el método de 2 etapas, se seleccionaron 2 puntos temporales: etapa 1 (condrocitos amplificados, medio E) y final de la etapa 2 (perlas, medio I). Los autores de la invención compararon primero los microtejidos de cartílago generados por ambos métodos en el medio I (Figuras 5B y C).

Observaron niveles significativamente más altos de genes implicados en la degradación/formación de colágeno y ECM, junto con la organización de la ECM en los Cartibeads (*COL1A1*, *COL2A1*, *COL4A1*, *MMP1*, *MMP13*, *MNIP11*). El análisis de la expresión génica diferencial mostró que el método de 3 etapas inducía niveles mucho más altos de colágeno tipo II (*COL2A1*) y agrecano (*ACAN*) en los Cartibeads, mientras que el colágeno tipo I (*COL1A1*), específico del fibrocartílago, era más alto en el método de dos etapas (Figura 5C-F). Los mayores niveles de GAG confirmaron la mejora de la diferenciación del cartílago en el método de Cartibeads de 3 etapas. (Figura 5G; Figura 2A-C). En el método de 3 etapas (M1+M2+M3), también aumenta *SOX9* (factor de transcripción implicado en la producción de la matriz) (Figura 7C).

Estos datos confirmaban la desdiferenciación de condrocitos en el medio E (que contiene FGF-2) con la detección de la expresión de *COL1A1* y la ausencia de marcadores de cartílago hialino tales como el tipo *COL2A1* y *ACAN*, una proteína asociada al GAG (Figura 5D-F). Los autores de la invención confirmaron el enriquecimiento de células desdiferenciadas en medio E por citometría de flujo, lo que indica que la proporción de células que expresan los marcadores de células madre mesenquimales CD73, CD90 y CD 105, según la definición propuesta por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), al final de la fase de expansión era de más de 90% de la población celular total (Figura 6A; Tabla 4).

Tabla 4: Análisis por citometría de flujo de condrocitos desdiferenciados. La tabla representa el análisis por citometría de flujo de los condrocitos desdiferenciados para CD73, CD90 y CD 105 de 3 donantes.

	Donante 27	Donante 14	Donante 18
CD73	99,7	99,8	99,6
CD90	93,2	99,7	99,7
CD105	89,2	92,9	90,7

Además, las características de multipotencia de esta población de condrocitos desdiferenciados se confirmaron por el hecho de que tiene la capacidad de diferenciarse hacia otras células derivadas de células madre mesenquimales (MSC) (osteocitos, adipocitos y condrocitos), incluso si este potencial sigue siendo inferior en comparación con las MSC (Figura 6B).

Cuando los autores de la invención compararon la expresión génica de las células cultivadas en el medio R (etapa de rediferenciación) con el medio E (etapa de expansión), encontraron niveles más altos de expresión de genes implicados en procesos de inflamación (señalización de interleuquinas y citoquinas junto con señalización de interferón) durante la rediferenciación. En paralelo, los autores de la invención encontraron niveles más bajos de expresión de los genes implicados en el ciclo celular (*MI67*, *CDK*, *CCNB1*), lo que indica que la producción de matriz hialina requiere un equilibrio dinámico entre la inflamación celular y la remodelación tisular asociada con una salida del ciclo celular (Figura 7A).

Comparando la fase de expansión con la fase de rediferenciación, los autores de la invención observaron niveles altos de expresión de los genes *WNT5A*, *WNT5B* y *WNT7B* durante la fase de expansión (etapa 1, medio E, ambos métodos) (Figura 7B, D-F). Estos genes eran fuertemente regulados por disminución durante la etapa de rediferenciación (medio R, método de 3 etapas) y durante el cultivo 3D (medio I, ambos métodos), excepto el *WNT5B*, que mostró expresión intermedia en el cultivo 3D (etapa 3, medio I) (Figura 7E).

La expresión de KI67 (un marcador proliferativo) y TCF4 (implicado aguas abajo de la ruta wnt/beta catenina) también disminuye durante la etapa de rediferenciación (Figura 7C). Lo que es más importante, tras las fases de desdiferenciación y rediferenciación (M1+M2), KI67 y WNT7B/WNT5B disminuyen antes de la formación de esferas en la fase de maduración (M3). Cuando las células se utilizan para formar esferoides directamente desde la fase de desdiferenciación (M1), siguen expresando en gran medida KI67 y WNT7B/WNT5B y dan como resultado menor producción de matriz hialina.

Estos resultados están en línea con los estudios anteriores que describían una regulación por aumento de WNT tras el tratamiento con FGF-2 (Buchtova, M. et al. 2015. *Biochim Biophys Acta* 1852, 839-850; Deng, Y. et al. 2019. *Biomaterials* 192, 569-578). De hecho, la señalización WNT está implicada en el fenotipo similar a células madre (Buchtova, M. et al. 2015. *Biochim Biophys Acta* 1852, 839-850). Por consiguiente, la eliminación del FGF-2 en el medio R condujo a la regulación por disminución de la señalización WNT durante la fase de rediferenciación. Los autores de la invención detectaron niveles más bajos de expresión de *COL2A1* y *ACAN* en el método de 2 etapas en comparación con el método de 3 etapas (Figura 5C-E). Sin embargo, observaron una disminución comparable de los genes *WNT5A*, *WNT5B* y *WNT7B* en el método de 2 etapas durante la fase de diferenciación 3D en el medio I (Figura 7B).

Con el fin de validar el papel de la regulación por disminución de la vía WNT durante la fase de rediferenciación (medio R) (Figura 1A), los autores de la invención sustituyeron el medio R por medio E complementado con XAV-939 10  $\mu$ M, un inhibidor de la vía WNT durante 4 días (Figura 7G). Tras el tratamiento con XAV-939, los autores de la invención observaron un aumento de la fosfo- $\beta$ -catenina y la axina (Figura 7G), indicadores conocidos del bloqueo de la señalización WNT (Huang, S. M. et al. 2009. *Nature* 461, 614-620). Por consiguiente, de manera similar al medio R, la inhibición farmacológica del WNT inducía un aumento de la expresión de *ACAN* y *COL2A1* en el método de 2 etapas después del cultivo 2D y 3D (Figura 7H, I). Como resultado, la inhibición farmacológica del WNT daba como resultado la presencia de características hialinas en las perlas obtenidas en el método de 2 etapas en presencia de XAV-939, como se confirmó mediante la tinción con safranina-O de GAG (Figura 7J).

En conjunto, el análisis transcriptómico identificó la implicación de la vía de señalización WNT y su modulación en la desdiferenciación y rediferenciación de condrocitos, junto con *WNT5A*, *WNT5B* y *WNT7B* que actúan como posibles mediadores principales de esta respuesta (Figura 7D-F). El medio E complementado con XAV-939 imita el efecto del medio R (Figura 7K), pero el método de 3 etapas inducía naturalmente la regulación por disminución de los genes WNT en 7 días sin el uso de una costosa molécula farmacológica.

Estudio de viabilidad *ex vivo* de un defecto del cartílago humano

En el contexto de una aplicación clínica de Cartibeads, los autores de la invención evaluaron la capacidad de los

Cartibeads para fusionarse entre sí e integrarse en una lesión generada en una articulación de rodilla humana *ex vivo*. Se creó una lesión con una biopsia quirúrgica por punción de 8 mm y se rellenó con de 20 a 50 Cartibeads en estado seco. Los Cartibeads se mantuvieron 20 minutos en esas condiciones, para facilitar la adhesión de los Cartibeads al sitio de la lesión y entre sí (Figura 8A, panel izquierdo y central), seguido de la adición del medio I. Después, se cultivó todo el espécimen con la lesión llena de Cartibeads durante 1 mes en rotación para facilitar una alta transferencia de masa de nutrientes. Un mes después del implante, los autores de la invención analizaron el hueso-tejido del cartílago (Figura 8A, panel derecho) y realizaron la tinción con safranina-O al nivel de la lesión rellena (Figura 8B). Los autores de la invención observaron el mantenimiento de las características hialinas dentro de la lesión y cierto nivel de integración de los Cartibeads con el tejido circundante nativo y la fusión de los Cartibeads entre sí (Figura 8B).

#### 10 Estudios preclínicos de seguridad de Cartibeads *in vitro* e *in vivo*

El trasplante de células expandidas *in vitro* plantea un problema de posible proliferación descontrolada. La seguridad de Cartibeads se evaluó mediante estudios preclínicos. El análisis de matrices de CGH (hibridación genómica comparativa) mostró la estabilidad genética de los condrocitos durante la amplificación celular hasta el pase 11 (Tabla 5).

- 15 Tabla 5: Lista de donantes de Cartibeads analizados por matriz de CGH. La estabilidad genética de los condrocitos se evaluó tras una expansión extensa en el medio E con la presencia del FGF-2, realizando un análisis de matrices de hibridación genómica comparativa (CGH) en diez muestras de donantes cultivadas de los pases 3 a 11.

