(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 362 021**

(21) Número de solicitud: 201130871

(51) Int. Cl.:

***A61L 27/38*** (2006.01)
***A61K 35/28*** (2006.01)
***C12N 5/077*** (2010.01)
*A61P 19/00* (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **27.05.2011**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2011**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **27.06.2011**

(71) Solicitante/s: **BANC DE SANG I TEIXITS**
**Passeig Taulat, 116**
**08005 Barcelona, ES**

(72) Inventor/es: **Pla Calvet, Pablo Arnau;**
**Caminal Bobet, Marta;**
**Vives Armengol, Joaquim;**
**Oliver Vila, Irene y**
**García López, Juan**

(74) Agente: **Durán Moya, Carlos**

(54) Título: **Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso.**

(57) Resumen:
Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso.
La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso, comprendiendo dicho producto células mesenquimales expandidas de médula ósea, una matriz no celular y un gel de fibrina, comprendiendo procedimiento las etapas de: (a) expandir las células mesenquimales; (b) conjugar las células mesenquimales a la matriz; (c) lavar el producto obtenido en la etapa (b); y (d) mezclar el producto obtenido en la etapa (c) con un gel de fibrina.

ES 2 362 021 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso articular. Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto que comprende principalmente células mesenquimales, de origen óseo, expandidas, inmovilizadas sobre soportes y copolimerizadas y fijadas en la zona de implantación mediante geles de fibrina y/o encaje mecánico. El procedimiento de la presente invención puede comprender además una etapa de congelación del producto de ingeniería tisular obtenido, con el objetivo de disponer de copias de seguridad del mismo.

Debido a la limitada capacidad de regeneración del cartílago articular, los defectos causados por enfermedades degenerativas o traumatismos representan un problema clínico no resuelto. En este tipo de patologías, la aparición de las lesiones está asociada a dolor, pérdida de movilidad y discapacidad progresiva asociada a la aparición de artritis o artrosis. Estas circunstancias inciden de forma grave en la calidad de vida de las personas afectadas.

Los tratamientos más comunes de este tipo de lesiones son la mosaicoplastia, el trasplante autólogo de condrocitos, el trasplante heterólogo de tejido osteocondral, y la artroplastia de abrasión o perforaciones. Estas técnicas, muestran como factor común el aporte de células especializadas a la zona lesionada para favorecer la regeneración/substitución del tejido dañado.

Entre los tratamientos con mayores Indices de éxito se encuentra la artroplastia de abrasión o perforaciones. Esta aproximación se basa en inducir mediante sangrado la invasión de células mesenquimales de médula ósea desde el hueso subcondral hacia la zona lesionada, con el objetivo que reparen la lesión (Mitchell N y otros. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by múltiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1976; 58 (2): 230-3.24, Levy A y otros. Chondral delamination of the knee in soccer players. *Am J Sports Med*. 1996; 24). El éxito de esta técnica depende de la correcta integración, proliferación y diferenciación de las células mesenquimales en la zona a reparar. Debido a la gran variabilidad inherente a la técnica, el resultado de este tipo de tratamientos es poco previsible. En consecuencia, frecuentemente se obtiene una reparación en base a fibrocartilago en lugar de cartílago hialino, lo que conlleva limitaciones en la calidad y durabilidad de la terapia (Pelmari K y otros. Do we really need cartilage tissue engineering?. *Swiss Med WKLY* 2009; 139:41-42; Kreuz PC y otros. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis. Cartilage*. 2006; 14(11):1119-25; Temenoff JS y otros. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000; 431-40.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que resuelvan los problemas de la técnica anterior. La presente invención da conocer una nueva alternativa terapéutica basada en la ingeniería tisular. Esta aproximación se fundamenta en la utilización de un producto que comprende una matriz, en base a materiales sintéticos o biomateriales, combinadas con células e hidrogeles que induce la regeneración de los tejidos cartilaginosos dañados.

