



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 004**

51 Int. Cl.:  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07785970 .0**  
96 Fecha de presentación : **10.07.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2037974**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Utilización de gelatina y de un agente reticulante para producir una composición terapéutica reticulante.**

30 Prioridad: **10.07.2006 DE 10 2006 033 168**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.10.2011**

73 Titular/es: **TETEC TISSUE ENGINEERING  
TECHNOLOGIES AG.  
Aspenhastrasse 18  
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es: **Gaissmaier, Christoph y  
Ahlers, Michael**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 367 004 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

Utilización de gelatina y de un agente reticulante para producir una composición terapéutica reticulante

- 5 [0001] La presente invención se refiere a una utilización reciente de gelatina y transglutaminasa para la preparación de una composición terapéutica reticulante para el tratamiento de lesiones del disco intervertebral o del menisco, la composición comprende un gel de gelatina reticulado como matriz celular en una zona meta para el tratamiento humano de lesiones del disco intervertebral o del menisco, que forma un gel de gelatina reticulado como matriz celular en una zona meta del cuerpo humano u animal, siendo la zona meta el Nucleus pulposus o el Annulus fibrosus de un disco intervertebral o de un menisco y la composición comprende células del disco intervertebral, condrocitos o células madre mesenquimales.
- 10 [0002] En diferentes sectores de la medicina se utilizan materiales matriciales tolerados por el cuerpo y biodegradables. Un papel importante hacen en este caso las aplicaciones terapéuticas, en las cuales el material biodegradable sirve de matriz celular, e.d. como matriz que favorece el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación de células. Bajo este concepto tanto entran aplicaciones, en las cuales se aplica o administra el material matricial exento de células y en su caso en relación con factores de crecimiento, para satisfacer una función favorecedora del crecimiento o de la regeneración dentro de la zona meta del cuerpo, como también aplicaciones, en las cuales el material matricial ya se coloniza in vitro con células. En las aplicaciones últimas mencionadas, un precultivo de las células puede ser realizado en o sobre el material matricial in vitro, creando de esta manera un llamado implante de tejido, que se utiliza luego en el punto a tratar del cuerpo. Como ejemplo para los procedimientos descritos debe mencionarse el tratamiento de defectos de hueso con biomateriales y factores de crecimiento (p.ej factores de crecimiento trombocitarios o BMPs (Bone Morphogenic Proteins = proteínas morfogenéticas de hueso)) o el tratamiento de defectos del cartílago con ayuda del trasplante de células de cartílago autólogo o alogénico.
- 15 [0003] Los materiales matriciales utilizados más frecuentemente para los fines citados son biopolímeros a base de proteínas o polisacáridos, en particular el colágeno, la gelatina, el ácido hialurónico, el quitosano o los alginatos. Las aplicaciones preferidas de estos materiales son geles o estructuras de esponja que permiten una distribución a ser posible uniforme de las células desde el punto de vista de su estructura. En polímeros solubles, como p.ej. la gelatina, deben ser utilizados estos generalmente en forma reticulada, para poder producir matrices que son indeformables bajo condiciones fisiológicas y tienen una vida suficientemente larga. Tales cuerpos moldeados a base de gelatina reticulada están descritos por ejemplo en la solicitud de patente alemana DE 10 2004 024 635 A1.
- 20 [0004] WO96/40304 describe una composición polimérica inyectable que contiene las células. La composición reticulada in vivo, para formar una matriz celular en el cuerpo humano u animal, en una zona meta que necesita la regeneración. El polímero de la composición polimérica puede comprender gelatina.
- 25 [0005] T. Chen et al. presenta la formación de un gel de gelatina reticulado en una zona meta del cuerpo, que puede ser usado como matriz celular. Esta matriz se forma in situ por reticulación de la gelatina, después de la adición de transglutaminasa (Biomaterials, Elsevier Science Publishers BV., BARKING, GB, tomo 24, N°. 17, 1 de Agosto de 2003 (2003-08-01), páginas 2831-2841).
- 30 [0006] JP2004283371 divulga una composición que comprende gelatina, células y transglutaminasa. La composición forma un gel de gelatina como matriz celular para la regeneración del tejido.
- 35 [0007] A. Ito et al. describe la gelatina reticulada que puede ser usada como matriz celular en el cuerpo humano u animal. La gelatina se reticula con transglutaminasa. Células vivas, como fibroblastos, y factores del crecimiento o de diferenciación pueden ser integrados también en la matriz de gelatina. La composición, que forma la matriz de gel, se describe en la revista de biociencia y bioingeniería (Journal of Bioscience and Bioengineering, tomo 95, N°. 2, 2003, páginas 196-199).
- 40 [0008] Otra indicación, en la que entra en consideración un tratamiento con células específicas del tejido, es la lesión o la degeneración del disco intervertebral, en particular del Nucleus pulposus (núcleo gelatinoso). Una degeneración del tejido del Nucleus pulposus, que puede aparecer con mayor probabilidad con el avance de la edad, da lugar a una carga más alta del Annulus fibrosus (anillo fibroso), lo cual finalmente puede conducir a su lesión y por consiguiente a una hernia discal.
- 45 [0009] Las células del disco intervertebral del Nucleus pulposus no disponen de una facultad suficiente de regenerarse ellas mismas. Para prevenir las consecuencias arriba descritas, se utiliza por lo tanto el procedimiento de la reconstrucción biológica del disco intervertebral. Al mismo tiempo se cultivan células del disco intervertebral o células madre mesenquimales in vitro y a continuación se administran en el Nucleus pulposus del paciente. Otra posibilidad consiste en aplicar factores del crecimiento y de diferenciación adecuados en el disco intervertebral con ayuda de un material biológico, donde los cuales desarrollan una eficacia localmente limitada y contribuyen de esta manera a la regeneración del disco intervertebral. Sin embargo es imposible implantar una matriz resistente combinada con factores de crecimiento o colonizada con células en el Nucleus pulposus, ya que esto estaría relacionado absolutamente con una lesión considerable del Annulus fibrosus.
- 50 [0010] Por este motivo se inyectan las células, los factores de crecimiento o una combinación de los dos en un medio
- 55

líquido, p.ej. en una solución nutritiva o similar, en el disco intervertebral. Un problema consiste sin embargo en que la vía de inyección no permite cerrarse suficientemente y por consiguiente las células suspendidas en el fluido líquido y/o los factores de crecimiento pueden ser presionados de nuevo fuera del disco intervertebral a través de la vía de inyección, en cuanto se ejerza presión sobre estos.

5 [0011] Por lo tanto sería deseable, para este procedimiento y procedimientos similares de regeneración biológica, una composición terapéutica que puede ser administrada a una zona meta del cuerpo, donde está garantizado que las células suspendidas y/o los factores de crecimiento permanezcan en la zona meta del cuerpo, sin que haya que pedir demasiado a los pacientes una posición de reposo inaceptable y larga de la región tratada del cuerpo.

10 [0012] Para solucionar los problemas citados, se propone según la invención la utilización de gelatina y transglutaminasa para la preparación de una composición terapéutica reticulante del tipo inicialmente mencionado, la cual forma un gel de gelatina reticulado como matriz celular en la zona meta, donde

(i) la gelatina y la transglutaminasa son mezcladas para formar la composición terapéutica reticulante que se administra a continuación a la zona meta; o

15 (ii) la gelatina y la transglutaminasa se preparan en forma separada la una de la otra y se administran simultánea o consecutivamente bajo formación de la composición terapéutica reticulante en la zona meta.

20 [0013] La invención se basa en la idea de utilizar gelatina, como material matricial biodegradable, la cual se caracteriza por su hidrosolubilidad y que puede ser administrada por consiguiente en forma de una solución, en particular por inyección. En la zona meta entonces tiene lugar la transición de la gelatina soluble a un gel de gelatina que se transforma por el efecto del agente reticulante en una forma insoluble, e.d. en un gel de gelatina reticulado que forma una matriz celular afectable mecánicamente.

[0014] La composición terapéutica según la invención necesita además de la gelatina y los agentes reticulantes ningún otro tipo de componentes que contribuyen a la formación del gel de gelatina reticulado. Esto sin embargo no descarta la presencia de otros componentes, por los cuales pueden ser logrados parcialmente otros efectos ventajosos.

25 [0015] En las células, en las cuales el gel de gelatina sirve de matriz, se puede tratar por una parte de células vivas que se administran al paciente junto a la composición terapéutica. El gel de gelatina sin embargo puede servir también de matriz para el crecimiento de las células propias del cuerpo situadas en la zona meta, por lo cual la composición terapéutica comprende entonces preferiblemente factores del crecimiento y/o de diferenciación que favorecen la regeneración de estas células o del tejido formado por las mismas.

30 [0016] El problema arriba mencionado se resuelve mediante la composición terapéutica según la invención siempre que el gel de gelatina reticulado proporciona una matriz resistente que impide en gran parte el presionar las células, los factores de crecimiento o la combinación de células con factores de crecimiento fuera de la zona meta. Adicionalmente, la composición terapéutica según la invención ofrece la ventaja, por la configuración de un gel de gelatina, de que permite y estabiliza una distribución esencialmente uniforme de sustancias activas y células en una zona tridimensional, contrariamente a los medios líquidos, en los cuales descienden las células a consecuencia de la fuerza de gravedad.  
35 Otra ventaja de la gelatina reticulada y así insoluble es que liga o fija los factores de crecimiento aplicados y/u otras sustancias activas terapéuticas en el tejido meta y permite, si esto fuese posible, de esta manera un desarrollo del efecto localmente limitado en el sentido de una liberación controlada y continua de sustancias activas. Por ello pueden ser impedidos los efectos secundarios indeseados que pueden ser causados por una nueva salida de células o sustancias activas del disco intervertebral.

40 [0017] Las células a cultivar así como eventualmente los factores de crecimiento se añaden a la composición reticulante, antes de que se realice una reticulación esencial de la gelatina. Preferiblemente se proporciona una solución de cultura o nutritiva que contiene las células y la gelatina disuelta, que se mezcla antes o después de llenarla en el recipiente de cultura, es decir la zona meta, con el agente reticulante.

45 [0018] Antes de que se describan en detalle las diferentes variantes de la puesta a disposición y administración de la gelatina y del agente reticulante, se deberá entrar primero en detalle sobre las ventajas especiales que resultan por la selección de gelatina como material matricial.

50 [0019] La gelatina, contrariamente al colágeno, es disponible en una composición definida y reproducible así como en una alta pureza. Particularmente no contiene prácticamente ningún telopéptido inmunógeno que podría activar reacciones de defensa del cuerpo. En este sentido, la gelatina presenta una tolerancia tisular y celular excelente, como no puede ser garantizada por otros biomateriales reabsorbibles como los alginatos o el quitosano.

[0020] Mientras que una gelatina no reticulada sea soluble a una temperatura del cuerpo (37° C), la misma, conforme a lo anteriormente mencionado, puede ser transformada por reticulación bajo estas condiciones en una forma de gel insoluble, e.d. un gel de gelatina reticulado. Un tal gel de gelatina puede servir de matriz celular para el crecimiento y la diferenciación de células.

55 [0021] Simultáneamente el gel de gelatina reticulado es completamente reabsorbible, e.d. después de un tiempo

determinado se degrada en el cuerpo sin residuo. Al mismo tiempo se trata de una degradación hidrolítica que es asistida eventualmente por enzimas propias del cuerpo.

5 [0022] Fundamentalmente se puede utilizar dentro del marco de la presente invención gelatina de diferente procedencia, siendo preferida la gelatina porcina, en particular la gelatina de corteza de cerdo. Esta es disponible en alta calidad y está autorizada ya para diferentes aplicaciones médicas.

10 [0023] Además, la utilización de otros tipos de gelatina, como p.ej. la gelatina de pescado, puede ofrecer también ventajas particulares. Especialmente la gelatina obtenida de pescado de aguas frías se caracteriza por una temperatura de gelificación relativamente baja, e.d. soluciones acuosas de gelatina de pescado (no reticulada) permanecen más líquidas a temperaturas más bajas que por ejemplo las soluciones de gelatina de corteza de cerdo de la misma concentración. Esto permite proporcionar gelatina de pescado disuelta a temperatura ambiente o incluso enfriada, lo cual simplifica el manejo con respecto a una preparación a temperaturas elevadas de hasta 37° C.