Donante analizado por matriz de CGH	Pase de células
Donante 3 (M, 29)	P4 y P8
Donante 2 (M, 47)	P3 y P11
Donante 20 (M, 38)	P4
Donante 18 (M, 58)	P4
Donante 23 (M, 63)	P3 (pérdida de Y)
Donante 13 (F, 64)	P5
Donante 8 (F, 65)	p4
Donante 21 (M, 68)	P5 (pérdida de Y)
Donante 14 (M, 69)	P5
Donante 9 (M, 80)	P4 (pérdida de Y)

- 20 De acuerdo con estudios anteriores, la pérdida del cromosoma Y es una mutación adquirida común en el envejecimiento normal de los hombres y se observó en una fracción (43%) de los donantes mayores (Thompson, D. J. et al. 2019. *Nature* 575, 652-657; Stumm, M. et al. 2012. *Osteoarthritis and cartilage* 20, 1039-1045).

- 25 En el estudio *in vivo*, los autores de la invención evaluaron un posible efecto tumorigénico de los Cartibeads humanos trasplantados en ratones SCID. Los Cartibeads no se expandieron y en su mayoría fueron indetectables 6 meses después de la implantación en ratones SCID, confirmando así la ausencia de potencial tumorigenicidad a lo largo de un seguimiento de 6 meses (Figura 9A-C, Tabla 5).

#### Estudio preclínico de eficacia *in vivo*

- 30 Con el fin de avanzar hacia la aplicación clínica, los autores de la invención realizaron un estudio preclínico de eficacia en minicerdos adultos de Gotinga, elegidos por su madurez del cartílago y por una anatomía de la rodilla parecida a la de los seres humanos (Christensen, B. B. et al. 2015. *Journal of experimental orthopaedics* 2, 13; Pfeifer, C. G. et al. 2017. *Tissue engineering. Parte C, Methods* 23, 745-753). Se utilizaron seis hembras en el estudio. Se realizó una primera cirugía para extraer una biopsia de cartílago (~30 mg) de la rodilla para producir Cartibeads autólogos de minicerdo. Se realizó una segunda cirugía para inducir de 4 a 5 lesiones por animal/rodilla derecha y para trasplantar Cartibeads autólogos. Se hizo el seguimiento de los minicerdos entre 3 y 6 meses (Figura 10A; Figura 11). Antes del trasplante, se cuantificó la cantidad de GAG en los Cartibeads de minicerdo y variaba de 40 a 50 µg/perla en promedio (Figura 10B). A los 3 meses después del trasplante, los autores de la invención confirmaron las características hialinas de las lesiones con injertos de Cartibeads de minicerdo mediante tinción con safranina-O (Figura 10C). Se obtuvieron resultados similares de las lesiones injertadas 6 meses después del trasplante (Figura 10D). En todos los minicerdos se observó una fusión completa de Cartibeads y su integración en el cartílago nativo circundante y el hueso subcondral a los 3 y 6 meses de los periodos de seguimiento (Figura 10C-D). En conjunto, los Cartibeads autólogos demostraron

su eficacia en términos de injerto en las lesiones, preservando al mismo tiempo su calidad hialina. También demostraron ser seguros, ya que en una macroinspección realizada por dos operadores independientes no se observó ni una degeneración de la articulación (Figura 11, panel central) ni una formación de tejido ectópico o hipertrófico (datos no mostrados).

## 5 Discusión y conclusiones

El principal logro del presente estudio es un método que puede revertir la pérdida del fenotipo de los condrocitos (desdiferenciación de condrocitos) durante la expansión. Esto resuelve un problema clave que se encuentra en la terapia celular que usa condrocitos como material de partida. Los presentes datos demuestran que un nuevo método de 3 etapas puede producir un cartílago de alta calidad con características hialinas, independientemente de la edad del paciente y del estado artrítico de la articulación.

El método de Cartibeads permite la expansión celular a partir de una muestra muy pequeña de cartílago extraído (~30 mg en el estudio preclínico con minicerdos de los autores de la invención), a diferencia de los 260 mg de media de la terapia celular convencional basada en condrocitos humanos (Brittberg, M. 2008. *Injury* 39 Suppl 1, S40-49), lo que reduce la morbilidad en el sitio donador. El presente método mostró una relación de GAG/Cartibead que es 20 veces mayor que la de los microtejidos de cartílago previamente descritos, lo que sugiere que estos microtejidos de cartílago son menos hialinos y contienen más fibrocartílago (Bartz, C. et al. 2016. *J Transl Med* 14, 317). De acuerdo con esos resultados, los autores de la invención obtuvieron en promedio una relación de GAG/ADN al menos tres veces superior a la de otros métodos publicados (Figura 2B) (Mumme, M. et al. 2016. *Lancet* 388, 1985-1994; Dang, P. N., Solorio, L. D. y Alsberg, E. 2014. *Tissue engineering*. Parte A 20, 3163-3175).

La rediferenciación se debió a la eliminación del FGF-2. Sin embargo, su eliminación en el cultivo 3D no era suficiente para inducir la síntesis de la matriz hialina en el método de 2 etapas. Lo más probable es que la rediferenciación de los condrocitos requiera la adhesión celular a un matraz revestido con matriz y la inducción de vías de señalización celular específicas en el cultivo 2D. La inanición del FGF-2 desactiva los genes implicados en la multipotencia y la severidad, incluidos varios genes de la vía de señalización WNT. La señalización WNT está implicada tanto en la inhibición como en la estimulación de la diferenciación condrogénica de las células progenitoras adultas (Day, T. F. et al. 2005. *Developmental cell* 8, 739-750; Hill, T. P., et al. 2005. *Developmental cell* 8, 727-738; Hu, H. et al. 2005. *Development*, 132, 49-60). Como se muestra en los embriones, los niveles altos de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina inhiben la diferenciación condrogénica de las células madre, mientras que la regulación por disminución de esta vía induce la condrogénesis (Hartmann, C. 2007. *Molecules and cells* 24, 177-184; Johnson, M. L. y Rajamannan, N. 2006. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 7, 41-49; Westendorf, J. J., Kahler, R. A. y Schroeder, T. M. 2004. *Gene* 341, 19-39).

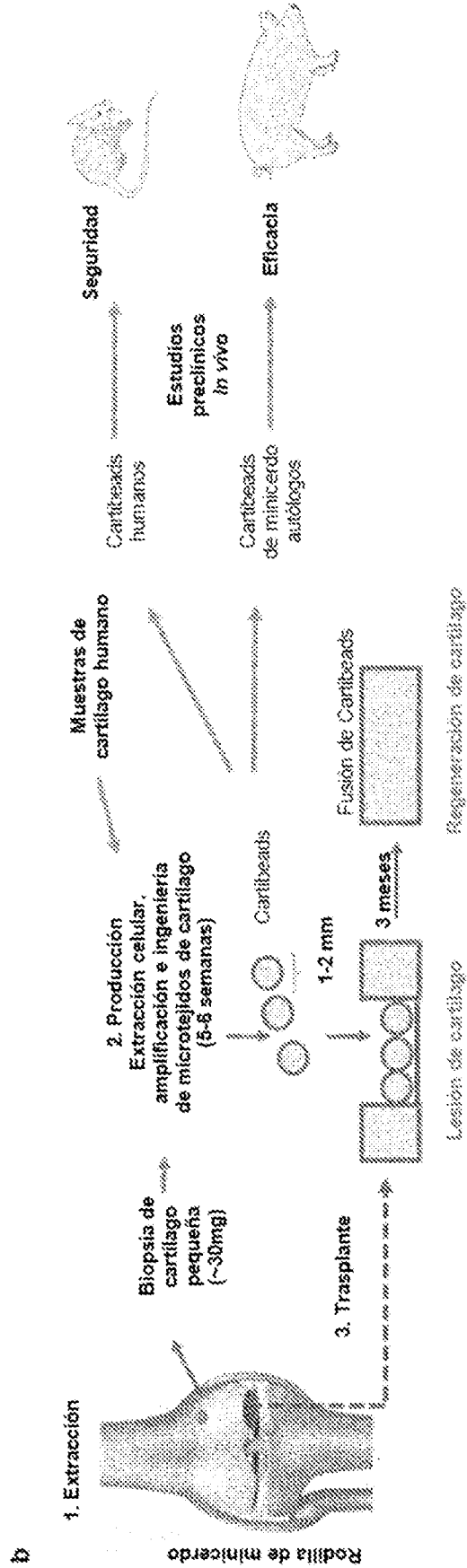
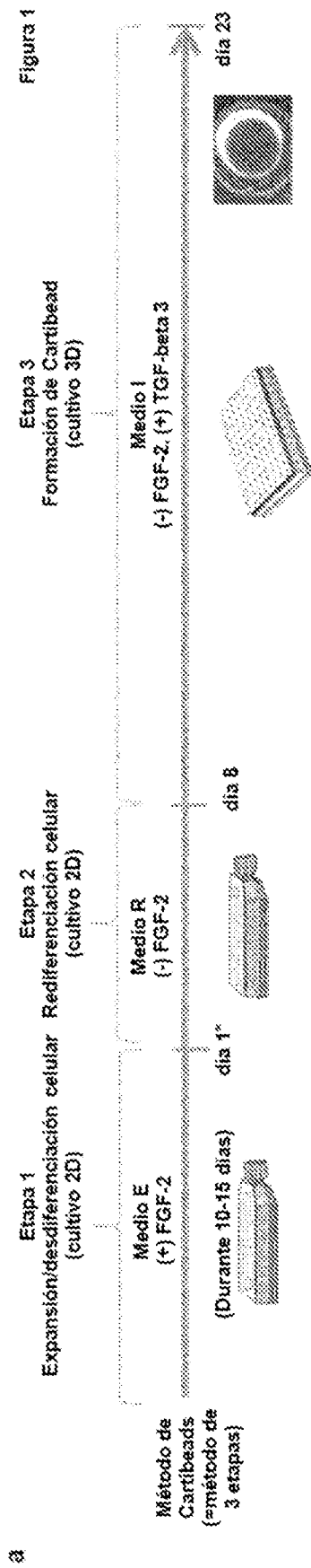
En el presente estudio, los autores de la invención identificaron *WNT5A*, *WNT5B* y *WNT7B* como probables isoformas de WNT implicadas en este mecanismo. Paralelamente a la regulación por disminución de la vía WNT, los autores de la invención observaron un aumento en la expresión de los genes implicados en la vía inflamatoria (interleuquinas, citoquinas). En la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, un equilibrio dinámico entre los factores proinflamatorios y antiinflamatorios es esencial para una cicatrización eficaz (Gerhard T. Laschober et al. 2011. *Rejuvenation Research* 14, 119-131; Bosurgi, L. et al. 2017. *Science* 356, 1072-1076). Por consiguiente, los datos presentes sugieren que la inflamación es un requisito previo para la regeneración tisular asociada con la biosíntesis de la matriz hialina (Karin, M. y Clevers, H. 2016. *Nature* 529, 307-315).

