



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 678**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07002971 .5**

96 Fecha de presentación : **29.05.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1792980**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Biomatriz de colágeno y método para producirla.**

30 Prioridad: **31.05.2000 DE 100 26 789**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2011

73 Titular/es: **ARTHRO KINETICS AG.**
Life Science Center Schelztorstrasse 54-56
73728 Esslingen, DE

72 Inventor/es: **Noll, Michaela;**
Schandar, Markus y
Graeve, Thomas

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 356 678 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

Biomatriz de colágeno y método para producirla.

La presente invención se refiere a una biomatriz y a métodos para su preparación.

5 Las enfermedades de las articulaciones son trastornos muy comunes, que van acompañados de un gran número de molestias para las personas afectadas. Así por ejemplo, los defectos óseos y cartilagosos juegan un papel importante en la patogénesis de la artrosis y también en los estados postraumáticos y en las endoprótesis dislocadas. Estos defectos pueden tratarse con el empleo de hueso o cartílago autólogo u homólogo, o bien mediante materiales sustitutivos adecuados. Como no se dispone ilimitadamente de materiales autólogos, en el caso de los injertos homólogos hay que tener en cuenta los aspectos infecciológicos.

10 El principal problema de los trastornos degenerativos o traumáticos de las articulaciones reside en la poca capacidad de regeneración del cartílago dañado. Un tratamiento conocido de estos defectos cartilagosos es el implante autólogo de condrocitos (ACT) como método de terapia biológica. Con este método terapéutico se pudo detectar por primera vez la formación nueva de cartílago hialino en un defecto cartilaginoso articular.

15 El principio de este método se basa en inyectar células cartilaginosas del paciente, cultivadas in vitro después de desbridar el cartílago degenerado, bajo un colgajo perióstico cosido sobre el defecto (método Peterson). El procedimiento es técnicamente complicado y plantea problemas metodológicos; por ejemplo, no garantiza que las células cartilaginosas permanezcan mucho tiempo en la grieta. Además no está claro que las células cartilaginosas cultivadas sean capaces de formar la matriz necesaria para rellenar permanentemente la grieta en el momento del trasplante. Las células trasplantadas se encuentran mayormente en un estado desdiferenciado y tienen similitudes morfológicas y fisiológicas con los fibroblastos.

20 De la patente DE 197 21 661 A1 se conoce el empleo de nuevos materiales, para sustituir huesos o cartílagos, que, aun siendo conocidos, se caracterizan por tener una estructura específica. Se trata de un implante de hueso o cartílago basado en una red tridimensional formada básicamente por un gran número de varillas de un material total o parcialmente bioabsorbible, dispuestas regularmente. Las varillas forman una estructura geométrica tridimensional cuya elasticidad y resistencia están adaptadas al tejido que debe reemplazarse en el cuerpo del paciente. Las varillas pueden ser de poli-D-lactidas, poli-L-lactidas, poli-DL-lactidas, hidroxiapatitos, fosfatos cálcicos o mezclas de estas sustancias que contengan esencialmente fosfatos cálcicos o hidroxiapatitos, colágeno, agar o gelatina.

25 La patente WO 99/08728 revela una mezcla de factores osteoinductivos o condroinductivos incluida en nanoesferas. También se revela un sistema formado por una matriz biodegradable que contiene, por ejemplo, colágeno de tipo I o de tipo II en el cual están incluidos los factores envueltos por las nanoesferas. Las nanoesferas están constituidas por partículas poliméricas.

30 De la patente WO 95/33821 se conoce la elaboración de estructuras tridimensionales de colágeno cuyos intersticios están puenteados, p.ej. mediante fibroblastos o condrocitos, y esta red se cultiva en un medio de cultivo. En este documento se describe el cultivo de dichas células sobre una red tridimensional, así como el uso de este tejido artificial como prótesis cartilaginosa.

35 La patente WO 98/17791 describe la extracción y el uso de precursores de condrocitos, que pueden multiplicarse metódicamente por cultivo y utilizarse como tejido cartilaginoso terapéutico. También describe el cultivo de condrocitos sobre una red tridimensional cuyos intersticios van puenteados por los condrocitos.