Las matrices empleadas en la presente invención deben mostrar características particulares que les permitan realizar su función de soporte para la reconstrucción del tejido diana. Estas deben ser biocompatibles, con adecuadas propiedades mecánicas con respecto a la zona de implantación, con integridad estructural y deben ser bioabsorbibles. Por otro lado, estas matrices, deben ser capaces de generar un entorno biológico que garantice el aporte de nutrientes a las células para asegurar que estas puedan realizar su función regeneradora. A las anteriores características debe añadirse que una matriz orientada a la regeneración de tejidos cartilaginosos debería poseer capacidad de inducir la diferenciación de las células madre hacia condrocitos y que en esta matriz esta especie celular se vea inducida a fabricar tejido cartilaginoso.

El otro componente del producto de ingeniería tisular de la presente invención, las células, también debe presentar una serie de características particulares tales como facilidad y seguridad en su obtención, provenir de una fuente segura desde el punto de vista citogenético y tener propiedades de multipotencialidad, que permitan su diferenciación hacia las células responsables de la producción de tejido cartilaginoso, los condrocitos.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento de preparación de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de cartílago. Dicho procedimiento se fundamenta en la obtención y utilización de células mesenquimales expandidas, de origen autólogo, procedentes de médula ósea. Estas células se expanden y se inmovilizan sobre soportes en base a polímeros sintéticos o biomateriales. y el conjunto obtenido se implanta y fija en la zona de lesión mediante geles de fibrina y/o encaje mecánico.

Una de las ventajas con respecto a los tratamientos basados en el autoinjerto, tales como la condroplastia o el sangrado subcondral, es que utilizando el producto preparado mediante el procedimiento de la presente invención no es necesario someter al receptor de la terapia a una o varias intervenciones de cirugía artroscópica para la extracción del material biológico necesario para la regeneración de la articulación dañada. El material celular necesario se obtiene mediante la extracción de médula ósea, que se realiza de forma ambulatoria. Esta aproximación, por lo tanto, evita las complicaciones potenciales derivadas de la obtención de material condral autólogo tales como los dolores, sangrados, molestias o complicaciones debido a infecciones.

Otra ventaja respecto a la técnica de artroplastia de abrasión o perforaciones aplicada en lesiones de pequeño tamaño, que consistente en lesionar el hueso subcondral para facilitar el aporte de células regenereradoras, es que utilizando el producto preparado mediante el procedimiento de la presente invención se puede aplicar una dosis celular conocida y perfectamente caracterizada, lo que permite realizar un tratamiento reproducible a los pacientes sometidos a esta terapia.

Otra ventaja adicional es que es posible implantar un producto totalmente adaptado a la topología de la lesión.

En este aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento mediante el que las matrices se conjugan mediante un proceso de inmovilización a un producto celular enriquecido en células mesenquimales. Dicho producto celular con reconocida capacidad condroinductora, se obtiene mediante una selección y posterior expansión *in vitro* de estas células. Con el procedimiento de la presente invención es posible, mediante la manipulación del proceso de expansión de las células, generar un amplio intervalo de cantidades de injerto cartilaginoso que facilita el tratamiento de lesiones de diverso tamaño y origen. Esto hace que sea aplicable en un amplio abanico de aplicaciones terapéuticas, cuyo objetivo es la recuperación del cartílago dañado.

Otra de las características del procedimiento de la presente invención es que el crecimiento de las células se lleva a cabo con suplementos de medios de cultivo de origen humano, lo que facilita la expansión rápida de dichas células, y evita posibles efectos adversos derivados del contacto de las células con componentes no humanos (o humanizados). Una ventaja del procedimiento de la presente invención es que, una vez finalizada la expansión, se lleva a cabo una criopreservación de parte de las células con el objetivo de reservar dosis para ser utilizadas en futuros tratamientos.

Por otra parte, la conjugación de las células mesenquimales a las biomatrices mediante un proceso de colonización permite la localización de las células con potencial condrogénico en la zona a regenerar. Esta característica, diferente a otras aplicaciones tales como la artroplastia de abrasión o perforaciones, asegura la actividad celular reparadora en la zona a tratar y, a diferencia de otras aproximaciones de ingeniería tisular, garantiza la permanencia de las células madre en la zona de la lesión donde deben realizar la labor reparadora. Finalmente, el amalgamado de estas partículas con células mesenquimales mediante geles de fibrina permite dotar al conjunto de plasticidad y capacidad de manipulación facilitando a su vez la inmovilización de la mezcla en la zona a tratar evitando así la falta de coherencia estructural con el entorno a regenerar.