Los Cartibeads humanos no proliferaban cuando se implantaron en ratones SCID e incluso desaparecieron después de 6 meses, lo que está de acuerdo con estudios similares (Zscharnack, M. et al. 2015. *J Transl Med* 13, 160). Además, el trasplante autólogo de Cartibeads en minicerdos mostró la integración estable en las lesiones, mantuvo niveles altos de GAG y reparó con éxito el daño del cartílago a los 6 meses después del trasplante. En resumen, los autores de la invención mostraron la viabilidad del trasplante de Cartibeads que contenían un alto nivel de GAG en un modelo animal grande, lo que respaldaba su potencial para una reparación del cartílago a largo plazo. Por consiguiente, los Cartibeads representan un gran avance en el campo de la reparación del cartílago y ahora pueden entrar en la fase I de un ensayo clínico (el primero en seres humanos) para trasplantes autólogos de cartílago en pacientes con daños en el cartílago.



## REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción *in vitro* de tejido de cartílago hialino que comprende:
  - i) cultivar condrocitos en un sistema de cultivo adherente en un medio de cultivo de desdiferenciación que activa la vía de señalización Wnt para obtener condrocitos con una morfología de células de tipo fibroblástico;
- 5      ii) cultivar dichos condrocitos de tipo fibroblástico en un sistema de cultivo adherente en un medio de cultivo de rediferenciación que inactiva la vía de señalización Wnt para obtener condrocitos con plena capacidad para resintetizar la matriz hialina;
- iii) cultivar dichos condrocitos obtenidos en la etapa ii) en un sistema de cultivo tridimensional en un medio de cultivo de inducción/maduración que mantiene la inactivación de la vía de señalización Wnt.
- 10    2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho medio de cultivo de desdiferenciación comprende FGF-2, y dicho medio de cultivo de rediferenciación y medio de cultivo de inducción/maduración son medios exentos de FGF-2.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho medio de cultivo de desdiferenciación comprende al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en: FGF-2, PDGF-BB, TGF- $\beta$  y EGF, preferiblemente dicho medio de cultivo de desdiferenciación comprende FGF-2.
- 15    4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho medio de cultivo de rediferenciación y dicho medio de cultivo de inducción/maduración comprenden TGF- $\beta$ , preferiblemente TGF- $\beta$ 3, más preferiblemente TGF- $\beta$ 3 y FGF-7.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho medio de cultivo de rediferenciación comprende lisado plaquetario.
- 20    6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho medio de cultivo de desdiferenciación, medio de cultivo de rediferenciación y/o medio de cultivo de inducción/maduración comprende(n) suero.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho medio de cultivo de inducción/maduración comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en: insulina, IGF-1, BMP-2, selenio, transferrina y etanolamina.
- 25    8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos condrocitos se cultivan en la etapa iii) en atmósfera de hipoxia que comprende menos de 10% de O<sub>2</sub> (v/v).
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichos condrocitos se cultivan en la etapa i) durante 10 a 15 días, en la etapa ii) durante 4 a 8 días, y/o en la etapa iii) durante 10 a 15 días.
- 30    10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dichos condrocitos de la etapa i) son condrocitos aislados de un sujeto, preferiblemente del tejido cartilaginoso de un sujeto humano o equino.
11. Un tejido cartilaginoso de ingeniería en una forma de esferoide que presenta un contenido de glicosaminoglicanos (GAG) por esferoide entre 10 y 100  $\mu$ g/esferoide que se puede obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 35    12. Una composición farmacéutica que comprende el tejido cartilaginoso de ingeniería de la reivindicación 11, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. El tejido cartilaginoso de ingeniería según la reivindicación 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12, para usar en el tratamiento de defectos del cartílago y enfermedades degenerativas del cartílago en un sujeto que lo necesite.
- 40    14. El tejido cartilaginoso de ingeniería o composición farmacéutica para usar según la reivindicación 13, en donde dicho tejido cartilaginoso de ingeniería o composición farmacéutica es para usar en el trasplante autólogo en un sujeto que lo necesite.
15. El tejido cartilaginoso de ingeniería o composición farmacéutica para usar según la reivindicación 13, en donde dicho tejido cartilaginoso de ingeniería o composición farmacéutica es para usar en el trasplante alogénico en un sujeto que lo necesite.
- 45    16. Un método de cribado de moléculas que inhiben el proceso degenerativo del cartílago, que comprende:
  - i) poner en contacto el tejido cartilaginoso de ingeniería de la reivindicación 11 con una o más moléculas candidatas, y
  - ii) seleccionar las moléculas que inhiben el proceso degenerativo del cartílago.