[0024] Los tipos de gelatina o materiales de gelatina de diferente procedencia y/o diferentes tipos se pueden utilizar también en una mezcla como gelatina según la invención, para adaptar aún mejor las propiedades de la composición según la invención a la respectiva aplicación.

15 [0025] Para mejorar aún más la biocompatibilidad de la composición terapéutica, se utiliza preferiblemente una gelatina con un contenido especialmente escaso en endotoxinas. En las endotoxinas se trata de productos del metabolismo o fragmentos de microorganismos que son presentes en la materia prima animal.

20 [0026] El contenido en endotoxinas de la gelatina se indica en unidades internacionales por gramo (I.E./g) y se determina según el método de ensayo LAL, cuya realización está descrita en la cuarta emisión de la farmacopea europea (Ph. Eur. 4).

[0027] Para mantener a ser posible reducido el contenido de endotoxinas, es ventajoso destruir a ser posible temprano los microorganismos en el curso de la preparación de gelatina. Además deben ser respetadas las normas de higiene correspondientes durante el proceso de preparación.

25 [0028] Por consiguiente el contenido en endotoxinas de la gelatina puede ser reducido drásticamente mediante determinadas medidas durante el proceso de preparación. Entre estas medidas figura en primer lugar la utilización de materias primas frescas (p.ej. corteza de cerdo) evitando tiempos de almacenamiento, la limpieza minuciosa de toda la instalación de producción inmediatamente antes del comienzo de la preparación de gelatina así como eventualmente la sustitución de intercambiadores de iones y sistemas de filtrado en la instalación de producción.

30 [0029] La gelatina utilizada dentro del marco de la presente invención tiene preferiblemente un contenido en endotoxinas de 1.200 I.E./g o menos, aún más preferiblemente de 200 I.E./g o menos. Óptimamente el contenido en endotoxinas está en 50 I.E./g o menos, determinado cada vez según el método de ensayo LAL. En comparación con esto, algunas gelatinas usuales en el comercio presentan contenidos en endotoxinas de 20.000 I.E./g y más.

35 [0030] En la gelatina que se obtiene por extracción de materias primas con contenido en colágeno se trata, como ya se había mencionado, de un producto soluble en agua que puede ser convertido en una solución particularmente a temperaturas adecuadas para la administración, e.d. a una temperatura de 37° C o inferior. Esta forma disuelta es especialmente ventajosa para la administración, siempre que la solución de gelatina puede ser inyectada p.ej. en el Nucleus pulposus de un disco intervertebral o en un otro tejido lesionado, como p.ej. en caso de defectos del cartílago o de huesos. Para transformar la gelatina en un gel de gelatina después de la administración, e.d. en la zona meta del cuerpo, tiene lugar una reticulación de la gelatina según la invención.

40 [0031] Son conocidos diferentes tipos de agentes reticulantes que transforman la gelatina en un gel de gelatina que es insoluble a una temperatura de 37° C o inferior por enlaces inter y/o intramoleculares. En estos enlaces entre las moléculas de gelatina se puede tratar tanto de ligamentos covalentes como también de una formación de un complejo que se basa por ejemplo en interacciones iónicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de van-der-Waals.

45 [0032] Ante el fondo de la compatibilidad fisiológica se recurre en la presente invención a un agente reticulante enzimático: la utilización de transglutaminasa. Esta enzima que es presente en animales, plantas y bacterias, cataliza la hidrólisis del enlace amídico de residuos de glutamina y el enlace del grupo de acilo libre que surge en este caso con otros grupos amínicos. En proteínas, particularmente en la gelatina, la transglutaminasa cataliza por consiguiente en primer lugar un enlace de residuos de glutamina con los grupos amino de residuos de lisina, e.d. la formación tanto de ligamentos intermoleculares como también intramoleculares covalentes. La transglutaminasa como enzima natural es fisiológicamente inocua, siempre que es utilizada en una forma correspondientemente purificada.

[0033] Preferiblemente se utilizan transglutaminasas de origen bacterial dentro del marco de la invención, que son disponibles en alta calidad y pureza. Puede ser utilizada sin embargo también la transglutaminasa humana que puede ser fabricada especialmente por expresión recombinante de genes.

55 [0034] Preferiblemente se utiliza la transglutaminasa en forma inmovilizada sobre un material de soporte. De esta manera es posible una repartición uniforme de las moléculas enzimáticas en la composición, de manera que se puede

lograr una actividad más elevada con la misma cantidad de enzimas. Materiales de soporte preferidos para la transglutaminasa son los oligosacáridos.

5 [0035] Según la invención, la reticulación de la gelatina se efectúa en la zona del cuerpo, e.d. la gelatina y el agente reticulante deben entrar en contacto entre ellos solamente después, durante o inmediatamente antes de la administración bajo condiciones que permiten el transcurso de la reacción de reticulación. Para garantizar esto, son imaginables diferentes formas de puesta a disposición y administración de la gelatina y del agente reticulante. Las alternativas sustanciales (i) e (ii) ya arriba mencionadas deben ser descritas en lo sucesivo más en detalle.

10 [0036] Según la variante (i) de la invención, la utilización de la composición se efectúa de tal manera que la gelatina y el agente reticulante se mezclan para formar una composición terapéutica reticulante y esta se administra a la zona meta. En una tal composición se trata preferiblemente de una solución acuosa que contiene el agente reticulante y la gelatina disuelta.

15 [0037] En esta forma de proceder se garantiza que haya una repartición homogénea de ambos componentes en la solución. Una tal solución puede ser administrada también de una manera fácil, en particular por una simple aplicación sobre la zona meta o por inyección. Sin embargo una tal solución generalmente debería ser producida inmediatamente antes de la administración, para evitar que la reacción de reticulación ya ha progresado demasiado antes de alcanzar la zona meta y la viscosidad de la solución p.ej. para una inyección se vuelva demasiado alta. Según el tipo de la gelatina y del agente reticulante es sin embargo también imaginable, que la solución que contiene ambos componentes puede ser almacenada durante algún tiempo, particularmente a temperaturas bajas, sin que la reacción de reticulación se desenvuelva ya en una medida que perjudica la administración.

20 [0038] Preferiblemente la solución acuosa se prepara por disolución de una mezcla de sustancia sólida que comprende la gelatina y el agente reticulante preferiblemente en forma liofilizada.

25 [0039] La puesta a disposición de la gelatina y el agente reticulante en esta forma sólida, en la que no puede transcurrir la reacción enzimática, tiene la ventaja de que la mezcla presenta una estabilidad de almacenamiento relativamente alta. Simultáneamente el manejo para el médico tratante es fácil, puesto que él solamente debe disolver una única mezcla de sustancia sólida en un medio líquido que contiene ya eventualmente las células a administrar y/u otras sustancias activas.

[0040] La disolución de la mezcla de sustancias sólidas debe ocurrir inmediatamente antes de la administración de la solución acuosa, e.d. particularmente menos de 10 minutos, preferiblemente menos de 5 minutos antes, con respecto a una temperatura prefijada en la respectiva zona meta.

30 [0041] Por la presencia de la gelatina en forma liofilizada, su disolución mejora también considerablemente a temperaturas más bajas. Esto es significativo, porque en muchas aplicaciones preferidas de las composiciones terapéuticas son administradas simultáneamente las células que son sensibles respecto a temperaturas de por encima de 37° C. La disolución de la mezcla de sustancias sólidas se efectúa por eso preferiblemente a una temperatura de 37° C o inferior. La gelatina liofilizada es bien soluble a esta temperatura, en particular a temperatura ambiente, puesto que se presenta al menos predominantemente en forma amorfa.

35 [0042] En vista de la velocidad de formación del gel de gelatina así como su resistencia, la cantidad utilizada de agentes reticulantes en proporción con la cantidad de gelatina es de una importancia decisiva. En la mezcla arriba descrita son preferidas 0,6 a 80 unidades de transglutaminasa por gramo de gelatina, más preferidas 5 a 40 unidades/g. Sobre la cinética de la formación de gel, que resulta entre otras cosas de la elección de esta proporción, se entrará en detalle más abajo.

[0043] En vista de la primera variante (i) la presente invención se refiere por consiguiente también a una mezcla de sustancias sólidas que comprende gelatina y transglutaminasa preferiblemente en forma liofilizada.

45 [0044] En la variante (ii) arriba citada de la invención, la aplicación de la composición ocurre de tal manera que la gelatina y el agente reticulante se preparan en forma separada la una del otro y se administran simultáneamente o uno tras el otro formando la composición terapéutica reticulante. Al mismo tiempo puede ocurrir una mezcla de ambos componentes en diferentes momentos, según se describirá en lo sucesivo.

50 [0045] Una forma preferida de la preparación consiste en que tanto la gelatina como también el agente reticulante se proporcionan en forma de soluciones acuosas separadas. Estas pueden ser administradas entonces por el médico tratante en forma mezclada y de una solución única, según se había descrito esto ya arriba. La mezcla debería ocurrir en este caso en menos de 10 minutos, preferiblemente en menos de 5 minutos antes de la administración.

[0046] Para descartar con mayor seguridad un comienzo demasiado pronto de la reacción de reticulación, es sin embargo preferido, cuando la solución de gelatina y la solución de agente reticulante no entran en contacto antes, sino solamente durante o después de la administración. Esto puede ser logrado particularmente por una administración simultánea de las dos soluciones (separadas).

55 [0047] Según el tipo del medio empleado para la administración de las soluciones (p.ej. una o varias cánulas de

inyección u otro aplicador) puede ocurrir en este caso la mezcla de las soluciones administradas simultáneamente antes, durante o después de alcanzar la zona meta. Una mezcla a ser posible temprana, e.d. antes de alcanzar la zona meta, es sin embargo ventajosa para garantizar una alta homogeneidad de la solución entrante en la zona meta y con ello la formación de un gel de gelatina uniformemente reticulado.

5 [0048] En una forma de realización preferida de la invención, una administración simultánea de la solución de gelatina y de la solución del agente reticulante tiene lugar por inyección de ambas soluciones con un dispositivo aplicador de cámaras múltiples, por ejemplo una jeringa de cámara doble. En este caso se encuentran la solución de gelatina y la solución del agente reticulante en cámaras separadas del dispositivo de aplicación y se administran ya mezcladas por ejemplo por una cánula de inyección común en la zona meta deseada, por ejemplo el Nucleus pulposus. La mezcla de 10 las dos soluciones se efectúa por consiguiente durante la administración, por ejemplo a la entrada en la cánula. Para obtener una mezcla a ser posible intensa, es preferido que el dispositivo aplicador de cámaras múltiples comprenda un elemento mezclador. Al mismo tiempo se puede tratar particularmente de una estructura geométrica (mezclador estático) en la vía de flujo de la cánula, en la cual tiene lugar una mezcla, en particular un arremolinamiento de las dos soluciones.

15 [0049] En vista de la segunda variante (ii), la presente invención se refiere por consiguiente también a un dispositivo aplicador de cámaras múltiples que contiene una solución acuosa de gelatina y una solución acuosa de agente reticulante en cámaras separadas.

[0050] Alternativamente es también posible administrar y mezclar la solución acuosa de gelatina y la solución acuosa del agente reticulante uno tras otro en la zona meta. También en este caso está garantizado que la reticulación de la 20 gelatina tiene lugar antes en la zona meta.

[0051] En una otra forma de realización preferida de la invención por una parte se prepara una solución acuosa de gelatina así como un agente reticulante en forma sólida. Esta variante particularmente en el caso de agentes reticulantes enzimáticos es adecuada como transglutaminasa, cuya resistencia es generalmente más alta en esta forma que en solución. La enzima puede ser proporcionada especialmente en forma de polvo liofilizado que es dosificado 25 luego en la solución de gelatina antes de administrarlo y que es disuelto a continuación.