La presente invención da a conocer un procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso, comprendiendo dicho producto células mesenquimales expandidas de médula ósea, una matriz no celular y un componente en base a hidrogeles. Dicho procedimiento comprende las etapas de:

(a) expandir las células mesenquimales;

(b) conjugar las células mesenquimales a la matriz;

(c) lavar el producto obtenido en la etapa (b); y

(d) mezclar con un gel de fibrina.

La expansión de las células mesenquimales se realiza de una forma conocida por los expertos en la materia, con el objetivo de obtener la cantidad de células necesarias para realizar la conjugación a la matriz, que dependerá del tamaño de la lesión a tratar. Una vez obtenida dicha cantidad necesaria, se inicia la etapa de conjugación de dichas células a la matriz. Esta conjugación se puede realizar mediante sistemas agitados o no agitados.

Las células mesenquimales obtenidas en la etapa de expansión se resuspenden en medio de cultivo DMEM complementado con suero a una concentración en el intervalo de $1x10^3$ a $1x10^7$ células por mililitro. Si es necesario se pueden conservan dichas células mediante criopreservación para ser utilizadas en el futuro.

A continuación, se dispensa la suspensión celular de forma estéril en una bolsa o frasco de cultivo previamente cargada con la matriz, que puede estar dotado de un agitador pendular, conjugar las células mesenquimales a la matriz. La relación entre el número de células por centímetro cúbico está en el intervalo de $1x10^2$ a $1x10^8$ células por centímetro cúbico de matriz. Posteriormente, se deja incubar durante 1 a 24 horas a una temperatura de 35-38ºC, saturación de $CO_2$ del 2,5-7,5%, y humedad relativa superior al 90%. En el caso de emplear agitación, las condiciones de agitación empleadas para garantizar el anclaje de las células son de 1 a 120 revoluciones por minuto.

A continuación, la suspensión de células mesenquimales inmovilizadas sobre la matriz, obtenida en la etapa (b) se lava varias veces utilizando una solución salina fisiológica y se dispensa de forma estéril en una bolsa de conservación.

En la etapa (d) del procedimiento de la presente invención el producto obtenido en la etapa (c) se mezcla de forma estéril con un gel de fibrina en una relación de 0,1 a 10 unidades volumétricas de solución de fibrinógeno por cada 0,1-10 unidades volumétricas de solución de trombina y 0,1-10 unidades volumétricas de matriz colonizada, obtenida en la etapa (c).

La presente invención se describirá a continuación con más detalles en referencia a ejemplos de realización. Estos ejemplos, sin embargo, no están destinados a limitar el alcance técnico de la presente invención.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

*Procedimiento de preparación de un centímetro cúbico del producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de cartílago según la presente invención*

Se obtuvieron $12x10^6$ células mesenquimales de médula ósea mediante expansión utilizando un medio de cultivo libre de suero animal y se inocularon en un frasco de cultivo. Se utilizó un medio en base a DMEM suplementado con suero humano al 10% (v/v). Se fijó la concentración celular a $6x10^5$ células por mililitro. La suspensión celular se añadió de forma estéril a un segundo frasco de material plástico dotado de agitador pendular, donde previamente se añadió 1 centímetro cúbico de matriz. Las $6x10^6$ células restantes se criopreservaron con el objetivo de poder realizar nuevos tratamientos, en caso que sea necesario.

La incubación se realizó en las siguientes condiciones: temperatura de 37ºC, saturación de $CO_2$ del 5%, y humedad relativa del 95%; a continuación se inició un ciclo de agitación de 24 horas de duración a una velocidad de entre 120-200 rpm. Transcurrido este tiempo, el producto obtenido se lavó con el objetivo de eliminar restos celulares y el medio de cultivo. Esta operación se llevó a cabo empleando una solución salina fisiológica y se envasó el producto obtenido en una bolsa estéril.