**FIG. 1A-B**

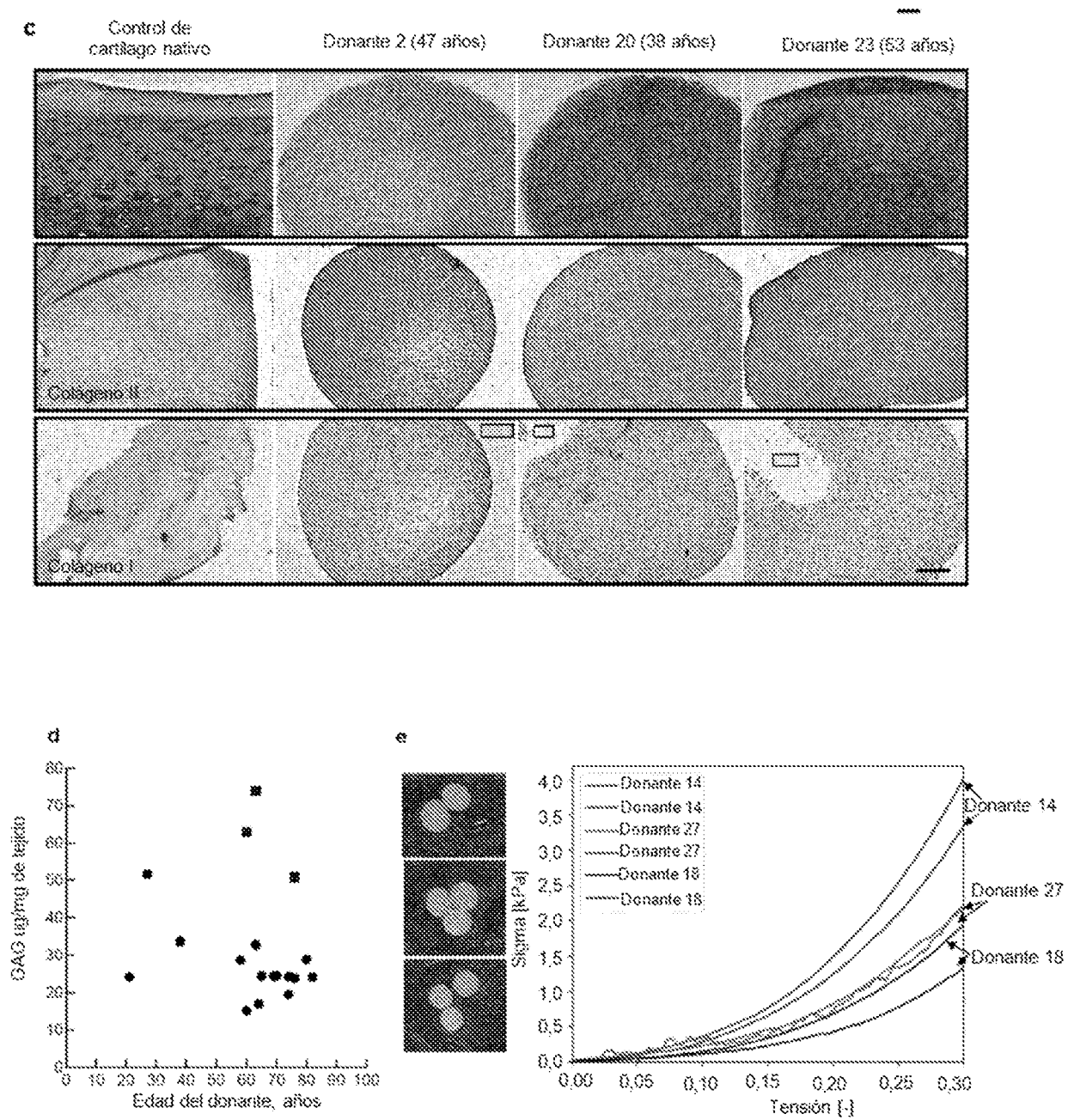


FIG. 1C-E

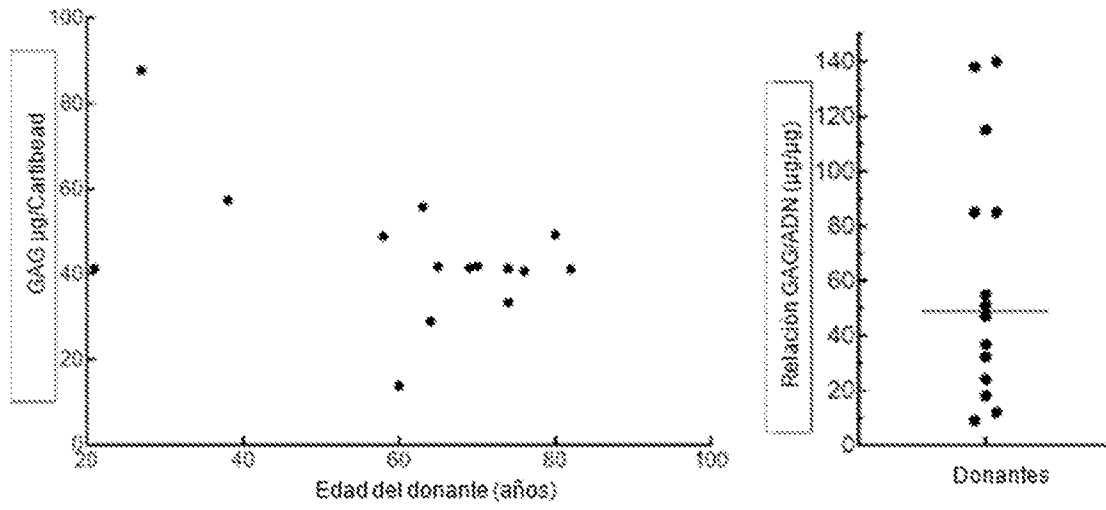


FIG. 2

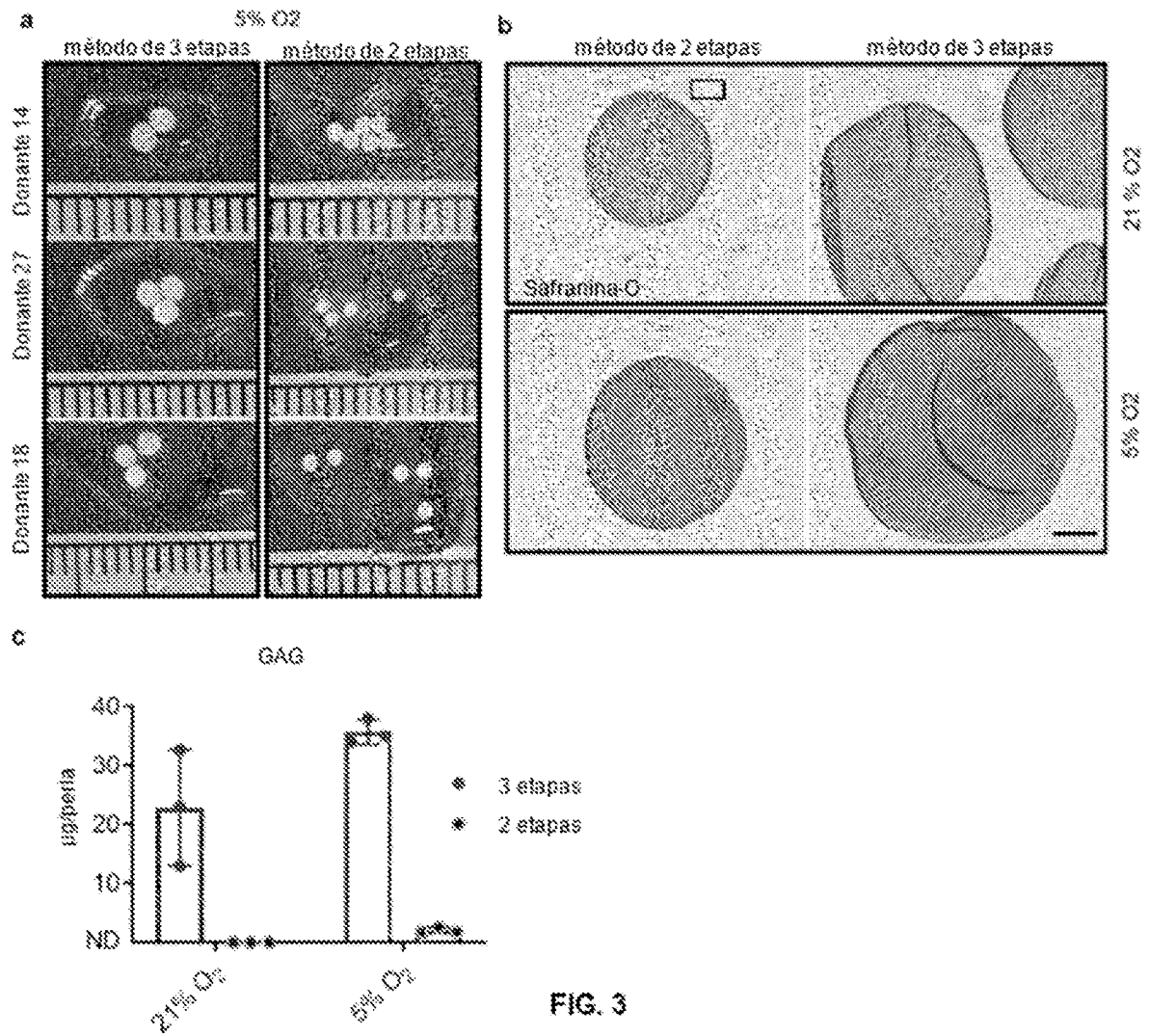
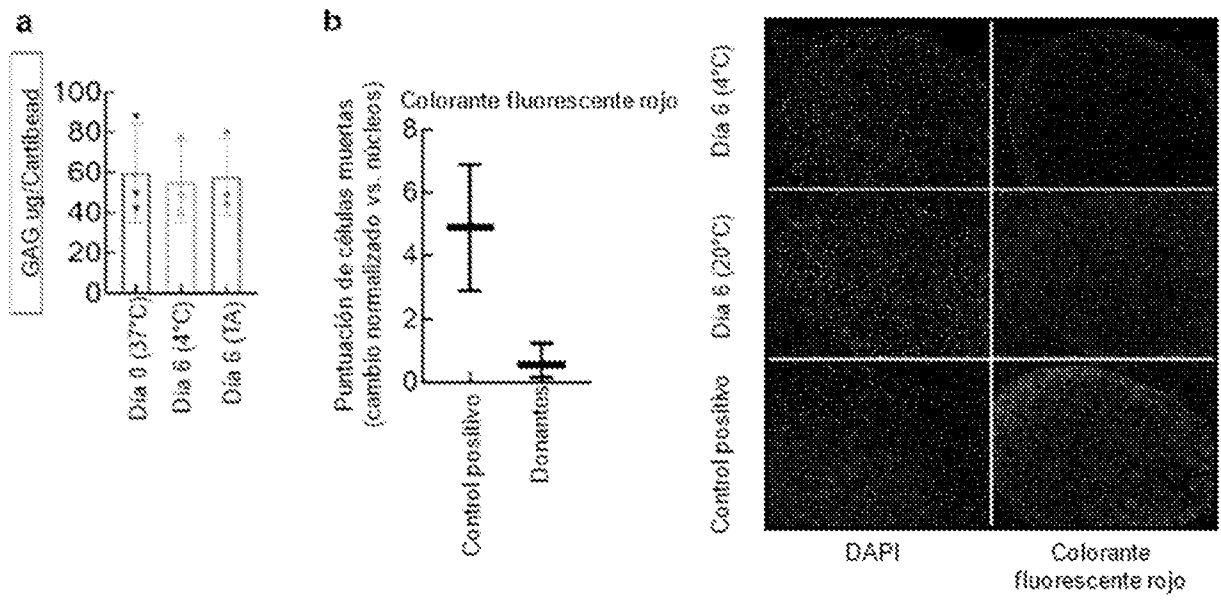