[0052] En las aplicaciones de la composición terapéutica según la invención, que se explican más abajo más en detalle, se realiza simultáneamente una administración de células vivas, estando contenidas estas preferiblemente en la solución acuosa de gelatina. A causa de la sensibilidad de estas células a la temperatura es preferido que la administración de la solución acuosa de gelatina se realiza a una temperatura de 37° C o inferior. La preparación de la 30 solución de gelatina puede ocurrir sin embargo también a temperaturas más altas, p. ej. a 60° C, añadiendo las células entonces solamente después del enfriamiento a una temperatura de 37° C o inferior. Si se almacena la solución entonces a temperatura ambiente o bajo refrigeración, la gelatina por cierto puede gelificarse y solidificarse, pero luego puede ser convertida de nuevo en una solución inmediatamente antes de la administración por calentamiento a un temperatura de hasta 37° C.

35 [0053] La concentración de la solución de gelatina administrada se elige preferiblemente de manera que la resistencia de la gelatina en la composición sea de 5 a 20 % en peso. Se consideró que concentraciones más bajas de gelatina generalmente no conducen bien a geles de gelatina reticulados con una resistencia suficiente, mientras que las concentraciones de más de 20 % en peso pueden ser parcialmente desventajosas con respecto a la viabilidad de las células.

40 [0054] En el caso de transglutaminasa, su cantidad y concentración en una solución de transglutaminasa es elegida preferiblemente de tal manera que, como ya se había descrito en relación con la variante (I), resulte una cantidad de 0,6 a 80 unidades de transglutaminasa por gramo de gelatina en la composición. Es preferida además una proporción de 5 a 40 unidades/g. En este caso, el volumen de la solución de transglutaminasa generalmente puede ser elegido claramente más reducido que aquel de la solución de gelatina, de manera que esta última no es diluida esencialmente 45 por mezcla con la solución de transglutaminasa.

[0055] La velocidad de la reacción de reticulación así como la resistencia del gel de gelatina formado dependen en alta medida de la concentración de la gelatina en la composición y de la relación entre la gelatina y el agente reticulante. Estos parámetros pueden ser variados dentro de los márgenes preferidos arriba citados, para compensar la influencia de otros factores.

50 [0056] Dichos factores son p.ej. el tipo de la gelatina utilizada, particularmente su viscosidad y peso molecular medio, así como en el caso de transglutaminasa también su tipo y su procedencia.

[0057] La cinética y la medida de la reacción de reticulación pueden ser descritos por diferentes parámetros físicos. Para medir estos, la formación del gel de gelatina, como se desenvuelve in vitro en la aplicación terapéutica, se regula posteriormente por una reacción correspondiente in vitro. El comienzo de la reacción de reticulación está definido en 55 cada caso por el momento, en el cual la gelatina y el agente reticulante entran en contacto en una solución acuosa.

[0058] La velocidad de formación del gel de gelatina reticulado se puede caracterizar particularmente por la indicación del llamado punto de gelificación. El punto de gelificación está definido simultáneamente como aquel momento después

del comienzo de la reacción de reticulación, en el cual el módulo de memoria  $G'$  y el módulo de pérdida  $G''$  del gel de gelatina es del mismo tamaño (véase también T. Metzger, Das Rheologie-Handbuch (El manual sobre la reología), editorial Vincentz 2000, página 173 if).

5 [0059] En una solución de gelatina líquida no reticulada,  $G'$  se sitúa claramente por debajo de  $G''$ . En el curso de la reacción de reticulación, e.d. con la formación creciente de gel, aumentan tanto el módulo de memoria como también el módulo de pérdida, aumentando  $G'$  más intensamente que  $G''$ . El punto de gelificación arriba mencionado se puede averiguar por consiguiente a partir del punto de intersección de ambas curvas en un diagrama, en el cual  $G'$  y  $G''$  son aplicados fuera de tiempo. Experimentalmente se puede averiguar el punto de gelificación también como el momento, en el cual en el curso de la reacción de reticulación se puede medir por primera vez una resistencia del gel (véase abajo).

10 [0060] Para la utilización según de la presente invención es preferido que se alcance el punto de gelificación del gel de gelatina reticulado unos 5 a 180 minutos después del comienzo de la reacción de reticulación, de especial preferencia 10 a 60 minutos y más preferido hasta 25 minutos después del comienzo de la reacción de reticulación. Los tiempos prefijados anteriormente citados se entienden en la respectiva zona meta con respecto a una temperatura prefijada. En caso de una formación más rápida de gel existe el riesgo de que la composición terapéutica pierda su fluidez demasiado temprano, lo cual particularmente puede dar lugar a que el médico tratante no disponga de suficiente tiempo para la administración o que la formación de gel progresa demasiado, antes de que la composición se haya repartido uniformemente en el respectivo lugar meta. Una formación demasiado lenta del gel, e.d. un punto de gelificación demasiado tarde, tiene a su vez la desventaja de que la parte afectada del cuerpo del paciente, p.ej. la columna vertebral en caso de la regeneración del disco intervertebral, debe ser fijada por un largo tiempo inaceptable.

15 [0061] En vista de las propiedades mecánicas del gel de gelatina reticulado es preferido que este presenta una resistencia de gel de 100 g o más, medido con un pistón de un diámetro de 12,7 mm en caso de una profundidad de penetración de 4 mm. Estas indicaciones se refieren a la opresión de un pistón circular con un diámetro de 12,7 mm en el gel de gelatina perpendicularmente a su superficie, consistiendo el pistón en polimetilmetacrilato y presenta una superficie pulida (véase "Standardised Methods for the Testing of Edible Gelatine" = "métodos estandarizados para la prueba de gelatina comestible", Gelatine Monograph, Junio 2005, GME). En caso de una resistencia del gel de 100 g es necesaria la fuerza correspondiente a este peso, e.d. 0,981 N, para presionar el pistón a una profundidad de 4 mm en el gel de gelatina.

25 [0062] Ya se había mencionado que además de otros factores, la viscosidad de la gelatina utilizada ejerce también una influencia sobre la formación de gel, por lo cual una viscosidad más alta va acompañada generalmente de una formación más rápida de gel. Bajo la viscosidad de la gelatina a este respecto ha de entenderse la viscosidad de una solución estándar al 6,7 % en peso de la gelatina en agua a una temperatura de 60° C. Preferiblemente, la viscosidad de la gelatina 7 utilizada dentro del marco de la presente invención es de mPa.s o más.

30 [0063] La viscosidad de gelatina depende tanto de su origen como también del respectivo procedimiento de preparación y puede ser influenciada además por determinadas medidas.

35 [0064] En una forma de realización preferida de la invención se utiliza una gelatina que ha sido sometida previamente a un pretratamiento térmico con una presión disminuida. En un tal pretratamiento, la viscosidad de la gelatina puede ser aumentada, por lo cual el efecto se debe en primer lugar a una disociación térmica del agua dentro de la molécula de gelatina.

40 [0065] El pretratamiento térmico se efectúa preferiblemente a temperaturas comprendidas entre 80 y 160° C, puesto que por debajo de una temperatura de 80° C los efectos observados son marcados relativamente ligeramente y por encima de una temperatura de 160° C puede surgir una coloración indeseada de la gelatina. Más preferidos son valores del orden de 90 a 120° C.

45 [0066] La formación del gel depende además también del peso molecular de la gelatina. La utilización de gelatina con un peso molecular medio alto, particularmente de 140 kDa o más, es al mismo tiempo preferida, dado que en este caso ya por un número más reducido en puntos de reticulación surge un gel de gelatina más insoluble que en una gelatina con un peso molecular más bajo.

50 [0067] Alternativa o adicionalmente a una selección intencionada o una modificación de la gelatina utilizada, las propiedades de la composición terapéutica según la invención pueden ser influenciadas también en que dos o varias gelatinas con diferentes viscosidades y/o valores Bloom son mezcladas. Por ejemplo por diferentes condiciones de mezcla de una gelatina de hueso altamente viscosa con una gelatina de pescado de baja viscosidad puede ser variada la velocidad de formación de gel sobre una zona amplia.

55 [0068] En una otra forma de realización preferida de la invención se utiliza una gelatina parcialmente reticulada para la preparación de la composición terapéutica, e.d. la gelatina es sometida ya a una primera etapa de reticulación (parcial) antes de la administración según la invención. La gelatina parcialmente reticulada puede, como arriba descrito, ser mezclada con el agente reticulante o puede ser administrada simultáneamente con este o sucesivamente, representando entonces la formación del gel de gelatina reticulado en la zona meta una segunda etapa de reticulación.

- 5 [0069] Por utilización de una gelatina parcialmente reticulada, la viscosidad de la solución de gelatina a administrar por una parte puede ser aumentada claramente, lo cual va acompañado de las ventajas arriba mencionadas. Además, a través de esta medida se puede lograr también una formación esencialmente más rápida de gel, pudiendo ser realizados los puntos de gelificación claramente por debajo de 5 minutos, en particular en el margen de pocos segundos. Una formación muy rápida de gel que se produce casi inmediatamente después de la administración de la composición terapéutica, puede ser ventajosa en determinadas aplicaciones.
- 10 [0070] Para que la solución de la gelatina parcialmente reticulada por cierto sea altamente viscosa, pero todavía fluida bajo las condiciones de aplicación, el grado de la reticulación parcial no debería ser demasiado alto. Este puede ser controlado por las condiciones, bajo las cuales se prepara la gelatina parcialmente reticulada, particularmente por la concentración de la gelatina, la cantidad del agente reticulante y la duración de la reacción de la reticulación parcial. Preferiblemente la gelatina utilizada es parcialmente reticulada bajo utilización de transglutaminasa. Además de las ventajas arriba mencionadas, la utilización de transglutaminasa ofrece la posibilidad de interrumpir la reacción de reticulación parcial por desactivación de la enzima tras un tiempo de reacción definido, en particular por una desnaturalización térmica o un oxidante como p. ej. el peróxido de hidrógeno.
- 15 [0071] Cuando la reticulación parcial de la gelatina se realiza mediante transglutaminasa, entonces se pueden utilizar para ello cantidades claramente más pequeñas de transglutaminasa en proporción con la gelatina que esto es el caso dentro del marco de la administración de la composición terapéutica reticulante. Preferiblemente, la gelatina es parcialmente reticulada bajo utilización de menos de 10 unidades de transglutaminasa por gramo de gelatina, particularmente bajo utilización de 1 a 3 unidades de transglutaminasa por gramo de gelatina.
- 20 [0072] La composición terapéutica según la invención, según lo inicialmente descrito, está destinada a la formación de un gel de gelatina reticulado como matriz celular, e.d. como una matriz resistente que ayuda al crecimiento y/o a la diferenciación de células.
- 25 [0073] La composición terapéutica comprende células vivas o una combinación de células y factores de crecimiento que se administran particularmente con el objetivo de la regeneración biológica o reconstrucción del tejido en la respectiva zona meta del cuerpo. En lo sucesivo se entrará más en detalle sobre algunas de estas aplicaciones.
- [0074] Una forma de realización preferida de la invención se refiere a la utilización de gelatina y de un agente reticulante para la preparación de una composición terapéutica reticulante para la regeneración de lesiones del disco intervertebral.
- 30 [0075] Bajo lesiones del disco intervertebral han de entenderse en este caso cualquier degeneración o alteración de la función natural del tejido del disco intervertebral, pero particularmente en la zona del Nucleus pulposus (núcleo de gelatina) o del Annulus fibrosus (anillo de fibra protector del disco intervertebral). Con el avance de la edad puede dar lugar a una disminución de la viabilidad de las células en el núcleo de gelatina y/o en el anillo de fibra del disco intervertebral en función de otros factores influyentes, lo cual entonces da lugar a que de estas células solamente se produce limitadamente una matriz extracelular o no se produce ninguna. Esta matriz extracelular es sin embargo de una importancia decisiva para la elasticidad y por lo tanto el efecto tampón del disco intervertebral, puesto que la misma está en la posición de ligar grandes cantidades de agua. Como consecuencia de esta degeneración, como ya se había mencionado inicialmente, puede producirse una pérdida considerable del funcionamiento del disco intervertebral con dolores crónicos o una hernia discal por desfibramiento o lesión del Annulus fibrosus..
- 35 [0076] Durante la reconstrucción biológica del disco intervertebral se intenta de contrarrestar dichas lesiones, introduciendo células y/o factores de crecimiento en las diferentes estructuras del disco intervertebral, para sintetizar en las mismas una nueva matriz extracelular. Para ello, la utilización de gelatina y de un agente reticulante según la presente invención es especialmente adecuada, por lo cual en esta forma de realización la zona meta es el Nucleus pulposus y/o el Annulus fibrosus del disco intervertebral.
- 40 [0077] Según la invención se administran en este caso factores del crecimiento y/o células que fueron precultivadas eventualmente in vitro, junto a la gelatina y los agentes reticulantes en la zona meta del disco intervertebral. Después de la repartición de la composición líquida en las diferentes estructuras del disco intervertebral se forma el gel de gelatina reticulado dentro de un breve tiempo tras su administración, e.d. preferiblemente dentro de pocos minutos. Este gel se encarga por una parte de que se fijen las células y/o los factores de crecimiento en una repartición uniforme en el disco intervertebral, y simultáneamente impide que las células y/o los factores de crecimiento pueden ser presionados de manera significativa nuevamente fuera del disco intervertebral a causa de una presión ejercida sobre el disco intervertebral, ya que la gelatina reticulada encola y cierra por ello las estructuras configuradas en forma de cubeta del Annulus fibrosus y la puerta de entrada de la inyección. Una fijación o una posición de reposo del paciente es por lo tanto solamente necesaria para un tiempo relativamente corto, e.d. hasta que haya finalizado esencialmente la formación del gel de gelatina, lo cual puede suceder por ejemplo dentro de unos 5 a 180 minutos.
- 45 [0078] La utilización de la composición terapéutica puede ocurrir particularmente por administración de una solución acuosa que contiene la gelatina y el agente reticulante, o por administración simultánea de una solución acuosa de gelatina y una solución acuosa de agente reticulante y la mezcla de las mismas.
- 50 [0079] Esta y otras variantes de la puesta a disposición y administración ya fueron descritas arriba. En ambos casos la administración puede ocurrir de manera invasiva mínima mediante inyección, por lo cual para la realización de la
- 55