40 La patente WO 99/00152 revela un método para producir un injerto bioartificial, que consiste en separar todas las células antígeno-reactivas de un tejido alógeno o xenógeno por tratamiento enzimático o químico y en colonizar con las células autólogas deseadas el material libre de células y no desnaturalizado así obtenido, con lo cual resulta un injerto inmediatamente listo para trasplantar.

La desventaja de los métodos conocidos es que las células cartilaginosas trasplantadas o cultivadas no reasumen su capacidad sintetizadora original.

45 Las células cartilaginosas incluidas en la sustancia intracelular del cartílago - los condrocitos - se desdiferencian precisamente durante el periodo de cultivo bajo condiciones in vitro. Mientras que las células cartilaginosas primarias (cultivo P0) aún muestran capacidades específicas para sintetizar células cartilaginosas después de su aislamiento del tejido cartilaginoso, como lo demuestra la formación de colágeno de tipo II, IX y XI, las células cultivadas pierden estas características típicas durante los sucesivos pasajes in vitro (P1-PX).

50 Asimismo, al contrario que otras células, las células cartilaginosas son difíciles de cultivar. Las células cartilaginosas cultivadas se hallan en un estado desdiferenciado y se parecen morfológicamente y fisiológicamente a los fibroblastos. Sin embargo, sobre todo en caso de defectos grandes, es necesaria la multiplicación por cultivo de los condrocitos autólogos y su pasaje, para producir cantidades adecuadas de material de trasplante a partir de muestras pequeñas.

Hasta ahora, la desdiferenciación de las células cartilagosas solo puede evitarse agregando estimulantes de crecimiento adicionales, lo cual dificulta el empleo in vivo de estos cultivos, pues los estimulantes de crecimiento pueden interactuar desfavorablemente con el sistema inmunológico del organismo receptor. Además, los métodos conocidos no aseguran que las células mantengan su metabolismo natural o casi natural durante el cultivo, incluso después de varios pasajes.

Con los métodos actuales, las estructuras tridimensionales conocidas para cultivar células cartilagosas tampoco se pueden adaptar específicamente al correspondiente defecto del cartílago. Tampoco se garantiza que las células cartilagosas trasplantadas permanezcan de manera duradera y diferenciada en el lugar del defecto, permitiendo la regeneración del cartílago.

Realmente no se conoce hasta la fecha ningún método de trasplante capaz de garantizar que las células cartilagosas trasplantadas permanezcan de manera duradera en el lugar del defecto, asegurando por tanto la correspondiente regeneración del cartílago.

Por lo tanto el problema técnico objeto de la presente invención consiste en proporcionar injertos cartilagosos, así como métodos y medios para su producción, que permitan un mejor tratamiento de las afecciones de los cartílagos, sobre todo una mejor curación o regeneración del defecto cartilaginoso tratado.

La presente invención resuelve este problema ofreciendo medios para rediferenciar y/o multiplicar células cartilagosas desdiferenciadas, a base de cultivar las células cartilagosas desdiferenciadas en una biomatriz tridimensional gelatinosa donde puedan rediferenciarse y reanudar su actividad metabólica celular específica.