FIG. 3



**FIG. 4**

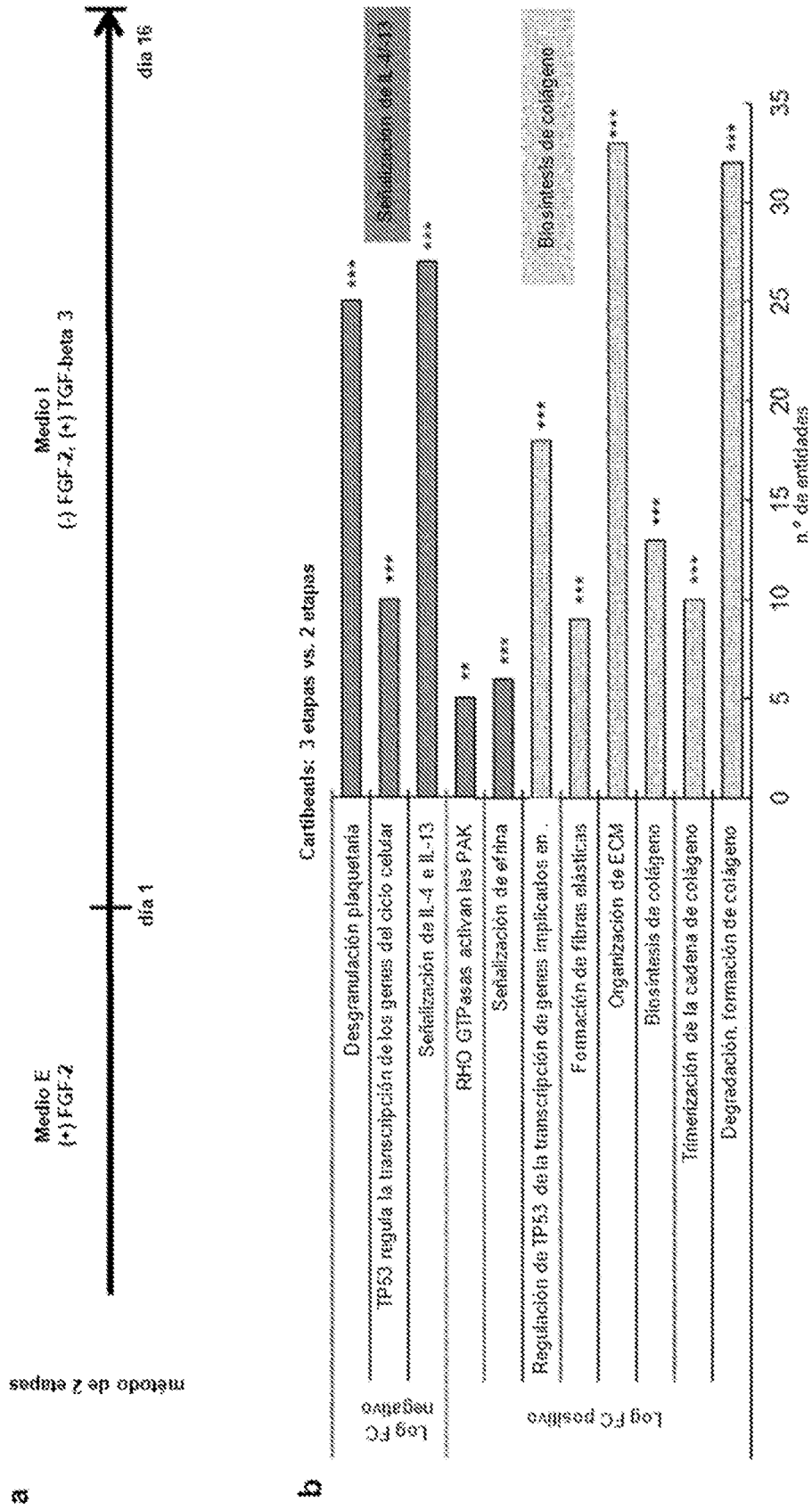


FIG. 5A-B

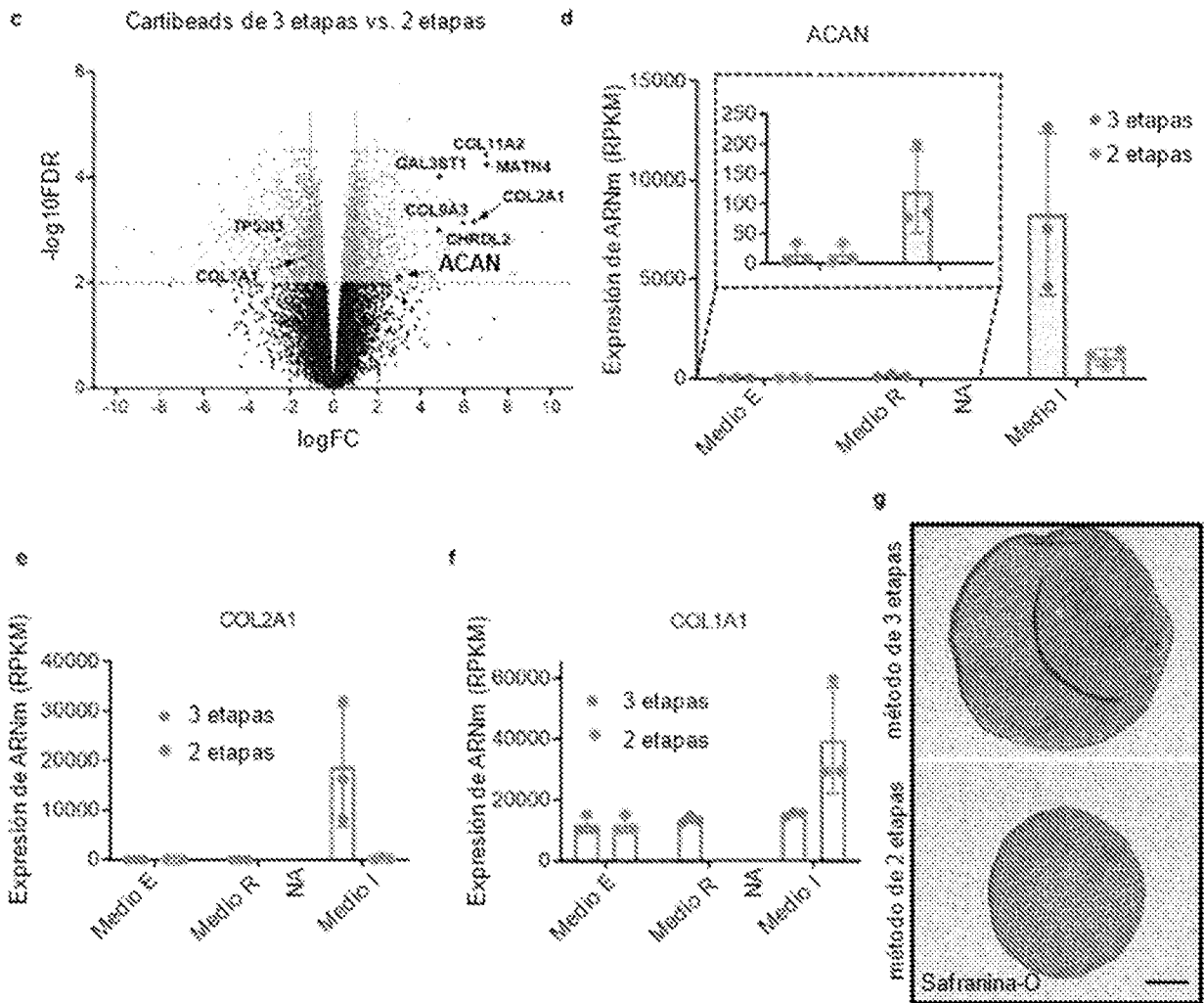


FIG. 5C-G