segunda variante, como se había descrito arriba, se utiliza preferiblemente un dispositivo de inyección de cámaras múltiples.

[0080] Las células a administrar y/o los factores de crecimiento son preferidos en este caso en la solución acuosa que contiene la gelatina y el agente reticulante, o en la solución acuosa de gelatina.

5 [0081] En el caso de que tiene lugar la administración de una solución individual, la aportación de los factores de crecimiento y/o de las células puede tener lugar particularmente en forma de una solución o suspensión celular en un medio líquido adecuado. En una forma de realización preferida de la invención, una mezcla de sustancias sólidas de gelatina y transglutaminasa es disuelta en forma liofilizada en esta solución o suspensión celular por el médico tratante inmediatamente antes de la administración. Según se había descrito ya, la gelatina en este caso se presenta  
10 principalmente en forma amorfa, de modo que sea soluble a una temperatura de 37° C o inferior.

[0082] En el segundo caso, los factores de crecimiento, las células o una combinación de células con factores de crecimiento pueden ser proporcionados al médico ya en la solución acuosa de gelatina, en el caso ideal ya en un dispositivo aplicador de cámaras múltiples también llenado con la solución del agente reticulante, para minimizar así el riesgo de una contaminación de los factores de crecimiento y/o de las células. Si la gelatina gelifica durante el almacenamiento o el transporte, la misma puede ser convertida de nuevo en una solución por calentamiento del dispositivo aplicador de cámaras múltiples a una temperatura de hasta 37° C inmediatamente antes de la administración. La utilización de la composición terapéutica es especialmente fácil en esta forma de realización, ya que el médico tratante introduce únicamente una cánula de inyección bajo condiciones controladas (p.ej. con ayuda de procedimientos de proyección de imagen) en la zona meta deseada y conecta a esta el dispositivo aplicador de cámaras múltiples precalentado.  
15  
20

[0083] Las células utilizadas dentro del marco de la reconstrucción del disco intervertebral son preferiblemente células del disco intervertebral. Estas presentan una alta semejanza a células de cartílago (condrocitos) y se denominan por lo tanto también células condrógenas. Como alternativa a ello pueden utilizarse sin embargo también células madre mesenquimales. Estas células pueden ser aisladas de la médula ósea y presentan el potencial de diferenciar en dirección a condrocitos o células del disco intervertebral.  
25

[0084] Las células utilizadas pueden ser tanto de origen autólogo, e.d. las mismas fueron extraídas del paciente mismo, como también de origen alogénico, e.d. que provienen de un dispensador.

[0085] En la provisión de las células a administrar se procede ventajosamente de manera de aislar del tejido y de precultivar in vitro las células del respectivo tipo. Una posibilidad alternativa que puede emplearse también dentro del marco de la presente invención consiste en administrar un tejido desmenuzado que contiene las células deseadas con la composición terapéutica. En comparación con un cultivo de las células in vitro, este método ha de efectuarse muy rápidamente y económico. Particularmente se extrae en este caso al paciente o a un dispensador un trozo de tejido mediante biopsia y se desmenuza mecánicamente, p. ej. con un bisturí estéril o un molino. Los trozos de tejido resultantes deberán ser bastante pequeños, para permitir una migración de las células vivas del tejido al gel de gelatina reticulado después de la administración, e.d. la matriz celular, preferiblemente más pequeño que 1 mm<sup>3</sup>. Preferiblemente se prepara entonces una suspensión de los fragmentos de tejido (p.ej. 300 a 500 mg de tejido en 1 ml de una solución tampón fisiológica), que puede ser mezclada luego con la solución acuosa de gelatina o de la solución que contiene la gelatina y el agente reticulante.  
30  
35

[0086] En la zona meta, e.d. en el caso arriba descrito en el Nucleus pulposus y/o Annulus fibrosus del disco intervertebral, el gel de gelatina reticulado forma una matriz que favorece el crecimiento y/o la diferenciación de las células. Un papel importante hace en este caso también el hecho de que el gel de gelatina se degrada o se reabsorbe después de un tiempo determinado y sucesivamente puede ser sustituido por la matriz extracelular sintetizada por las células.  
40

[0087] Para facilitar condiciones a ser posible óptimas, es preferido, como ya se había señalado, que la composición terapéutica comprende factores de crecimiento u otras sustancias con efecto protector y estimulante para las células. Dichos factores, dentro del marco de la regeneración del disco intervertebral, son por ejemplo factores de la superfamilia TGF-β (transforming growth factor beta = factor de crecimiento transformante beta), insulina, glucosamina, sulfato de condroitina, ácido hialurónico o también sustancias activas antiinflamatorias (como antagonistas del receptor IL-1) o sustancias con efecto antibiótico. Por dichos factores es influenciado positivamente el índice de supervivencia, la proliferación y diferenciación de las células así como el ambiente del metabolismo en la zona meta.  
45  
50

[0088] Referente a la vitalidad de las células utilizadas generalmente ha de tenerse en cuenta que la solución acuosa que la contiene presenta condiciones fisiológicas, e.d. particularmente un valor pH y una intensidad de iones adecuados. Por ejemplo pueden ser utilizados sistemas tampón conocidos como el tampón PBS o tampón tipo Hanks. Al mismo tiempo sin embargo ha de tenerse en cuenta que por la gelatina disuelta aumenta la osmolaridad, e.d. la concentración total de la solución con efecto osmótico. Para evitar efectos negativos sobre las células, esto debería ser compensado mediante una reducción de la concentración de otros componentes del sistema tampón.  
55

[0089] En esta coherencia el objeto de la presente invención es también un procedimiento para la regeneración de lesiones del disco intervertebral, comprendiendo el procedimiento la administración de gelatina, transglutaminasa así

como células del disco intervertebral y/o condrocitos y/o células madre mesenquimales y/o factores de crecimiento en el Nucleus pulposus y/o Annulus fibrosus del disco intervertebral por separado o ya antes de alcanzar la zona meta.

5 [0090] De una manera análoga, como esto ha sido descrito en relación con lesiones del disco intervertebral, la composición terapéutica de la presente invención puede ser utilizada también en la zona del menisco o del cartílago articular o no articular. En este sentido la invención se refiere también a la utilización de gelatina y de un agente reticulante para la preparación de una composición terapéutica reticulante para la regeneración de lesiones del cartílago o del menisco.

10 [0091] Además del disco intervertebral, también el tejido del cartílago dispone de una facultad de regeneración intrínseca extremadamente reducida. En el caso de lesiones, p.ej. en lesiones del cartílago debidas a heridas a consecuencia de un trauma, una osteocondrosis dissecans o en caso de lesiones del cartílago limitadamente degenerativas, se introducen por lo tanto condrocitos autólogos o alogénicos en la zona defectuosa, para producir allí una nueva matriz extracelular (trasplante de células de cartílago autólogo o alogénico).

15 [0092] La administración de estas células puede ocurrir especialmente en defectos espacialmente más pequeños, ventajosamente bajo utilización de la composición terapéutica de la presente invención, como esto ha sido descrito ya en relación con la regeneración del disco intervertebral. En las células utilizadas se puede tratar en este caso de condrocitos y/o de células madre mesenquimales, donde estas últimas disponen del potencial de diferenciar en dirección a los condrocitos.

[0093] Estas y otras ventajas de la presente invención se describen más en detalle con ayuda de los siguientes ejemplos haciendo referencia a las figuras. Estas muestran:

20 Fig. 1A a 1 D: Diagramas, en los cuales la resistencia del gel y la viscosidad de un gel de gelatina reticulado según la invención para gelatinas con diferentes viscosidades se aplican en función del tiempo de reacción; y

Fig. 2: una micrografía óptica de un gel de gelatina reticulado según la invención con condrocitos incluidos en la misma.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Reticulación de gelatina con transglutaminasa: influencia de la viscosidad de la gelatina

[0094] Como sistema de modelos para la aplicación médica de la composición terapéutica según la invención, la reticulación de gelatina fue realizada in vitro con el agente reticulante enzimático transglutaminasa y se determinó la cinética de la formación de un gel de gelatina reticulado.

Preparación de una solución madre de transglutaminasa

30 [0095] Para este ejemplo y los ejemplos descritos a continuación se utiliza una transglutaminasa recombinante de queratinocitos humanos.

35 [0096] Una solución madre de la transglutaminasa con una concentración de 30 unidades/ml fue preparada, disolviendo la cantidad correspondiente de la enzima en agua destilada a temperatura ambiente. La solución fue filtrada de manera estéril, congelada en porciones cada una de 1,5 ml con ayuda de nitrógeno líquido y almacenada a una temperatura de aprox. -18° C. Alternativamente, las porciones pueden ser almacenadas a una temperatura de +4° C.

Pretratamiento térmico de la gelatina con presión reducida

[0097] Para la reticulación con transglutaminasa fueron utilizadas las gelatinas de corteza de cerdo con diferentes viscosidades según la siguiente tabla 1. La indicación de la viscosidad se refiere en este caso siempre a la viscosidad de una solución acuosa de 6,7 % en peso de la gelatina a una temperatura de 60° C.

40 Tabla 1

Denominación	Viscosidad (mPa.s)
Gelatina A	3,73
Gelatina B	5,83
Gelatina C	7,62
Gelatina D	8,65

45 [0098] Las gelatinas C y D altamente viscosas fueron preparadas respectivamente por un pretratamiento térmico de gelatinas con una viscosidad más reducida. En este caso se obtuvo la gelatina C por pretratamiento térmico de la gelatina B así como la gelatina D por pretratamiento térmico de otra gelatina de corteza de cerdo con una viscosidad de 6,41 mPa.s.