La biomatriz según la presente invención contiene un armazón de colágeno recién formado a partir de una solución de colágeno, preferentemente fresca, con una concentración mínima de 1,5 mg de colágeno/ml de biomatriz, preferentemente 1,5 hasta 4 mg de colágeno/ml de biomatriz. Este armazón de colágeno se obtiene a partir de una disolución ácida de colágeno preferentemente exenta de células, preferiblemente con un valor pH de 0,1 hasta 6,9, preferentemente de 2,0 hasta 5,0, sobre todo de 3,0 hasta 4,5, en concreto de 3,2 hasta 4,2 y con especial preferencia de 3,8. Dicha solución de colágeno se prepara y se guarda entre 2 y 10°C, preferiblemente a 4°C. Para preparar una biomatriz libre de células, esta solución de colágeno se mezcla entre 2 y 10°C, preferiblemente a 4°C, con una solución de medio, concretamente un medio corriente de cultivo celular, un tampón, por ejemplo HEPES, y suero, sobre todo suero humano autólogo, y se gelifica aumentando la temperatura, por ejemplo, hasta la temperatura ambiente o 37°C. Para preparar una biomatriz que contenga células, se introducen células preferentemente precultivadas, por ejemplo células cartilagosas o precursores de células cartilagosas, en la solución de medio, tampón y suero, que luego se mezcla entre 2 y 10°C, preferiblemente a 4°C, con la solución de colágeno igualmente temperada entre 2 y 10°C, preferiblemente a 4°C. Las células incluidas de este modo en la biomatriz pueden cultivarse posteriormente y, dado el caso, extraerse por disolución. A continuación se gelifica por ejemplo a temperatura ambiente o a 37°C y la biomatriz se recubre con medio de cultivo celular. El método de la presente invención permite realizar ventajosamente un cultivo intermedio de las células en una biomatriz según la presente invención, de manera que los condrocitos, por ejemplo del cultivo P2, son estimulados en la biomatriz tridimensional para sintetizar de nuevo proteínas matriciales típicamente celulares, sobre todo colágeno II, mientras que en los cultivos conocidos no puede detectarse ninguna formación de colágeno. Luego, ventajosamente, las células pueden extraerse otra vez de la biomatriz y cultivarse. Gracias a la presente invención, la rediferenciación de las células cartilagosas desdiferenciadas permite cultivar y/o multiplicar condrocitos durante un largo período de tiempo, sin que las células pierdan la capacidad de síntesis específica necesaria para formación de cartílago. Por tanto, de manera ventajosa, partiendo incluso de una pequeña cantidad de tejido cartilaginoso, se puede disponer de suficiente material celular para la producción de injertos de cartílago.

Respecto a la presente invención, el término cultivo de células se refiere a un mantenimiento, sobre todo in vitro, de las funciones vitales de células en un entorno adecuado - por ejemplo con aporte y extracción de eductos y productos metabólicos - y también concretamente a una multiplicación de las células.

Respecto a la presente invención, como células cartilagosas o condrocitos se entienden las células cartilagosas de procedencia natural o modificadas por ingeniería genética, o sus precursores, que pueden ser de origen animal o humano.

Se prevé el cultivo de células cartilagosas diferenciadas, manteniendo especialmente su diferenciación, en una biomatriz tridimensional de las características arriba citadas. Se conservan ventajosamente las actividades metabólicas del cultivo primario, sin que tenga lugar una desdiferenciación de las células cartilagosas diferenciadas. La presente invención también proporciona un método de cultivo de condrocitos que comprende una supresión de la rediferenciación.

Está previsto que las células cartilagosas, sometidas al control de su función, de su morfología y/o de su estado de diferenciación, se introduzcan en la mencionada biomatriz tridimensional, se cultiven y se comprueben simultánea y/o posteriormente. Así, por ejemplo, el metabolismo de las células cartilagosas puede analizarse ventajosamente in vitro, antes de emplearlas in vivo. El análisis puede ser, por ejemplo, la medición de las actividades metabólicas, así como una prueba morfológica o funcional.

La presente invención también se refiere a métodos de rastreo y diagnóstico, que consisten en cultivar células

cartilaginosas según el procedimiento anteriormente descrito y analizarlas simultánea o posteriormente, para determinar, por ejemplo, sus parámetros fisiológicos, morfológicos y/o biomoleculares. De este modo pueden detectarse concretamente afecciones degenerativas o traumáticas de las articulaciones o su ausencia. En el marco de estos métodos también se pueden examinar los efectos de medicamentos potenciales y/o de agentes patógenos, antígenos o análogos sobre las células cultivadas, por ejemplo en procesos de selección de fármacos. Según una forma de ejecución preferida, las células se cultivan en presencia y en ausencia del agente investigado, comparando entre sí los efectos observados.

En una forma de ejecución ventajosa las células cartilaginosas se extraen después de cultivarlas en la biomatriz tridimensional, por ejemplo mediante tratamiento con colagenasa y subsiguiente concentración, y a continuación se siguen cultivando en un cultivo celular bidimensional o tridimensional corriente. Así pueden combinarse favorablemente las ventajas del cultivo bidimensional y tridimensional.

En una forma de ejecución particularmente ventajosa las células cartilaginosas se introducen en una biomatriz tridimensional según la presente invención y se cultivan en ella de tal modo, que luego pueda obtenerse una prótesis cartilaginosa trasplantable, también llamada injerto de cartílago. En una forma de ejecución preferida esta prótesis cartilaginosa puede ser una prótesis de cartílago articular. Así, por ejemplo, la biomatriz ya puede adaptarse ventajosamente a la forma del defecto cartilaginoso durante la fase del cultivo celular.