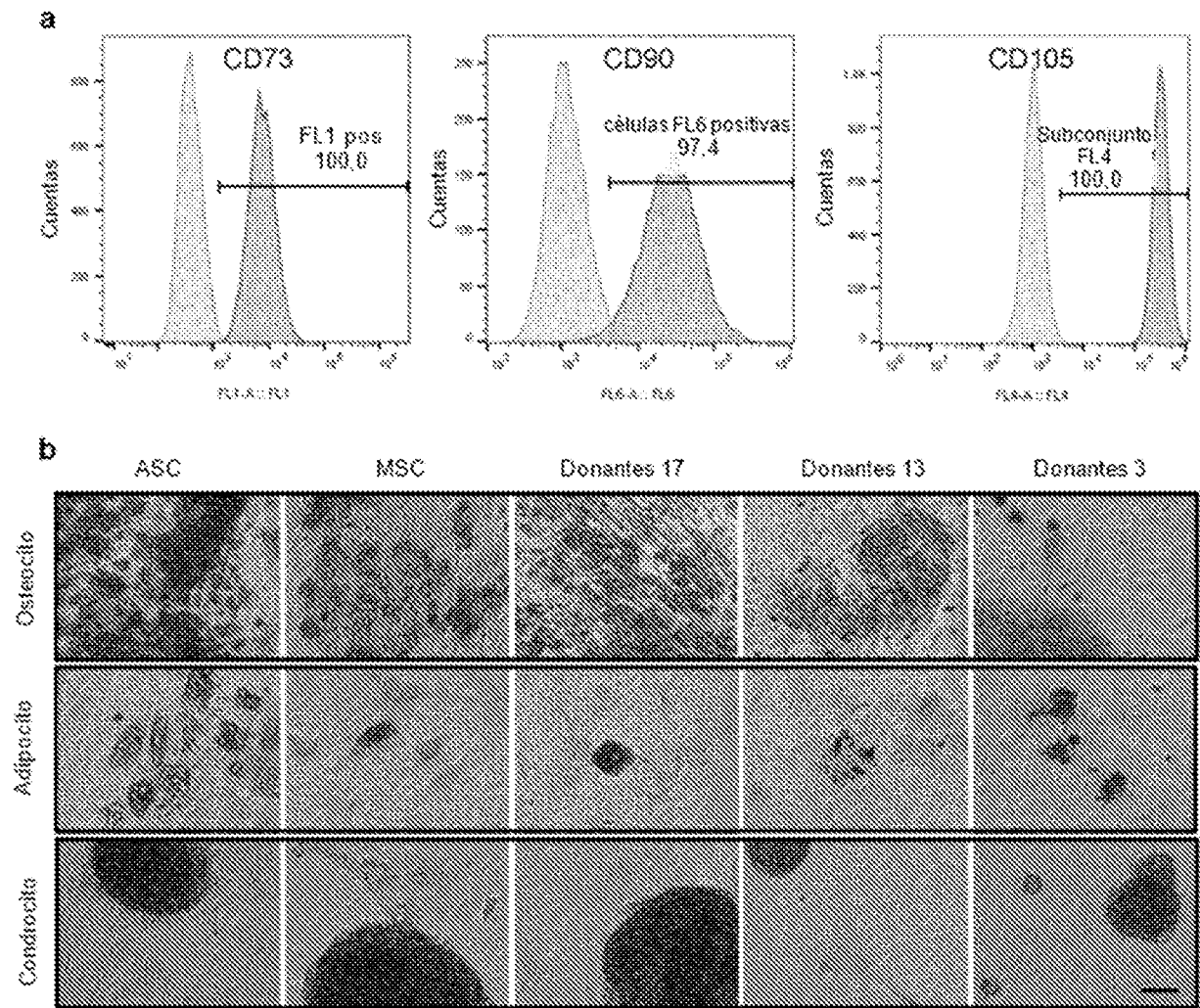


FIG. 6



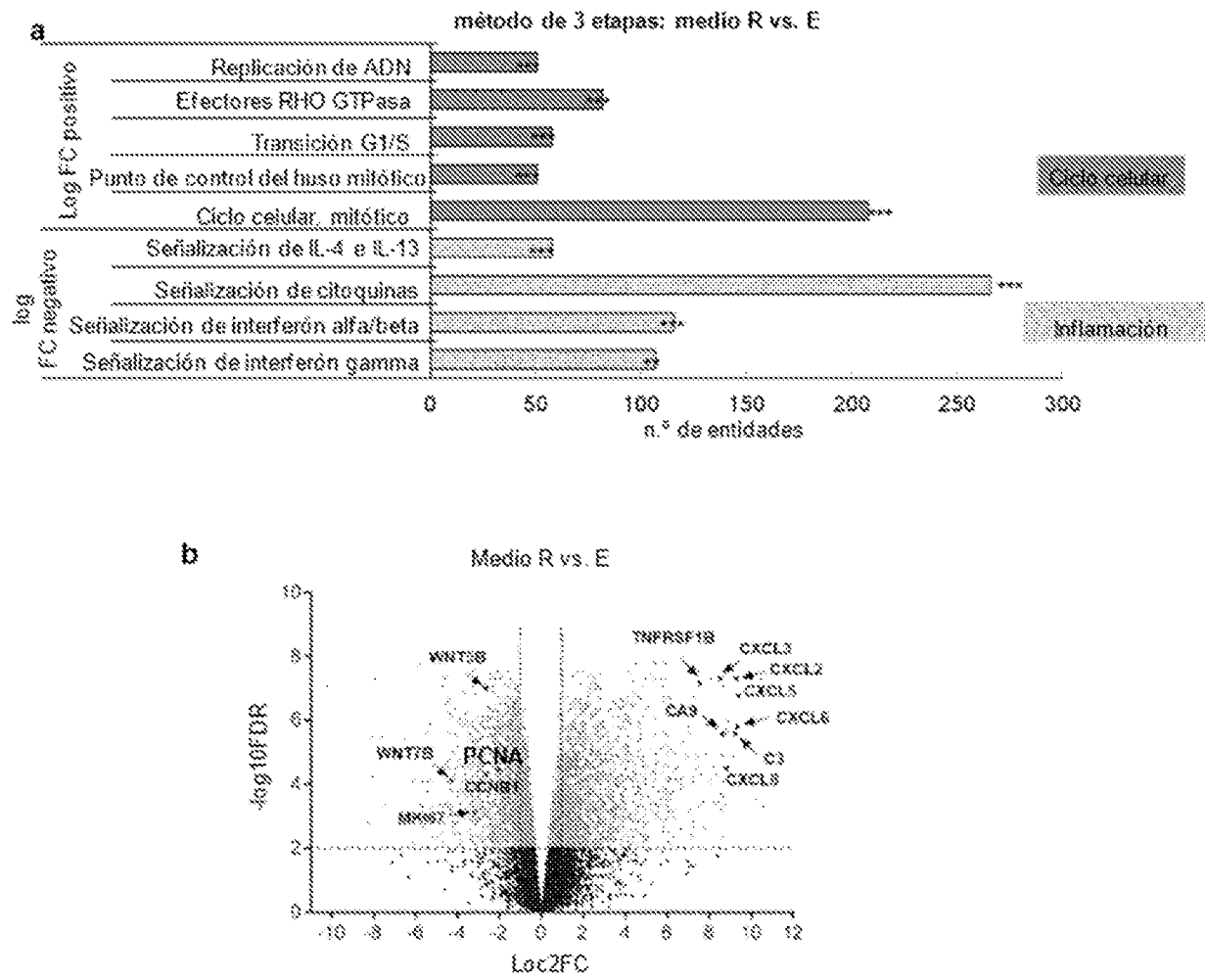


FIG. 7A-B

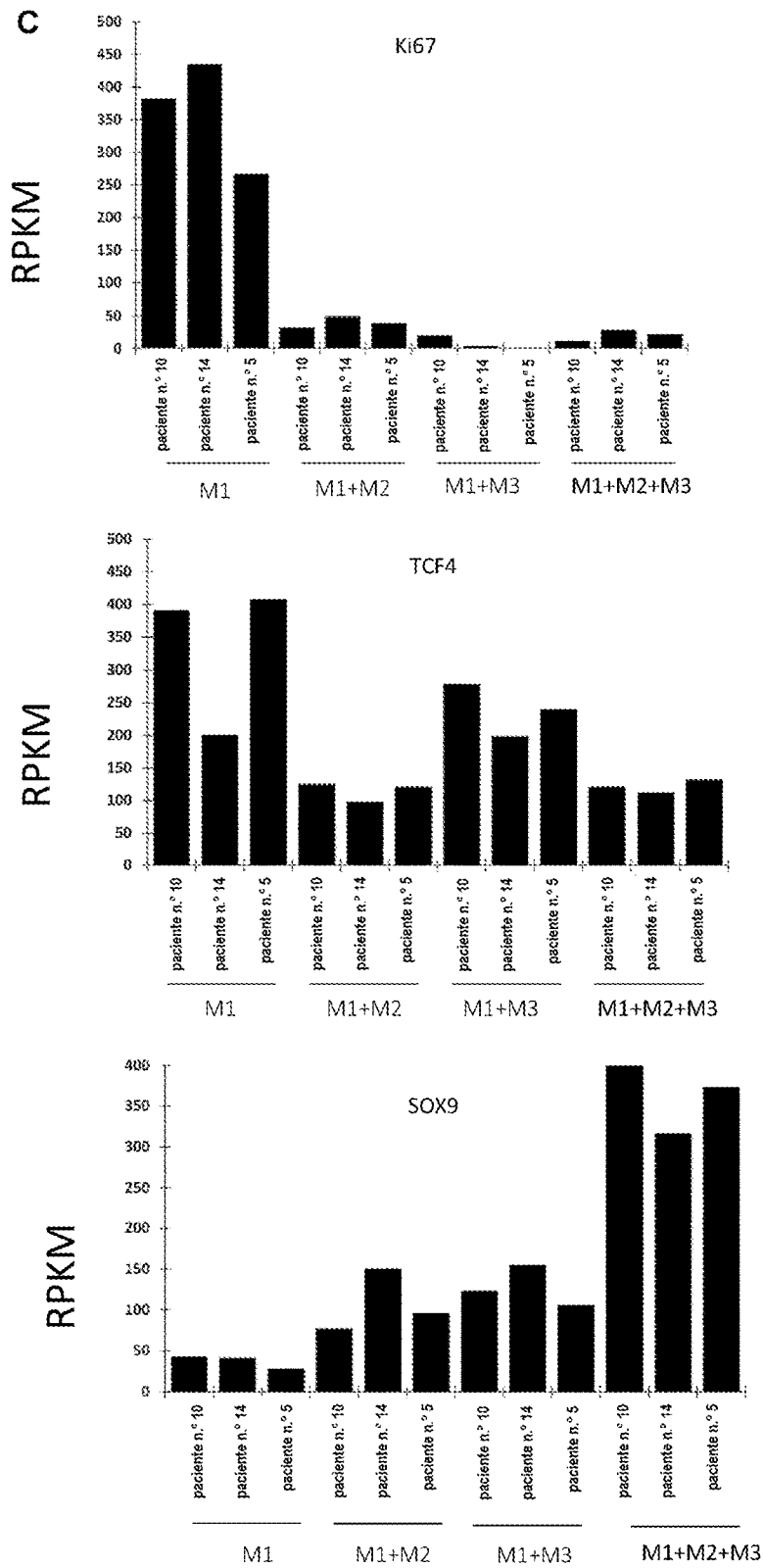