[0099] El pretratamiento térmico de la gelatina con la presión disminuida se realizó de tal manera que se mantuvieron respectivamente aprox. 700 g de gelatina en forma molida con ayuda de un evaporador rotatorio durante 4 horas a una temperatura de 105° C bajo un vacío de aprox. 14 mbar. A continuación se dejó enfriar la gelatina por la noche en un recipiente cerrado.

5 Realización de la reacción de reticulación

[0100] Para cada una de las cuatro gelatinas A, B, C y D se preparó una solución de 10 % en peso de la gelatina en una mezcla de tampón de PBS de 30 % en vol. (pH 7,2) y de 70 % en vol. de agua destilada. Para ello la gelatina fue disuelta a una temperatura de 60° C y la solución homogénea resultante fue templada a una temperatura de 37° C.

10 [0101] Todas las reacciones de reticulación fueron realizadas a una temperatura constante de 37° C, para aproximar a ser posible bien las condiciones dominantes en la aplicación terapéutica. Para cada fórmula se metieron 5 ml de la solución de gelatina de 10 % en peso en un recipiente cilíndrico con un diámetro de 3 cm que fue templado con ayuda de un bloque de aluminio a una temperatura de 37° C. La reacción de reticulación fue iniciada añadiendo 0,3 ml de la solución madre de transglutaminasa (30 unidades/ml) y 0,9 ml de agua destilada, respectivamente precalentada a una temperatura de 37° C, y se mezcló inmediatamente la mezcla de reacción resultante. Esto corresponde a una cantidad de 15 de enzimas de 18 unidades/g relativa a la gelatina.

Determinación de la resistencia del gel en función del tiempo de reacción

[0102] En el transcurso de la reacción de reticulación se determinaron a intervalos de 50 seg. la resistencia del gel y la viscosidad de la mezcla de reacción mediante un dispositivo medidor de fuerza/recorrido del tipo Zwick BZ 2.5/TN1S (fabricante: Zwick GmbH & Co. KG, Ulm).

20 [0103] La determinación transcurre de manera que en cada ciclo de medición, e.d. cada 50 seg., inmergiendo o presionando un pistón circular con un diámetro de 12,7 mm perpendicularmente a la superficie de la mezcla de reacción a una profundidad de 4 mm de esta última y se mide la fuerza necesaria para esto. A continuación se vuelve a tirar nuevamente hacia arriba el pistón que presenta una superficie de polimetilmetacrilato pulida. En tanto que ya existe un gel de gelatina reticulado, este adhiere al pistón al sacar este. La fuerza necesaria, para tirar el pistón hacia arriba hasta 25 que se desprende el gel de gelatina, se mide igualmente.

[0104] En las figuras 1A a 1D la fuerza medida está aplicada en función del tiempo de reacción (comienzo de la reacción de reticulación con 0 mm) para las cuatro fórmulas con las gelatinas A, B, C o D. Los valores de fuerza positivos indican la fuerza necesaria para la opresión del pistón, e.d. la resistencia del gel (981 mN corresponden a una resistencia del gel de 100 g). Los valores de fuerza negativos indican la viscosidad del gel de gelatina, e.d. la fuerza necesaria para 30 sacar el pistón hasta el desprendimiento del gel de gelatina.

[0105] Durante una fase inicial de la reacción, tanto la resistencia del gel como también la viscosidad están esencialmente a cero, e.d. que existe una solución fluida. En la aplicación médica corresponde esto al período, en el cual la mezcla puede ser administrada a la zona meta del cuerpo. El momento más temprano, en el cual puede ser medida una resistencia del gel sensiblemente diferente a cero, es el punto de gelificación. En este momento el módulo de memoria G' y el módulo de pérdida G'' son del mismo tamaño. 35

[0106] Los diferentes puntos de gelificación de las fórmulas A a D están relacionados en la siguiente tabla 2, en la cual los valores están mediados respectivamente a partir de tres experimentos.

Tabla 2

Fórmula	Viscosidad	Punto de gelificación	Resistencia del gel después de 10 min
Gelatina A	3,73 mPa.s	14 min	281 mN/cm <sup>2</sup>
Gelatina B	5,83 mPa.s	5 min	536 mN/cm <sup>2</sup>
Gelatina C	7,62 mPa.s	3,3 min	837 mN/cm <sup>2</sup>
Gelatina D	8,65 mPa.s	2,3 min	no determinada

40 [0107] Se manifiesta que el punto de gelificación está correlacionado con la viscosidad de la gelatina utilizada, e.d. en caso de una gelatina altamente viscosa, la formación de gel de baja viscosidad con la misma cantidad de agentes reticulantes ocurre esencialmente más rápida que en una gelatina de baja viscosidad. También la resistencia de gel lograda depende del material inicial, como se deduce de las figuras 1A a 1 D: tras 25 min se lograron en las gelatinas B, C y D una resistencia de gel parcialmente claramente por encima de 100 g, mientras que en la gelatina A con la viscosidad más baja solamente se alcanzaron aprox. 40 g. 45

Ejemplo 2: Reticulación de gelatina con transglutaminasa: influencia de la concentración de gelatina

[0108] En este ejemplo, la gelatina C térmicamente pretratada del ejemplo 1 fue reticulada con transglutaminasa con diferentes concentraciones de gelatina. La formulación de las mezclas reactivas y la medición de la resistencia del gel

se realizó según lo descrito en el ejemplo 1.

[0109] La concentración de las soluciones de gelatina utilizadas, la composición de las mezclas reactivas y los puntos de gelificación resultantes de la medición de la resistencia del gel están representados en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

Fórmula	2-1	2-2	2-3
Concentración de la solución de gelatina	5 % en peso	8 % en peso	10 % en peso
Solución de gelatina	5,9ml	5,9ml	5ml
Solución madre de transglutaminasa	0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml
Agua destilada	-	-	0,9ml
Transglutaminasa por gramo de gelatina	20,3 unidades/g	19,1 unidades/g	18,0 unidades/g
Punto de gelificación	5,0 min	4,0 min	3,3 min

5

[0110] Los resultados muestran que la formación de gel puede ser acelerada por un aumento de la concentración de gelatina. En los ensayos efectuados esta tendencia es claramente reconocible, aunque en las concentraciones más altas de la gelatina la cantidad de agentes reticulantes era algo más reducida en proporción con la gelatina.

10

[0111] En la aplicación médica de la composición según la invención, en esta coherencia ha de tomarse en consideración, que un aumento de la concentración de la gelatina a valores por encima de aprox. 20 % en peso bajo ciertas circunstancias puede tener efectos negativos sobre la viabilidad de células, que se proporcionan en la solución de gelatina.

Ejemplo 3: Reticulación de gelatina con transglutaminasa: influencia de la cantidad de agentes reticulantes

15

[0112] En este ejemplo, la gelatina C térmicamente pretratada del ejemplo 1 fue reticulada con diferentes cantidades de transglutaminasa.

20

[0113] Una solución de 5 % en peso de la gelatina C fue preparada según está descrito en el ejemplo 1. Para cada fórmula fueron precalentados 5,9 ml de esta solución a una temperatura de 37° C y mezclados con la cantidad de solución de transglutaminasa madre (30 U/ml, precalentado a 37° C) indicada en la siguiente tabla 4, para iniciar la reacción de reticulación. La determinación del punto de gelificación con ayuda de la medición de la resistencia del gel se realizó según lo descrito en el ejemplo 1.

Tabla 4

Fórmula	3-1	3-2	3-3	3-4
Cantidad de solución madre de transglutaminasa	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,5ml
Transglutaminasa por gramo de gelatina	10,2 unidades/g	20,3 unidades/g	30,5 unidades/g	50,8 unidades/g
Punto de gelificación	14,0 min	5,0 min	4,0 min	3,0 min

25

[0114] Según se deduce de los valores indicados en la tabla 4, la velocidad de formación del gel de gelatina reticulado puede ser influenciada también por la concentración del agente reticulante, en este caso de la transglutaminasa. Según lo esperado, una cantidad más alta de agentes reticulantes da lugar a una formación más rápida de gel.

Ejemplo 4 Reticulación de gelatina con transglutaminasa en un medio de cultura celular

30

[0115] En este ejemplo, la gelatina C del ejemplo 1 fue reticulada en diferentes concentraciones con diferentes cantidades de transglutaminasa en un sistema tampón especialmente bien adecuado para el cultivo de células. Para ello fue preparada una solución acuosa de gelatina en una mezcla de 80 % en vol. del medio de cultura celular DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, BioWhittaker) y 20 % en vol. de suero FB (suero fetal de terneros, PAA Laboratories). La realización de la reacción de reticulación y la medición de la resistencia del gel ocurrieron por lo demás según lo descrito en el ejemplo 1 con las respectivas proporciones de cantidades indicadas en la tabla 5.

Tabla 5

Fórmula	4-1	4-2	4-3	4-4
Concentración de gelatina	12,7 % en peso	8 % en peso	8 % en peso	6 % en peso
Cantidad de solución de gelatina	5,9ml	5,9ml	5,9ml	5,9ml
Cantidad de solución madre de transglutaminasa	0,3 ml	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml
Transglutaminasa por gramo de gelatina	12,0 U/g	19,1 U/g	12,7 U/g	16,9 U/g
Concentración de transglutaminasa	1,45 U/ml	1,45 U/ml	0,98 U/ml	0,98 U/ml
Gelificación	3,0 min	5,0 min	8,0 min	11,0 min
Resistencia del gel 10 min después del punto de gelificación	1420 mN	620 mN	470 mN	280 mN

5 [0116] Los resultados mostraron que la reticulación de gelatina con transglutaminasa puede ser realizada también sin problema en un medio de cultura celular que es adecuado para el cultivo y la administración de células vivas. Igual a los ejemplos anteriores se demuestra también aquí que la velocidad de formación de gel y la resistencia del gel lograda pueden ser variadas por elección de la concentración del agente reticulante y de la gelatina sobre un margen amplio.

Ejemplo 5 Reticulación de una gelatina no gelificante con transglutaminasa

[0117] En este ejemplo se utilizó una gelatina no gelificante bajo las condiciones de las pruebas estándar tipo Bloom. Esta gelatina obtenida de la piel de pescado está caracterizada del siguiente modo:

10 Resistencia del gel: 0 g Bloom  
 Viscosidad (6,7 % en peso, 60° C): 2,1 mPa.s  
 Conductividad: 115  $\mu$ S  
 Peso molecular (GPC): 70.840 Da

15 [0118] La gelatina de pescado fue reticulada según la forma de proceder descrita en el ejemplo 1 en diferentes concentraciones con cantidades diferentes de transglutaminasa. Las respectivas relaciones entre cantidades, puntos de gelificación y resistencias de gel sededucen de la sucesiva tabla 6.

Tabla 6

Fórmula	5-1	5-2	5-3	5-4
Concentración de la gelatina	10 % en peso	5 % en peso	15 % en peso	15 % en peso
Cantidad de la solución de gelatina	5,0 ml	5,9ml	5,4 ml	4,8 ml
Cantidad de solución madre de transglutaminasa	0,3 ml	0,5ml	1,0 ml	1,6 ml
Agua destilada	0,9ml	-	-	-
Transglutaminasa por gramo de gelatina	18 U/g	51 U/g	37 U/g	67 U/g
Punto de gelificación	60 min	30 min	14,5 min	9,0 min
Resistencia del gel 10 min después del punto de gelificación	(no determinado)	30 mN	395 mN	711 mN

20 [0119] También bajo utilización de la gelatina de pescado de baja viscosidad pueden ser preparados geles de gelatina reticulados, realizándose la formación de gel según las esperanzas muy lentamente en comparación con gelatinas altamente viscosas y se logra en total una resistencia más baja del gel. Por utilización tanto de concentraciones altas de gelatina como también elevadas cantidades de agentes reticulantes pueden ser logrados sin embargo, como demuestran las formulaciones 5-3 y 5-4, también aquí absolutamente unos valores que son comparables con los valores logrados en gelatinas altamente viscosas.

25 [0120] Una ventaja particular en la utilización de gelatina de pescado no gelificante consiste en que la solución de gelatina permanece líquida a temperatura ambiente y por ello se simplifican la preparación y el manejo de la composición terapéutica.