Una forma de ejecución ventajosa es un método previamente citado para elaborar una prótesis cartilaginosa, sobre todo articular, según el cual las células cartilaginosas se extraen preferentemente de la biomatriz tridimensional tras cultivarlas en la misma, preferiblemente mediante tratamiento con colagenasa y separación por centrifugación, y se siguen cultivando, preferiblemente a elevada densidad celular, en un cultivo bidimensional o tridimensional corriente, con lo cual se puede obtener una prótesis cartilaginosa trasplantable, sobre todo articular.

La presente invención también se refiere a una prótesis cartilaginosa, sobre todo articular, elaborada por el método de la presente invención y por un método de cultivo de tipo convencional eventualmente subsiguiente o/y precedente.

La presente invención también se refiere a una biomatriz, preferiblemente gelatinosa, en la que puedan realizarse dichos métodos de cultivo, es decir una biomatriz tanto sin células cartilaginosas como con ellas. En el último caso, la combinación de biomatriz y células cartilaginosas diferenciadas o rediferenciadas cultivadas en ella también se denomina sistema célula-matriz-cartílago o bioinjerto. Este bioinjerto se puede emplear directamente en la terapia de enfermedades o defectos de los cartílagos.

Según la presente invención, como biomatriz se entiende una estructura gelatinosa que trae colágeno, medio de cultivo celular, suero y tampón, sobre todo tampón Hepes. La solución de colágeno utilizada para preparar la biomatriz es una solución que lleva un gran contenido de colágeno nativo no desnaturalizado en medio ácido acuoso, concretamente con un valor pH de 0,1 hasta 6,9, preferentemente de 2,0 hasta 5,0, sobre todo de 3,0 hasta 4,5, en concreto de 3,2 hasta 4,2 y con especial preferencia de 3,8, por ejemplo en ácido acético, en concreto solución de ácido acético al 0,1%. El gran contenido se refiere a una parte de colágeno no desnaturalizado sobre colágeno total en disolución $\geq 50\%$, especialmente ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 o ≥ 95 , sobre todo $\geq 99\%$. En una forma de ejecución preferida no se emplea ningún colágeno liofilizado. El contenido de colágeno en la solución está comprendido preferiblemente entre 3 mg de colágeno/ml de solución y 8 mg de colágeno/ml de solución, preferentemente 6 mg de colágeno/ml de solución. En una forma de ejecución preferida se emplea un colágeno que, una vez aislado de colas de rata, por ejemplo, se haya incubado en ácido acético al 0,1% durante 3 hasta 14 días a 4°C y en agitación, separando por centrifugación las fracciones de colágeno no disueltas. Como medio de cultivo celular se emplea ventajosamente DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco), pero también puede usarse cualquier otro medio de cultivo celular que permita cultivar células cartilaginosas. Como suero, en la forma de ejecución preferida se usa suero humano autólogo y como tampón Hepes, por ejemplo. En la forma de ejecución preferida la concentración de Hepes en la solución se ajusta a 3 M. En la forma de ejecución preferida el valor pH de la disolución de medio de cultivo celular, tampón y suero es de 7,5 hasta 8,5, por ejemplo 7,6 hasta 8,2, sobre todo 7,8. Evidentemente la biomatriz también puede contener otros factores, por ejemplo factores de crecimiento, agentes adhesivos, antibióticos, agentes de selección o similares.