FIG. 7C

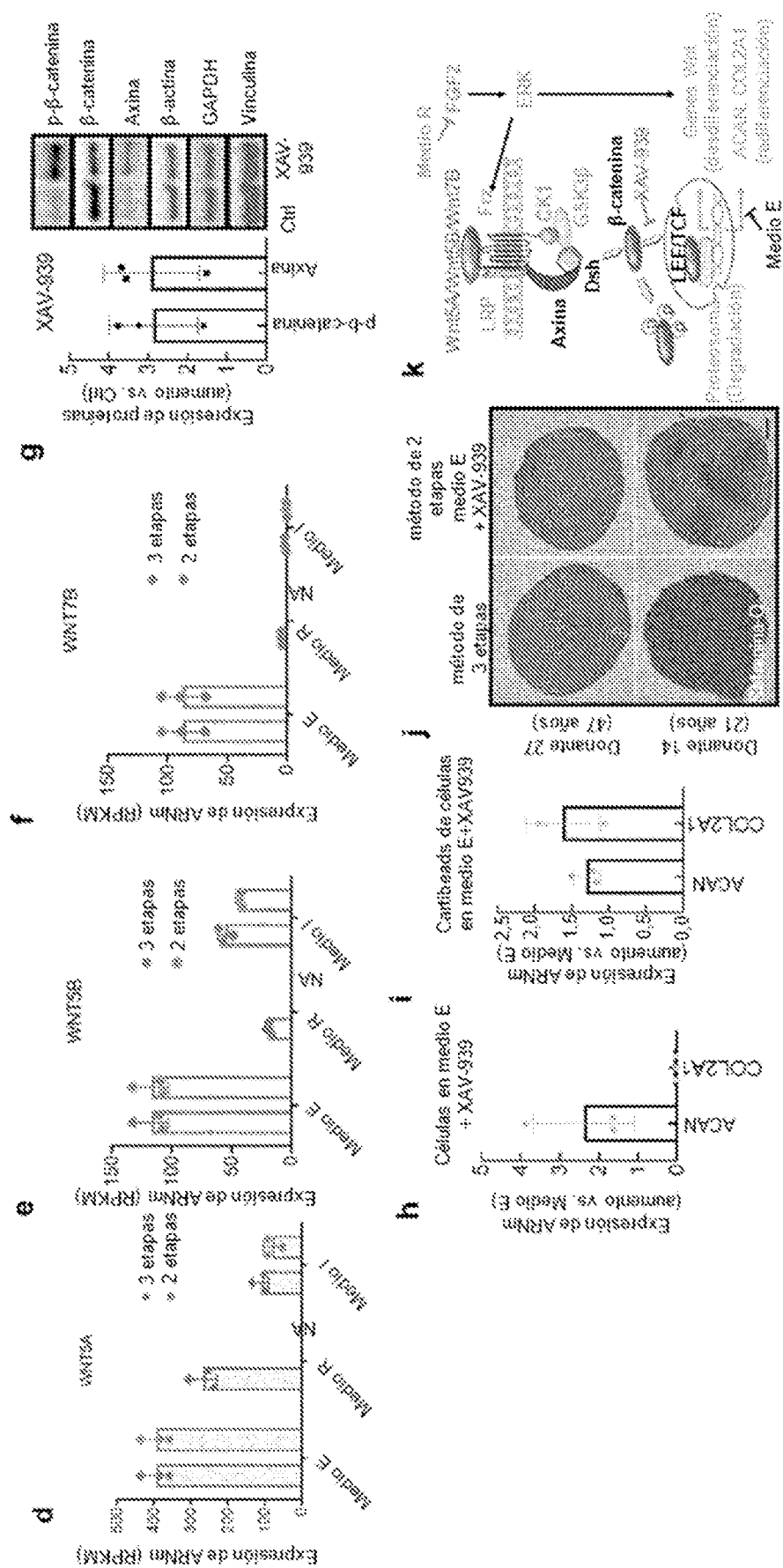


FIG. 7 D-K

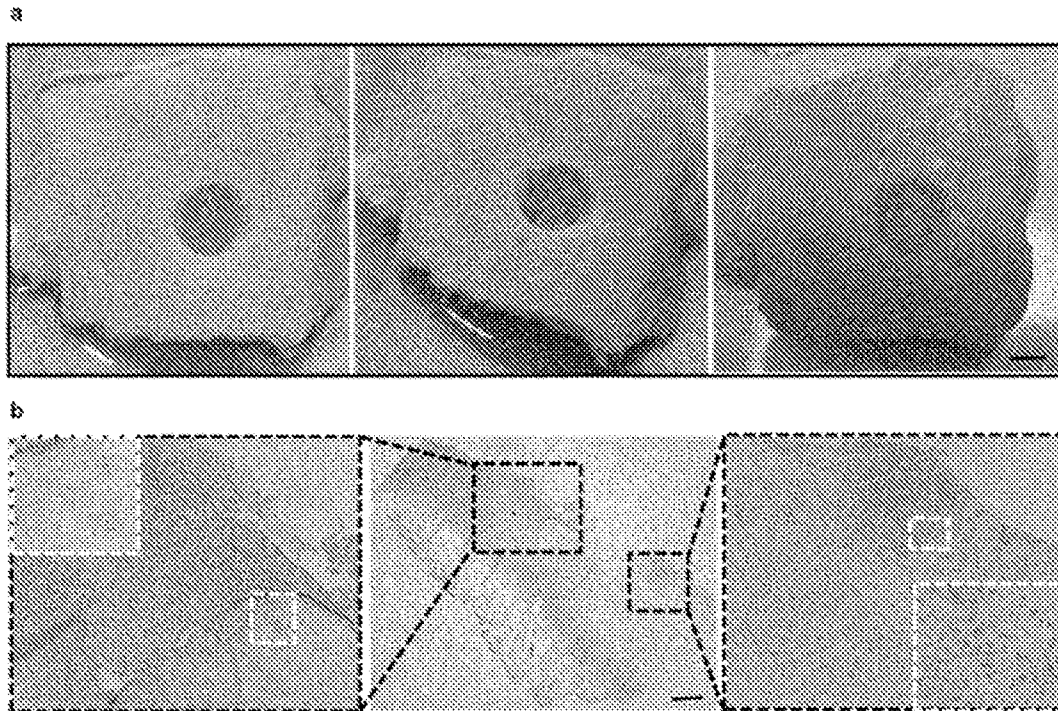


FIG. 8