[0121] Por utilización de mezclas de diferentes tipos de gelatina, p.ej. de gelatina de pescado con gelatina de hueso bovino o de corteza de cerdo, resultan otras posibilidades (junto a la variación de la concentración de la gelatina y del agente reticulante), para influenciar el punto de gelificación y la resistencia del gel de la composición terapéutica reticulada.

5 Ejemplo 6 Reticulación de gelatina con transglutaminasa: utilización de una gelatina parcialmente reticulada

[0122] En este ejemplo, la gelatina fue sometida en primer lugar a una (primera) etapa de reticulación parcial, para aumentar la viscosidad inicial de la solución de gelatina y para lograr una formación de gel claramente más rápida en la (en este caso segunda) etapa de reticulación en sí.

10 [0123] Como material inicial para la preparación de la gelatina parcialmente reticulada servía una gelatina de huesos porcinos con un valor tipo Bloom de 250 g y de una viscosidad de 6,6 m Pa.s (6,7 % en peso a una temperatura de 60° C). Una solución de 10 % en peso de esta gelatina en agua destilada fue preparada dejando hincharse la gelatina primero durante 45 minutos a temperatura ambiente y disolviéndola luego durante una hora a una temperatura de 60° C. A continuación la solución fue templada a una temperatura de 50° C y se añadió la cantidad correspondiente de la solución madre de transglutaminasa (30 unidades/ml), de manera que hubo una cantidad de 1,5 unidades de transglutaminasa por gramo. Para la realización de la reticulación parcial, se mantuvo la solución a una temperatura de 15 50° C durante 2 horas bajo agitación.

[0124] Para detener la reacción de reticulación, la transglutaminasa fue desactivada térmicamente por calentamiento de la solución a una temperatura de 80° C, a continuación se enfrió la solución inmediatamente en el baño helado, se vertió en una cubeta y se dejó gelificar. El gel de gelatina obtenido fue triturado y secado a una temperatura de 20° C y una 20 humedad relativa del aire de 10 % y a continuación fue molido. La gelatina parcialmente reticulada obtenida de esta manera es denominada en lo sucesivo P2.

[0125] Otra gelatina parcialmente reticulada con un grado de reticulación algo más alto fue preparada según lo arriba descrito, con la diferencia de que la reacción de reticulación parcial se realizó durante 3 horas. Esta gelatina es denominada en lo sucesivo P3.

25 [0126] Los valores Bloom y las viscosidades a temperaturas de 60° C y 37° C de la gelatina inicial P0 y de las gelatinas P2 y P3 parcialmente reticuladas están representados en la siguiente tabla 7.

Tabla 7

Gelatina	P0	P2	P3
Valor Bloom	250 g	228 g	257 g
Viscosidad (6,7% en peso, 60° C)	6,6 mPa.s	9,6 mPa.s	16,7 mPa.s
Viscosidad (10% en peso, 37° C)	28,6 mPa.s	69,8 mPa.s	200 mPa.s

30 [0127] Debido a la reticulación parcial, la viscosidad de la gelatina a una temperatura de 60° C podía ser aumentada en aprox. 1,5 veces (P2) o aprox. 2,5 veces (P3) con respecto a la gelatina no reticulada (P0). El aumento de la viscosidad en caso de una temperatura de 37° C, e.d. con una temperatura de aplicación preferida de la composición terapéutica, produce un efecto aún esencialmente más claro. En este caso, la viscosidad aumentó aprox. 2,5 veces o aprox. 7 veces.

35 [0128] Bajo utilización de las gelatinas P0, P2 o P3 se efectuó una reacción de reticulación con transglutaminasa y la resistencia del gel y la viscosidad se determinó en función del tiempo de reacción, como se había descrito esto en el ejemplo 1. Se partió respectivamente de 5 ml de una solución de gelatina de 10 % en peso, a la que se añadió en cada caso 1,2 ml de la solución madre de transglutaminasa (30 unidades/ml). Esto corresponde a una cantidad enzimática de 72 unidades por gramo de gelatina.

[0129] Los resultados de medición están relacionados en la siguiente tabla 8.

40 Tabla 8

Fórmula	P0	P2	P3
Punto de gelificación	1,5 min	50 seg.	<5 seg.
Resistencia del gel después de 10 min	1184 mN/cm <sup>2</sup>	592 mN/cm <sup>2</sup>	631 mN/cm <sup>2</sup>
Adherencia después de 10 min	316 mN/cm <sup>2</sup>	197 mN/cm <sup>2</sup>	237 mN/cm <sup>2</sup>

[0130] Se demuestra que mediante la reticulación parcial de la gelatina puede ser logrado esencialmente más rápido el punto de gelificación del gel de gelatina reticulado. Particularmente considerable es el resultado logrado con la gelatina P3, e.d. una formación casi inmediata del gel dentro de menos de 5 seg. después de mezclar la gelatina con la

transglutaminasa.

[0131] En la figura 1E está representada la fuerza medida en función del tiempo de reacción para la fórmula con la gelatina P3 (realización de la medición como está descrito en ejemplo 1). De la ilustración es evidente que, a pesar de la gelificación que tiene lugar casi inmediatamente después de la mezcla, aumentan continuamente la resistencia del gel y la adherencia y alcanzan su valor máximo solamente algún tiempo después del punto de gelificación. Este efecto es extremadamente ventajoso para la utilización de la presente invención y permite que la composición terapéutica durante un cierto período después de la aplicación sea todavía plásticamente deformable y puede adaptarse a la estructura de la zona meta.

Ejemplo 7 Preparación y comportamiento de disolución de una mezcla de sustancia sólida liofilizada de gelatina y de transglutaminasa

[0132] Este ejemplo describe la preparación de una mezcla de sustancias sólidas que contiene 6 unidades de transglutaminasa por gramo de gelatina.

[0133] 75 g de la gelatina A del ejemplo 1 (gelatina de corteza de cerdo con 290 g de Bloom) fueron hinchados en 425 g de agua destilada y disueltos a una temperatura de 60° C. La solución se dejó enfriar a 45° C, a la cual se añadió 15 ml de la solución madre de transglutaminasa (30 U/ml, véase el ejemplo 1) y se mezcló bien. Dos cubetas de liofilización fueron enfriadas con nitrógeno líquido, se repartió en las mismas la solución que contiene gelatina y transglutaminasa y se congeló mediante nitrógeno líquido. La solución congelada fue liofilizada durante dos días en una instalación de liofilización del tipo Lyovac GT 2-s (Fabricante: AMSCO Finn-Aqua GmbH, Hürth).

[0134] La mezcla de sustancias sólidas liofilizada obtenida fue molida en un mortero bajo refrigeración continua con nitrógeno líquido para obtener un polvo fino y a continuación fue secada bajo vacío. Puesto que el polvo es intensamente higroscópico, se almacenó bajo vacío a una temperatura de aprox. 4° C.

[0135] Otra mezcla de sustancias sólidas fue preparada repitiendo el procedimiento descrito con las mismas proporciones de cantidades, pero utilizando una gelatina instantánea soluble en agua fría en lugar de la gelatina A. Esta gelatina instantánea contiene partes de hidrolizados de gelatina de bajo peso molecular para mejorar su solubilidad.

[0136] El comportamiento de disolución de las mezclas de sustancias sólidas preparadas de esta manera fue examinado como sigue: cada vez se pesaron 50 mg de la mezcla de sustancias sólidas en un tubito cerradizo y se mezclaron con 950 µl de tampón PBS (pH 7,2) que estaba precalentado a una temperatura de 37° C. Los tubitos fueron agitados con ayuda de un agitador de probeta y se determinó el tiempo hasta la disolución visible de la mezcla de sustancia sólida.

[0137] La mezcla preparada de la gelatina A estaba disuelta después de 2,7 min. y la mezcla preparada de la gelatina instantánea ya estaba disuelta después de 2 min.

[0138] El ejemplo muestra que la gelatina liofilizada puede ser disuelta en una solución acuosa a una temperatura de 37° C. Esto se debe a que la gelatina principalmente es presente en forma amorfa como resultado del proceso de liofilización. Por utilización de gelatina instantánea, la velocidad de disolución puede ser mejorada más aún.

[0139] Dichas mezclas de sustancia sólida liofilizada de gelatina y de un agente reticulante pueden ser utilizadas ventajosamente dentro del marco de la presente invención. La mezcla puede ser preparada a temperatura ambiente o enfriada y luego puede ser disuelta por el médico tratante en una solución acuosa que contiene eventualmente las células a administrar, a una temperatura de 37° C o inferior.

Ejemplo 8 Inclusión de condrocitos porcinos en un gel de gelatina reticulado con transglutaminasa

[0140] En este ejemplo fue examinada la viabilidad de condrocitos porcinos en un gel de gelatina reticulado durante un período de varios días. En este caso se eligió una concentración de gelatina de aprox. 17 % en peso y una cantidad de 16 unidades de transglutaminasa por gramo de gelatina.

[0141] Una solución de 20 % en peso de la gelatina A del ejemplo 1 fue preparada, disolviendo la gelatina a una temperatura de 60° C en una mezcla de 35 % en vol. de tampón tipo Hanks y 75 % en vol. de agua destilada. La dilución del tapón tipo Hanks con agua se realizó con el objetivo de compensar de nuevo al menos parcialmente la osmolaridad de la solución aumentada por la gelatina.

[0142] 200 µl de la solución de gelatina fueron precalentados a una temperatura de 37° C y mezclados con 10 µl de una suspensión celular que contenía aprox. 10,000 condrocitos porcinos, así como con 21,3 µl de solución madre de transglutaminasa (30 U/ml). La mezcla fue pipeteada sobre una plaqueta de recubrimiento e incubada durante 10 min. en la incubadora a una temperatura de 37° C, formándose el gel de gelatina reticulado (matriz celular) que contiene las células. Este fue recubierto con una capa de 3 ml de un medio de cultura celular y se siguió incubando a una temperatura de 37° C.

[0143] El gel de gelatina reticulado (matriz celular) permaneció estable bajo estas condiciones durante al menos siete

días, es decir, que mantuvo esencialmente su forma exterior. Esto indica que la composición terapéutica según de la presente invención puede servir de una matriz tridimensional estable para las células embudidas en esta.

5 [0144] La viabilidad de las células fue determinada por la coloración del gel de gelatina reticulado con yoduro de propidio. Con esta coloración son visibles las células muertas en el microscopio de fluorescencia por una coloración roja. En exámenes después de tres, cinco o siete días se demostró que en cada caso estuvo presente solamente una parte muy escasa esencialmente constante de células muertas.

10 [0145] La figura 2 muestra una micrografía óptica de la matriz celular de un gel de gelatina reticulado 10, tratada con yoduro de propidio, con los condrocitos 20 incluidos en la misma después de una incubación de tres días. La viga 30 en el borde derecho inferior de la imagen corresponde a una longitud de 100 µm. Las células muertas que aparecen en rojo en el microscopio de fluorescencia, están marcadas por flechas. En la figura es claramente reconocible que la parte predominante de las células es aún vital en el gel de gelatina después de tres días. Resultados similares se encontraron después de cinco o siete días.

[0146] Este resultado indica que el gel de gelatina formado a partir de la composición según la invención está en posición de funcionar como matriz que favorece el crecimiento celular de células de mamífero.

15 Ejemplo 9 Inclusión de condrocitos humanos en un gel de gelatina reticulado con transglutaminasa

[0147] En este ejemplo se examinó el efecto del gel de gelatina reticulado referente al comportamiento de crecimiento de condrocitos humanos. Al mismo tiempo fueron comprobadas las diferentes concentraciones de gelatina con una concentración invariable del agente reticulante transglutaminasa.

20 [0148] Para cada una de las cinco fórmulas fueron precalentados 250 µl de una solución de la gelatina A del ejemplo 1 con la respectiva concentración según la siguiente tabla 9. Las soluciones fueron inoculadas cada vez en una cavidad de una placa de cultura celular de 48 pocillos con 250,000 condrocitos humanos y mezclados con 12,5 µl de una solución madre de transglutaminasa (30 U/ml) a una temperatura de 40° C y fueron incubadas durante una semana a una temperatura de 37° C. Para la comparación no se añadió transglutaminasa alguna en la fórmula 9-4 y en la fórmula 9-5 se utilizó un tampón en vez de una solución de gelatina. Los resultados están relacionados en la tabla 9.