Por lo tanto la presente invención también se refiere a métodos para elaborar una biomatriz, según los cuales, en una primera etapa se prepara colágeno fresco a partir de colas de rata, por ejemplo, reuniendo en disolución tampón fibras de colágeno extraídas del tejido que lo contiene, desinfectándolas superficialmente en alcohol, lavándolas luego en solución tampón y transfiriéndolas seguidamente a una solución ácida cuyo valor pH es de 0,1 hasta 6,9, preferentemente de 2,0 hasta 5,0, sobre todo de 3,0 hasta 4,0, en concreto de 3,3, por ejemplo una solución de ácido acético al 0,1%. Después, en otra etapa, el colágeno disuelto se agita entre 2 y 10°C, sobre todo a 4°C, durante unos días, por ejemplo 3 hasta 14 días, las partículas de colágeno no disueltas se separan por centrifugación y se guarda entre 2 y 10°C, por ejemplo a 4°C, una solución terminada que contiene 3 mg/ml hasta 8 mg/ml de colágeno. Naturalmente la solución también se puede mantener congelada, por ejemplo entre -10°C y -80°C, sobre todo -20°C. En una tercera etapa esta solución de colágeno se mezcla preferentemente en relación 1:1 con una solución de pH 7,5 hasta 8,5, preferiblemente 7,6 hasta 8,2, sobre todo 7,8, que contiene medio de cultivo celular doblemente concentrado, suero y tampón, obteniéndose una biomatriz que presenta un valor pH de 7,0 hasta 7,8, preferiblemente 7,4. Para preparar un bioinjerto, la solución del medio de cultivo celular doblemente concentrado, suero y tampón se mezcla con

células cartilaginosas precultivadas y centrifugadas, utilizando preferiblemente 2×10^4 hasta 2×10^7 células por ml, sobre todo 2×10^6 células. A continuación, esta solución de pH 7,5 hasta 8,5, preferiblemente 7,6 hasta 8,2, sobre todo 7,8, se mezcla entre 2 y 10°C , en concreto a 4°C , con la solución de colágeno antes mencionada en relación 1:1. Después, la solución de gel se pipetea en recipientes de cultivo y tras la gelificación a 37°C se recubre con medio. Luego el bioinjerto se cultiva durante 3 hasta 8 días, a fin de que esté disponible para trasplantes.

El bioinjerto llega a la sala de operaciones en recipientes de cultivo y luego el médico puede adaptarlo mediante trabajo mecánico al tamaño, espesor y forma del defecto, por ejemplo con un bisturí. A continuación el bioinjerto se fija en la grieta, por ejemplo con adhesivo de tejidos, concretamente con adhesivo de fibrina. Al cabo de unos 5 minutos el bioinjerto queda firmemente anclado en la grieta. La operación también puede practicarse por artroscopia, puesto que el bioinjerto es flexible.

Otro uso del bioinjerto es una combinación de la biomatriz de la presente invención con huesos. En tal caso el bioinjerto se aplica por ejemplo sobre cilindros óseos autólogos de la cresta ilíaca, por ejemplo con adhesivo de fibrina. La presente invención permite tratar especialmente la osteocondritis disecante y las grietas de la cabeza del fémur debidas a la luxación de cadera por paresia cerebral, así como curar lesiones traumáticas y degenerativas de la articulación de la rodilla. Mediante una terapia precoz y causal el nuevo método según la presente invención permite detener el avance de las enfermedades articulares traumáticas o degenerativas. Para el tratamiento de la artrosis en personas jóvenes se dispone con la presente invención de un método terapéutico único y nuevo, que retrasa considerablemente la sustitución endoprotésica de la articulación y en algún caso la evita. Como aplicación del método de la presente invención también es posible tratar el deterioro de las articulaciones causado por inflamación.

El desarrollo de la biomatriz gelatinosa de la presente invención, en la cual se pueden incluir células autólogas de manera exactamente definida, permite por primera vez injertar una cantidad definida de células cartilaginosas en una matriz mecánicamente moldeable y resistente a esfuerzos. El sistema célula-matriz-cartílago de la presente invención, constituido por la biomatriz según la presente invención y células cartilaginosas, puede prepararse en cualquier tamaño y grosor y adaptarse exactamente al defecto mediante ajuste mecánico. En comparación con el ACT el bioinjerto de la presente invención ofrece además la ventaja de suprimir la extracción adicional de periostio de la tibia del paciente. El cultivo in vitro del sistema célula-matriz-cartílago de la presente invención permite analizar antes del trasplante la capacidad de las células cartilaginosas para producir matriz. Este es un requisito importante para elaborar injertos cartilaginosos, comprobar su funcionalidad y asegurar la calidad. Así se pudo demostrar que la nueva síntesis de proteínas típicamente cartilaginosas - como por ejemplo el colágeno de tipo II - que proporcionan la estabilidad fundamental del injerto se produce in vitro en la matriz por medio de las células cartilaginosas autólogas. Conforme a la presente invención, mediante ensayos en articulaciones de rodilla de cerditos vietnamitas se pudo demostrar que, en comparación con el defecto vacío injertado con matriz vacía sin células cartilaginosas o bien con suspensiones de células cartilaginosas según el método Peterson, los sistemas célula-matriz-cartílago de la presente invención se implantan excelentemente en el cartílago de la articulación, rellenan completamente el defecto y además resisten la presión.