En el momento previo de la aplicación del producto al paciente, se realiza un amalgamado de las matrices con un gel de fibrina. Para realizar esta operación se emplea una relación volumétrica consistente en una unidad de solución de fibrinógeno por una unidad volumétrica de solución de trombina y una unidad volumétrica de matriz ósea colonizada. Realizado el amalgamado se dota al conjunto de la forma que le permite adaptarse a la distribución espacial de la lesión y se emplaza en la misma.

Si bien la invención se ha descrito con respecto a un ejemplo de realización preferente, éste no se debe considerar limitativo de la presente invención, que se definirá por la interpretación más amplia de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un producto de ingeniería tisular orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso, comprendiendo dicho producto células mesenquimales expandidas de médula ósea, una matriz no celular y un gel de fibrina, comprendiendo procedimiento las etapas de:

(a) expandir las células mesenquimales;

(b) conjugar las células mesenquimales a la matriz;

(c) lavar el producto obtenido en la etapa (b); y

(d) mezclar el producto obtenido en la etapa (c) con un gel de fibrina.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la etapa (b) se realiza mediante un sistema agitado o no agitado.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque además comprende una etapa de criopreservación de las células mesenquimales expandidas para ser utilizadas en el futuro.

4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la relación entre el número de células por centímetro cúbico de matriz en la etapa (b) está en el intervalo de $1x10^2$ a $1x10^8$ células por centímetro cúbico de matriz.

5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque en la etapa (b) se realiza durante 1 a 24 horas, a una temperatura de 35-38ºC, una saturación de $CO_2$ de 2,5-7,5%, y una humedad relativa superior al 90%.

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque en la etapa (c) se lava varias veces utilizando una solución salina fisiológica.

7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el mezclado con un gel de fibrina de la etapa (d) se realiza en una relación de 0,1 a 10 unidades volumétricas de solución de fibrinógeno por cada 0,1-10 unidades volumétricas de solución de trombina y 0,1-10 unidades volumétricas de matriz colonizada, obtenida en la etapa (c) .

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201130871

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 27.05.2011

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|---|---|---|
| X | UEMATSU, K., *et al*. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. Biomaterials. Julio 2005. Vol. 26, nº 20, páginas 4273-4279. ISSN 0142-9612 (Impreso). Ver todo el documento, especialmente el apartado 2 (Materiales y métodos). | 1-7 |
| X | WO 2007087519 A2 (CENTENO, C. J. [US/US]) 02.08.2007, párrafos [0017],[0024]; ejemplo 2; reivindicaciones 1,10,18,22. | 1-7 |
| X | WANG, W., *et al*. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. Biomaterials. Agosto 2010. Vol. 31, nº 23, páginas 5953-5965. ISSN 0142-9612. Ver todo el documento, especialmente los apartados 2.2 y 2.7 de Materiales y métodos. | 1-7 |
| A | SCHINDER, O.S. (iv) Articular cartilage surgery in the knee. Orthopaedics and Trauma. Abril 2010. Vol. 24, nº 2, páginas 107-120. doi:10.1016/j.mporth.2010.03.003. ISSN 1877-1327. Ver todo el documento. | 1-7 |
| A | AWAD, H.A., *et al*. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials. Julio 2004. Vol. 25, nº 16, páginas 3211-3222. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.045. ISSN 0142-9612. Ver páginas 3212-3213. | 1-7 |

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

| Fecha de realización del informe | Examinador | Página |
|---|---|---|
| 10.06.2011 | B. Pérez Esteban | 1/5 |

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

***A61L27/38*** (2006.01)
***A61K35/28*** (2006.01)
***C12N5/077*** (2010.01)
*A61P19/00* (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61K, C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.06.2011