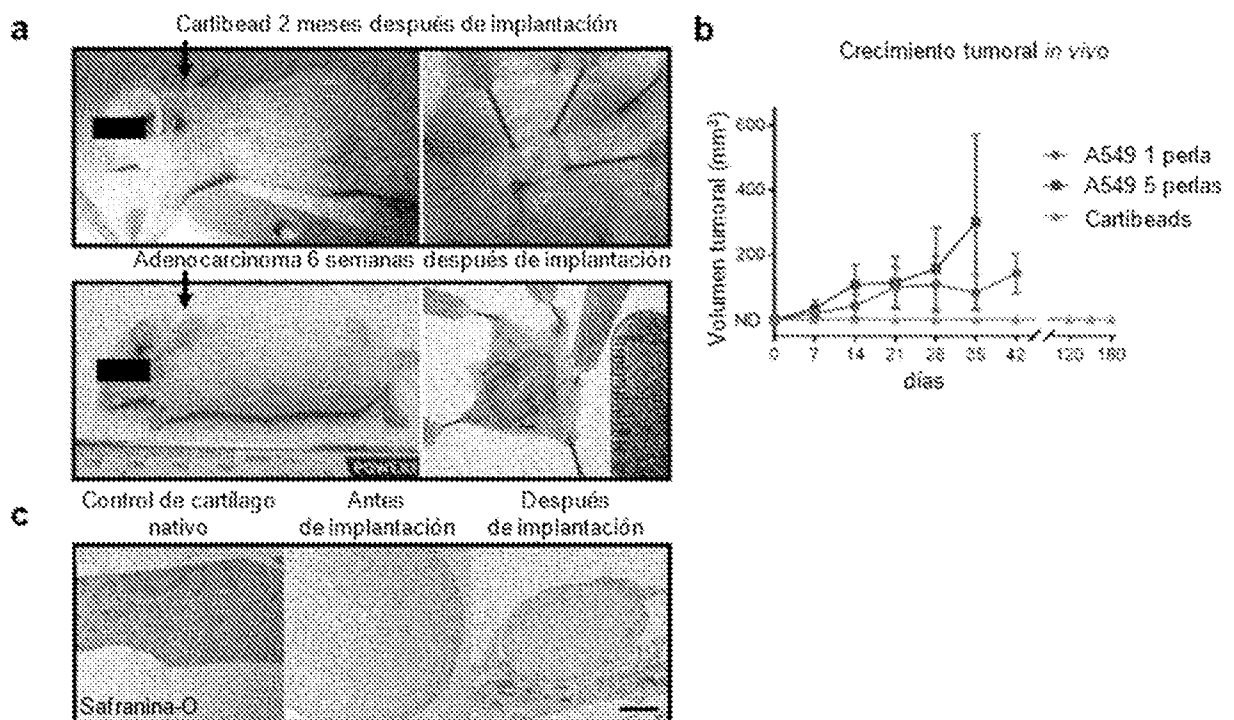


FIG. 9

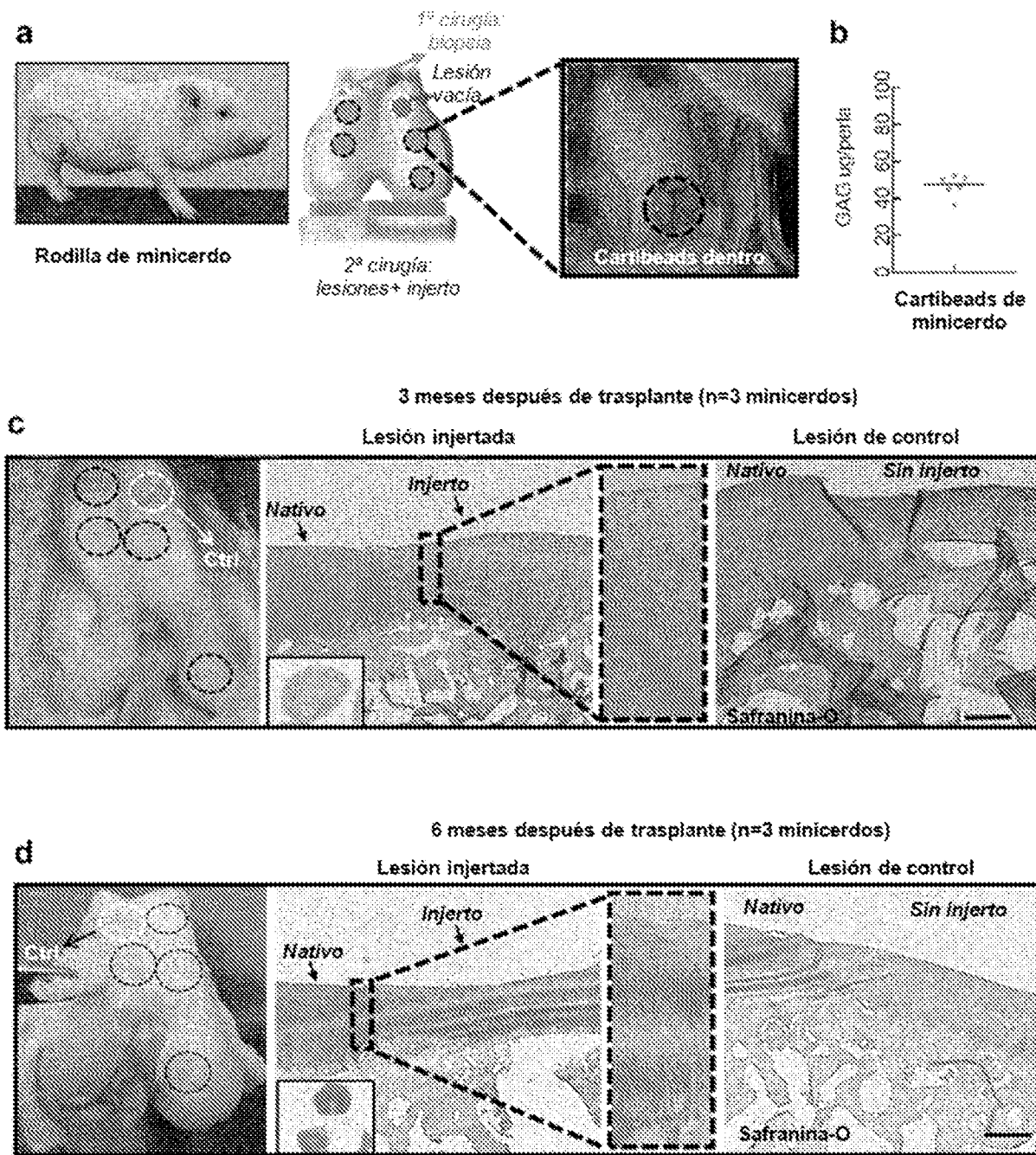


FIG. 10

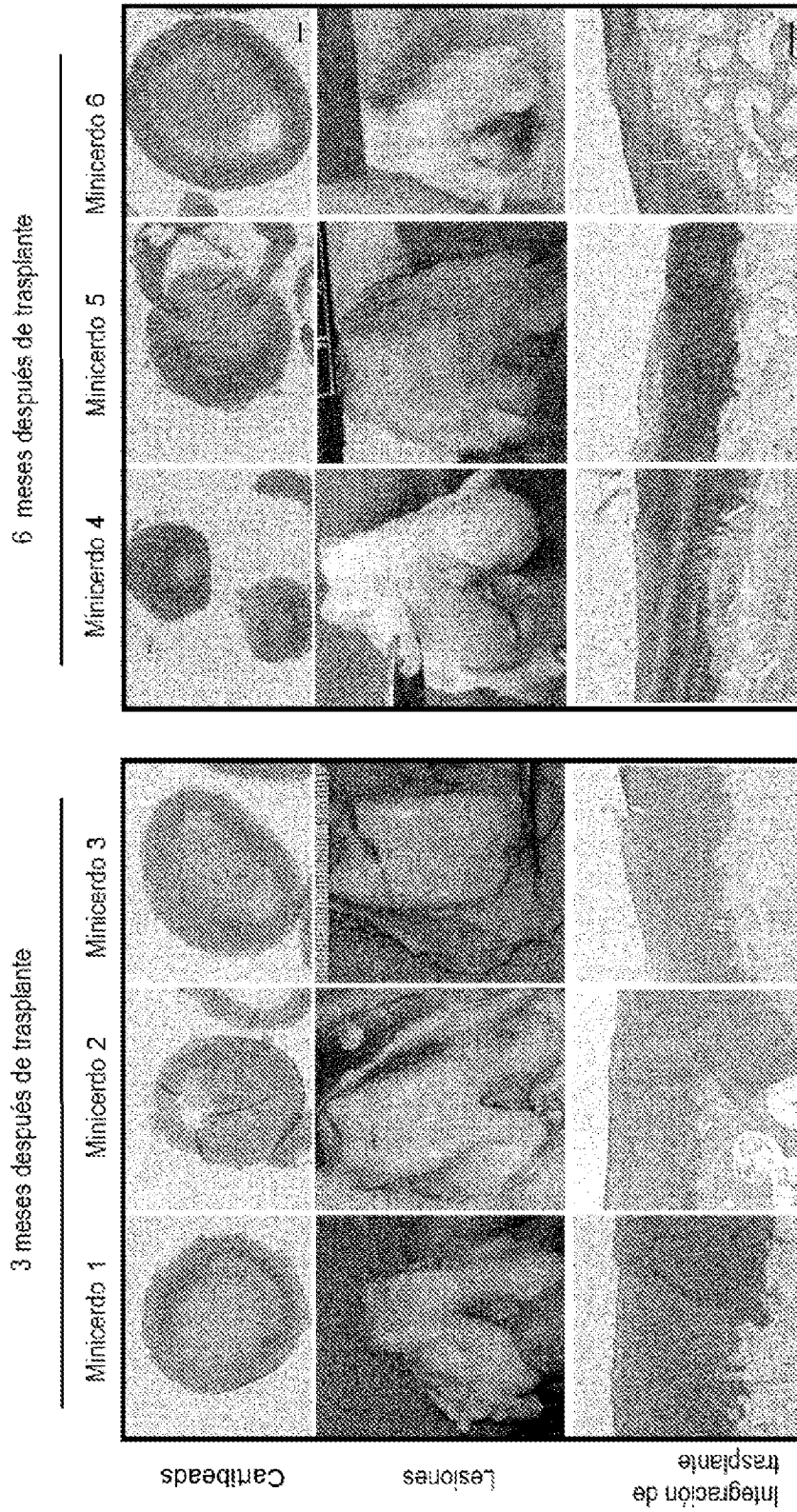


FIG. 11