Por último, la presente invención también se refiere a una biomatriz para emplear en uno de los procedimientos antes mencionados.

La presente invención también se refiere a métodos para tratar enfermedades o defectos de los cartílagos, sobre todo enfermedades degenerativas, inflamatorias y/o traumáticas de las articulaciones, mediante el uso de una prótesis cartilaginosa o de un bioinjerto preparados según la presente invención y/o de células cartilaginosas cultivadas conforme a la presente invención, para implantar en tejidos o cartílagos - o en zonas óseas - afectados o dañados o bien reemplazar las partes afectadas o defectuosas.

La presente invención se ilustra más detalladamente por medio de ejemplos.

Ejemplo 1: preparación de colágeno

Para preparar una solución de colágeno se usa un tejido que contenga colágeno, como por ejemplo tendones de colas de rata. Todas las operaciones se efectúan con materiales estériles y en condiciones estériles. Para ello, después de conservarlas a -20°C , las colas de rata se desinfectan superficialmente durante 5 minutos en alcohol al 70%. Luego se quita la piel de las colas de rata y se extraen las fibras de colágeno sueltas. Si se usa otro tejido de partida, las células eventualmente presentes pueden retirarse con cuidado mediante un tratamiento mecánico, enzimático o químico. Las fibras de colágeno se recogen en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,2), se desinfectan superficialmente durante 10 minutos en alcohol del 70% y después se lavan con PBS. Se determina el peso de las fibras de colágeno y las mismas se transfieren a una solución de ácido acético al 0,1% (aproximadamente 8 hasta 12 mg/ml). La preparación se agita durante un periodo de 3 hasta 14 días y a continuación se centrifugan las partículas de colágeno no disueltas (1000 rpm, 1 hora, a 8°C). En una forma de ejecución preferida la solución acabada de colágeno tiene un contenido de colágeno comprendido entre 3 mg/ml y 8 mg/ml. Por tanto, tal como se ha definido anteriormente, el colágeno se halla presente en gran proporción como material de partida en solución y no en forma de fibras, de red o de matriz. La solución de colágeno resultante está preferentemente exenta de células y se prepara partiendo de colágeno fresco no liofilizado.

Ejemplo 2: preparación de la biomatriz o del bioinjerto

Todas las operaciones se efectúan con materiales estériles y en condiciones estériles.

Solución de colágeno: mínimo 3 mg/ml en ácido acético

Solución tampón: 77,5 ml de medio doblemente concentrado (por ejemplo DMEM)

5 20 ml de suero

2,5 ml de solución Hepes (3 M, pH 7,8)

Ambas soluciones se conservan a 4°C.

10 La biomatriz está formada por una solución de colágeno en ácido acético al 0,1% (colágeno de colas de rata, con un contenido de colágeno de 3 mg/ml hasta 8 mg/ml, preferiblemente 6 mg/ml) y una solución tampón de medio doblemente concentrado, suero y disolución Hepes. Poco después de mezclar ambos componentes, preferentemente en relación 1:1, gelifica a temperaturas por encima de 4°C, por ejemplo a temperatura ambiente, una estructura de colágeno tridimensional de nueva constitución.

15 Para preparar un bioinjerto, es decir una biomatriz que contiene células, se introducen 2×10^4 hasta 2×10^7 células cartilagosas/ml - preferentemente 2×10^6 , precultivadas de la manera habitual y separadas por centrifugación (1000 rpm, 10 minutos, a temperatura ambiente) - en la solución tampón, se suspenden y se mezclan a 4°C con partes iguales de la solución de colágeno. Esta solución de gel se pipetea en recipientes de cultivo y después de gelificar a 37°C formando una estructura de colágeno recién constituida, con células cartilagosas incluidas, se recubre con medio. El material queda listo para trasplantar al cabo de 3 a 8 días de cultivo.