**Declaración**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)** | Reivindicaciones | 1-7 | **SI** |
| | Reivindicaciones | | **NO** |
| **Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)** | Reivindicaciones | | **SI** |
| | Reivindicaciones | 1-7 | **NO** |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|---|---|---|
| D01 | UEMATSU, K., *et al*. Biomaterials. Julio 2005. Vol. 26, nº 20, páginas 4273-4279. ISSN 0142-9612 (Impreso). | Julio 2005 |
| D02 | WO 2007087519 A2 (CENTENO, C. J. [US/US]) | 02.08.2007 |
| D03 | WANG, W., *et al*. Biomaterials. Agosto 2010. Vol. 31, nº 23, páginas 5953-5965. ISSN 0142-9612. | Agosto 2010 |
| D04 | SCHINDER, O.S. Orthopaedics and Trauma. Abril 2010. Vol. 24, nº 2, páginas 107-120. doi:10.1016/j.mporth.2010.03.003. ISSN 1877-1327. | Abril 2010 |
| D05 | AWAD, H.A., *et al*. Biomaterials. Julio 2004. Vol. 25, nº 16, páginas 3211-3222. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.045. ISSN 0142-9612. | Julio 2004 |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente describe y reivindica un procedimiento para obtener un producto de ingeniería tisular, orientado a la regeneración de tejido cartilaginoso, que consiste en conjugar con una matriz células mesenquimales previamente expandidas, lavar el producto así obtenido y mezclarlo con un gel de fibrina.

No se ha encontrado en el estado de la técnica el procedimiento de la solicitud tal y como está reivindicado, por lo que solicitud es nueva según el artículo 6 de la Ley 11/1986, de Patentes.

Sin embargo, se han encontrado varios documentos que divulgan procedimientos muy similares al reivindicado, y los productos obtenidos, y que, por ello, afectan la actividad inventiva de la solicitud, como a continuación se explica.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe el uso de matrices tridimensionales de ácido glicólico poli-láctico (PLGA, por sus siglas en inglés) para la fabricación de tejido cartilaginoso. Igual que en la solicitud, se infiltran en la matriz células mesenquimales obtenidas de médula ósea en cantidad y condiciones similares a las de la solicitud (ver página 4275 del documento). Tras este paso, se añade fibrina para fijar el producto en la zona de la lesión. Por tanto, el documento D01 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 5 de la presente solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes. El proceso de crioconservación de la reivindicación 3 y el lavado de la reivindicación 6 son pasos obvios en cualquier procedimiento que implique el uso de células animales (como se puede ver, por ejemplo, en el documento D05 citado en este informe). En cuanto a la reivindicación 7, al incluir rangos tan amplios de los materiales del producto tisular, incluye casi cualquier proporción de las publicadas en el estado de la técnica. Por tanto, ninguna de estas tres reivindicaciones aporta actividad inventiva a la presente solicitud, que, en su conjunto, no cumple el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento de patente D02 se divulga el uso de células madre mesenquimales de médula ósea depositadas en una matriz de ácido hialurónico y fibrinógeno para la reparación de tejido cartilaginoso. Además, en la reivindicación 22 se incluye un paso de sellado del producto implantado con un gel de fibrina. Por tanto, el documento D02 afecta la actividad inventiva de la presente solicitud, pues, como se ha explicado anteriormente, los detalles del procedimiento reivindicado que no aparecen en el documento D02 o no coinciden exactamente con los divulgados en el mismo, resultan evidentes para el experto en la materia, y no aportan actividad inventiva a la solicitud.

Este mismo argumento es aplicable al documento D03, que también afecta la actividad inventiva de la solicitud. Este documento describe un gel de PLGA y fibrina en el que se incluyen células mesenquimales, y que se utiliza para reparar lesiones de cartílago. El procedimiento supone mezclar las células con PLGA y fibrinógeno, para después añadir trombina y formar de este modo el gel de fibrina final.

Por tanto, la presente solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes, a la luz de lo divulgado en los documentos D01, D02 y D03.

Finalmente, se citan dos documentos que contienen información del estado de la técnica que se considera cercana a la solicitud, pero sin afectar la novedad ni la actividad inventiva de la misma. El documento D04 consiste en un estudio de tratamiento quirúrgico del cartílago articular de rodilla, y divulga el uso de diferentes matrices y tipos celulares para la obtención de tejido cartilaginoso. El documento D05 describe un procedimiento para generar tejido cartilaginoso a partir de células madre de tejido adiposo, empleando matrices de agarosa, alginato y gelatina. En este documento encontramos técnicas de crioconservación celular, y condiciones generales para el cultivo de células animales y para su depósito en las diferentes matrices. Tales condiciones serían aplicables al procedimiento reivindicado en la presente solicitud, razón por la cual se ha incluido el documento D05 en este informe.