25 Tabla 9

Fórmula	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5
Concentración de la gelatina	12,5 % en peso	4,2 % en peso	3,0 % en peso	12,5 % en peso	-
Transglutaminasa	+	+	+	-	+
Transglutaminasa por gramo de gelatina	19 U/g	57 U/g	80 U/g	-	-
Punto de gelificación	<1 min	aprox. 5 min	<10 min	-	-
Resultado colonización de células	3	2	1	2	4

30 [0149] Después de una semana de cultivo a una temperatura de 37° C las células fueron examinadas microscópicamente. Como resultado de la colonización celular fueron calificadas la densidad celular y la morfología de las células y valoradas según una escala de 1 a 6, estando 1 para una compatibilidad celular muy buena y 6 para una incompatibilidad celular del gel de gelatina reticulado.

[0150] El mejor resultado se logró con una concentración de gelatina de 3,0 % en peso (fórmula 9-3). Las células eran redondeadas, pequeñas y presentaban apenas una formación de vacuolas. Un aumento de la concentración a 4,3 o 12,5 % en peso (fórmulas 9-2 y 9-1) conducía tendencialmente a un decremento de la densidad celular en la matriz y al agrandamiento de las vacuolas.

35 [0151] También la solución de gelatina no reticulada utilizada en el ensayo comparativo (fórmula 9-4) era dañina no reconocible para los condrocitos, sin embargo conducía a una morfología marcada en forma de fibroblastos. La presencia de transglutaminasa sin gelatina (fórmula 9-5) dió lugar a una formación intensa de vacuolas de las células.

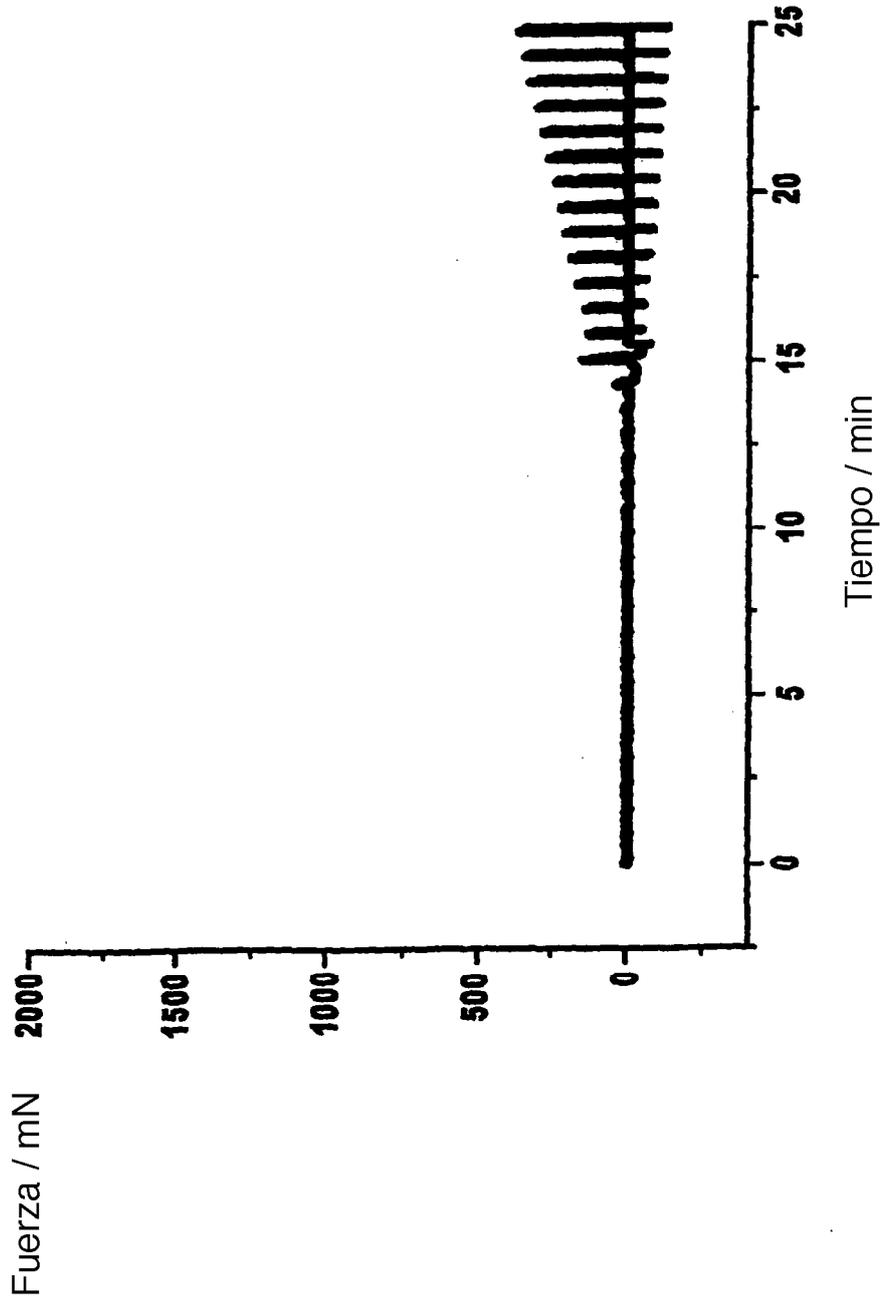
[0152] Este ensayo muestra que pueden ser realizadas buenas condiciones de crecimiento y sobrevivencia para células humanas por una selección adecuada de la concentración de la gelatina.

40

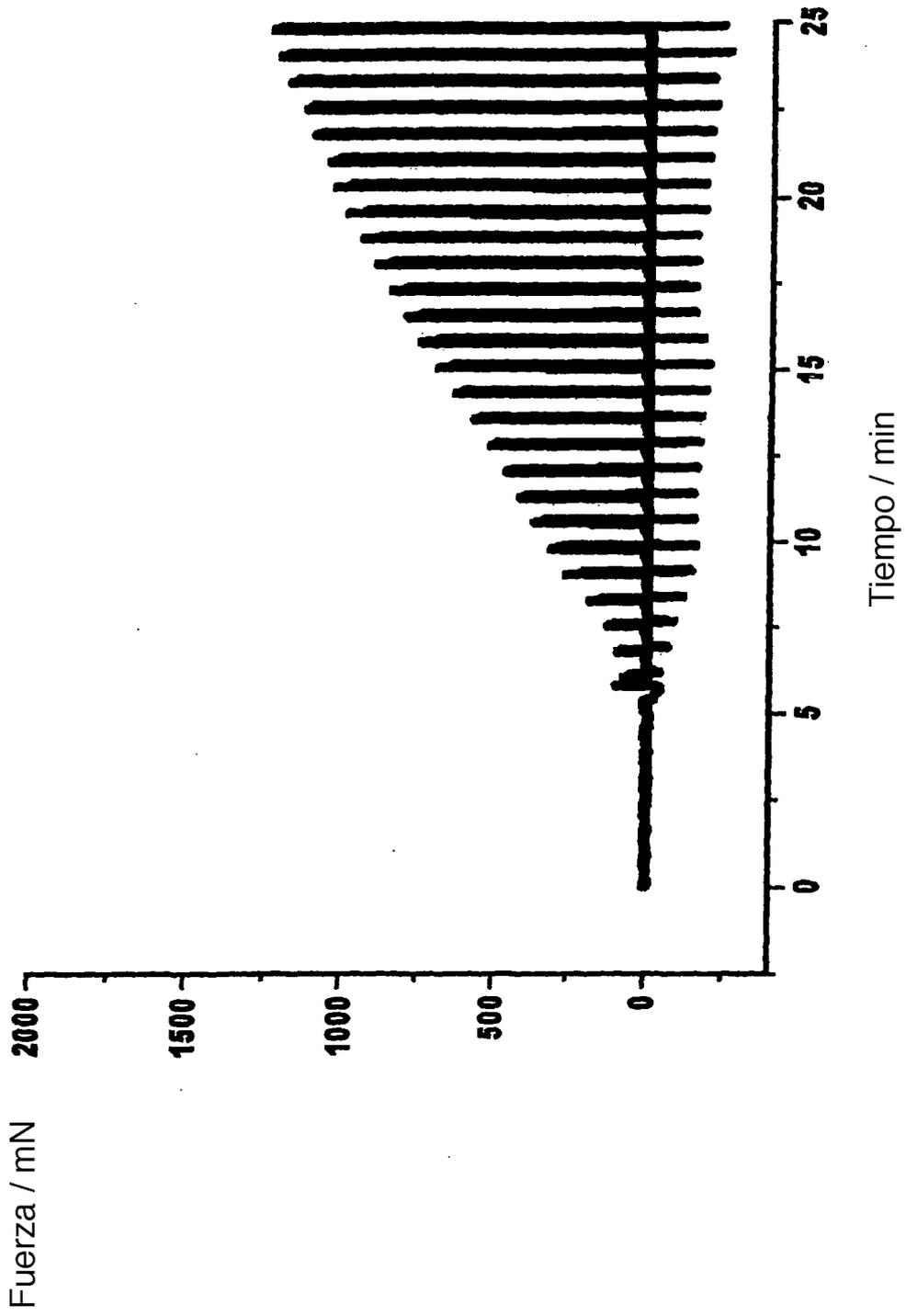
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de gelatina y transglutaminasa para la preparación de una composición terapéutica reticulante para el tratamiento de lesiones del disco intervertebral o del menisco, formando la composición un gel de gelatina reticulado como matriz celular en una zona meta del cuerpo humano o animal, donde
- 10 (i) la gelatina y la transglutaminasa son mezcladas entre sí para la formación de la composición terapéutica reticulante que se administra a continuación a la zona meta; o
- (ii) la gelatina y la transglutaminasa son preparadas en forma separada la una de la otra y administradas simultáneamente o consecutivamente en la zona meta bajo formación de la composición terapéutica reticulante,
- 15 siendo la zona meta el Nucleus pulposus y/o el Annulus fibrosus de un disco intervertebral o de un menisco, y comprendiendo la composición células del disco intervertebral, condrocitos y/o células madre mesenquimales.
2. Utilización según la reivindicación 1, donde la gelatina es una gelatina de pescado.
3. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, donde la composición según (i) es una solución acuosa que contiene la transglutaminasa y la gelatina disuelta.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 3, donde la solución acuosa se prepara por disolución de una mezcla de sustancias sólidas que comprende la gelatina y la transglutaminasa en forma liofilizada.
5. Utilización según la reivindicación 4, donde la gelatina se encuentra al menos principalmente en forma amorfa.
- 25 6. Utilización según la reivindicación 4 o 5, donde la transglutaminasa está contenida en una cantidad de 0,6 a 80 unidades por gramo de gelatina en la mezcla de sustancias sólidas.
7. Utilización según la reivindicación 6, donde la transglutaminasa está contenida en una cantidad de 5 a 40 unidades por gramo de gelatina en la mezcla de sustancias sólidas.
- 30 8. Utilización según la reivindicación 1 o 2, donde la preparación según (ii) tiene lugar en forma de una solución acuosa de gelatina y una solución acuosa separada de transglutaminasa.
- 35 9. Utilización según la reivindicación 8, donde la administración simultánea de la solución de gelatina y de transglutaminasa tiene lugar por inyección con un dispositivo aplicador de cámaras múltiples.
10. Utilización según la reivindicación 1 o 2, donde la preparación según (ii) tiene lugar en forma de una solución acuosa de gelatina y de la transglutaminasa en forma sólida.
- 40 11. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración de gelatina en la composición es de 5 a 20 % en peso.
12. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, donde el gel de gelatina reticulado que forma la matriz celular presenta una resistencia del gel de 100 g o más, medido con un pistón de un diámetro de 12,7 mm a una profundidad de penetración de 4 mm.
- 45 13. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en la cual la gelatina es parcialmente reticulada antes de la mezcla y/o la administración según (i) o (ii).
- 50 14. Utilización según la reivindicación 13, donde la gelatina es parcialmente reticulada bajo utilización de transglutaminasa.
15. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende factores de crecimiento, factores de diferenciación, sustancias antiinflamatorias y/o sustancias con efecto antibiótico.
- 55 16. Mezcla de sustancia sólida que comprende gelatina y transglutaminasa en forma liofilizada.