20 Si se desea, las células se pueden volver a separar y obtener de la biomatriz mediante un tratamiento con colágeno seguido de centrifugación. Las células diferenciadas resultantes pueden ser el punto de partida para otros cultivos.

Ejemplo 3: injerto en la articulación abierta y aplicación artroscópica

25 Tanto durante el trasplante en la articulación abierta como en la aplicación artroscópica el cartílago célula-matriz se adapta primero mecánicamente en forma y tamaño al defecto cartilaginoso. A continuación, el injerto se introduce en la grieta y se fija allí mediante adhesivo de fibrina. Como el sistema célula-matriz-cartílago es un material flexible pero a la vez dimensionalmente estable, este bioinjerto se enrolla prácticamente en los instrumentos artroscópicos tubulares y de esta forma se introduce en la grieta. Gracias a su estabilidad dimensional los injertos recuperan su forma original en el sitio destinado y pueden fijarse al defecto con adhesivo de fibrina.

Ejemplo 4: resultados de los ensayos PCR

30 En la tabla siguiente se reproducen los resultados de los ensayos PCR. El objeto de estos ensayos era demostrar que el cultivo según la presente invención en una biomatriz preparada conforme a los ejemplos 1 y 2 de la presente invención produce una rediferenciación de los condrocitos. En la tabla puede verse que, partiendo de un cultivo P0, los condrocitos pierden su capacidad de producir colágeno de tipo II durante los sucesivos pasajes convencionales P1 y P2. Las células se desdiferencian en el curso de dichos pasajes. En cambio, un pasaje P2 realizado en una biomatriz de la presente invención produce la rediferenciación de los condrocitos desdiferenciados, lo cual queda confirmado por la recuperación de la capacidad de generar colágeno de tipo II.

Tabla: resultados de los ensayos PCR:

se aisló el ARN de los condrocitos de cada cultivo y se transcribió en cADN.

	P0-2D 3 semanas	P1-2D 2 semanas	P2-2D 3 semanas	P2-colágeno 2×10^6 /ml 3 semanas
β-2-microglobulina	+	+	+	+
Colágeno tipo I	+	+	+	+
Colágeno tipo II	+	-	-	+
Colágeno tipo XI	+	+	+	+
Bmp 2	+	+	+	+

Bmp 4	+	+	+	+
Bmp 7	-	-	-	-

La expresión (transcripción) de los genes específicos de los condrocitos se ensayó por amplificación PCR con cebadores adecuados y subsiguiente electroforesis en gel:

- La β -2-microglobulina es un gen expresado constitutivamente y sirve de control positivo;
- 5 - los colágenos de tipo II y XI son tipos de colágeno específico de los cartílagos;
- las proteínas morfogenéticas óseas (Bmp) 2, 4 y 7 desempeñan un papel en la diferenciación del tejido cartilaginoso.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una biomatriz de colágeno, que comprende las siguientes etapas:
preparar fibras de colágeno a partir de colas de rata;
transferir las fibras de colágeno a una solución de ácido acético con un valor pH de 3,0 hasta 4,0;
5 incubar las fibras de colágeno en la solución de ácido acético a una temperatura de 2 hasta 10°C durante un periodo de 3 hasta 14 días;
separar las partículas de colágeno no disueltas, con lo cual se obtiene una solución de colágeno cuyo contenido de colágeno es de 3 a 8 mg/ml; y
10 mezclar de la solución de colágeno obtenida con una solución tampón de 7,5 hasta 8,5 de pH a una temperatura de 2°C hasta 10°C y aumentar la temperatura para lograr la gelificación, con lo cual se obtiene una biomatriz con 1,5 hasta 4,0 mg de colágeno por 1 ml de biomatriz y un valor pH de 7,0 hasta 7,8.
2. Método según la reivindicación 1, en que el contenido de fibras de colágeno en la solución de ácido acético es de 8 hasta 12 mg por 1 ml de la solución de ácido acético.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en que la concentración de la solución de ácido acético es del 0,1%.
- 15 4. Solución de colágeno preparada por el método según una de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Biomatriz preparada por el método según una de las reivindicaciones 1 a 4.