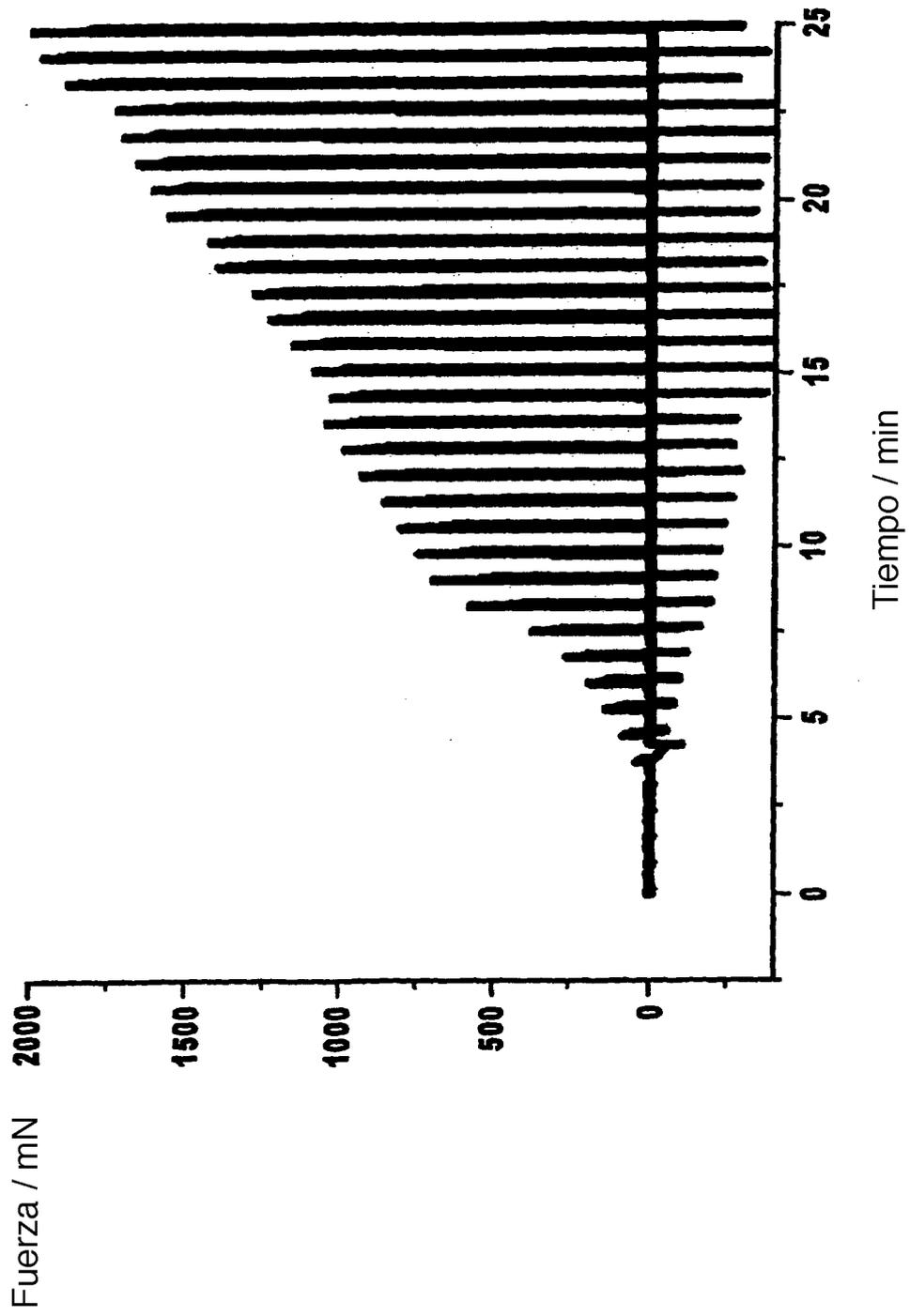
**FIG.1A**



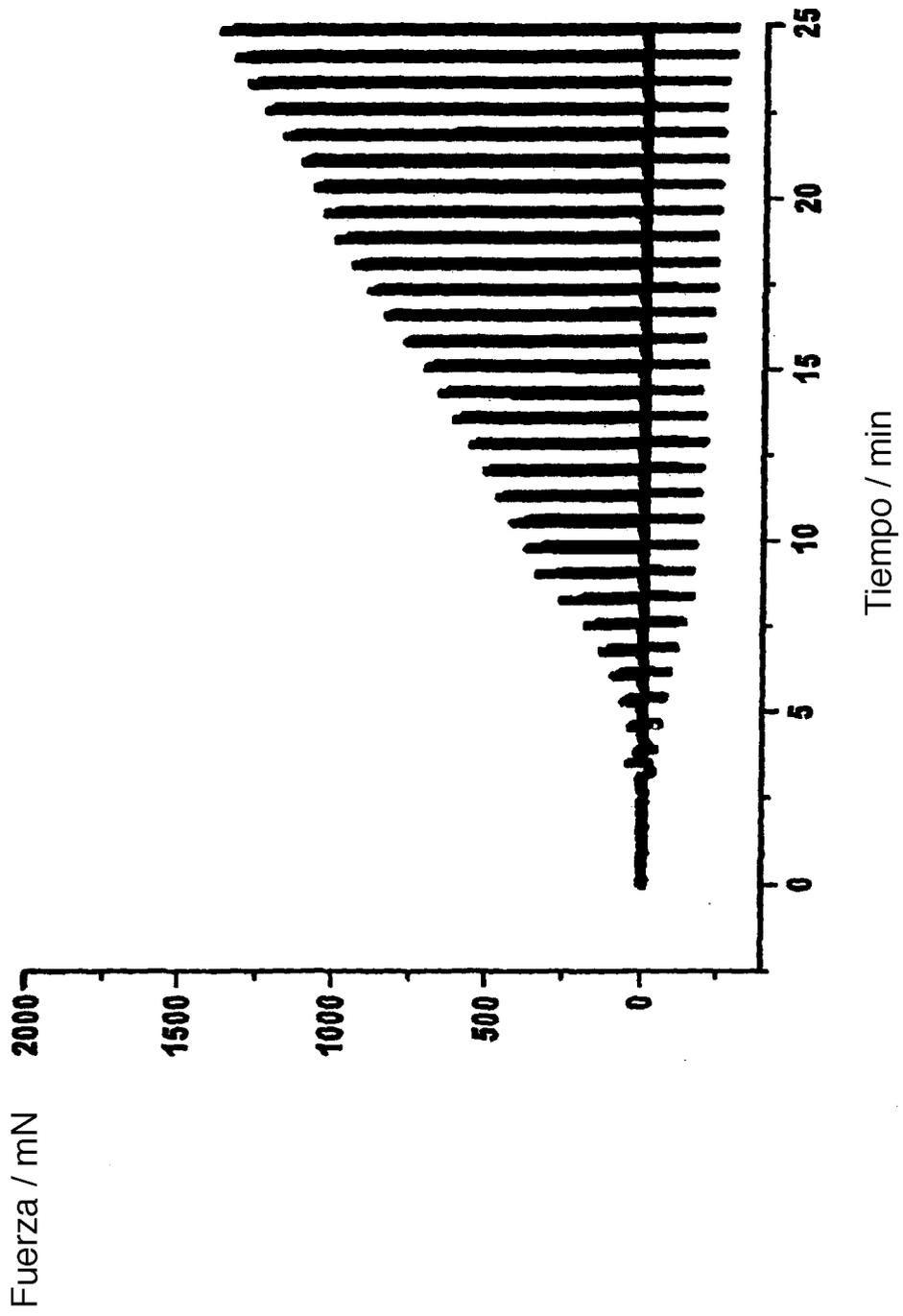
**FIG.1B**



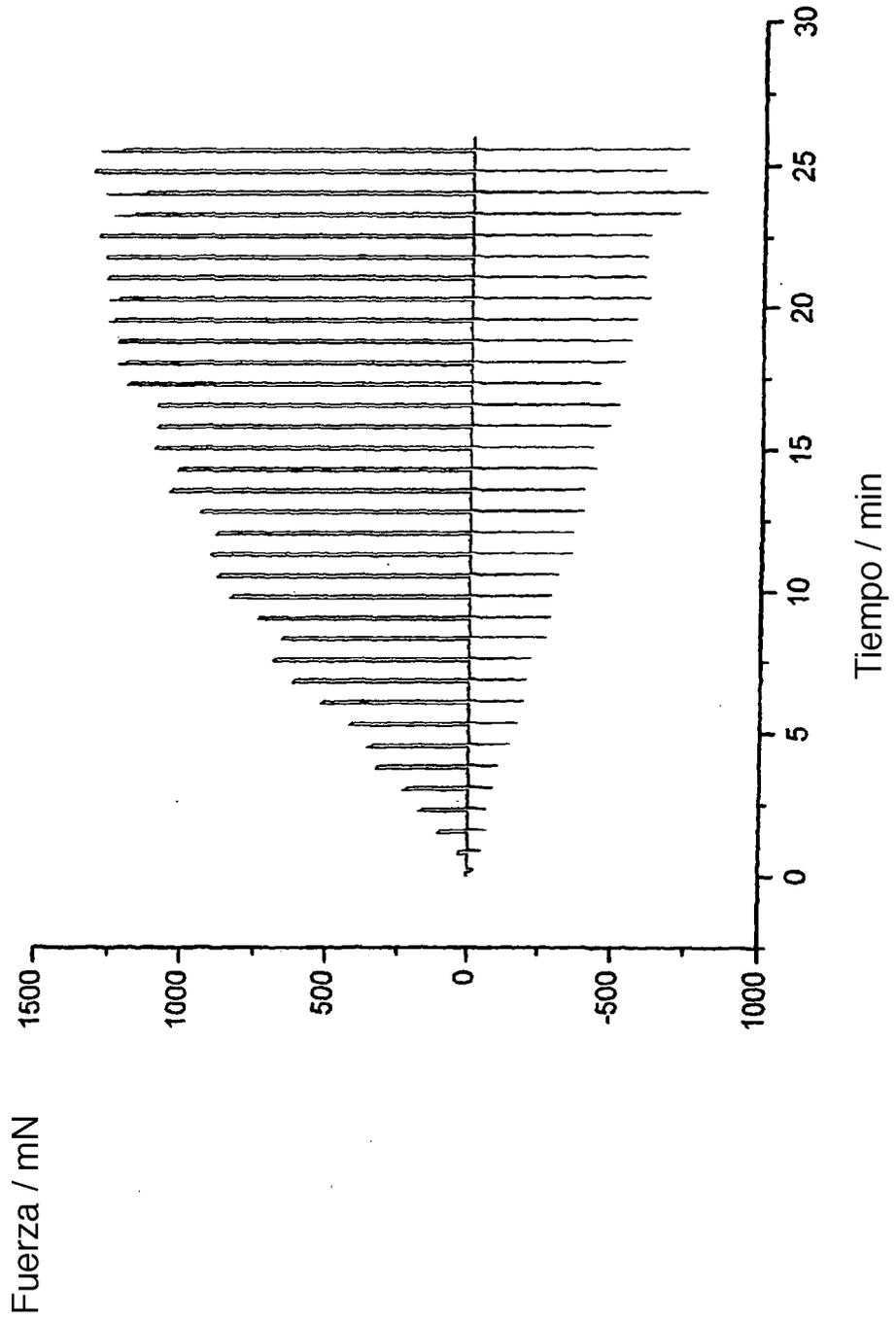
**FIG.1C**



**FIG.1D**



**FIG.1E**



**FIG.2**

