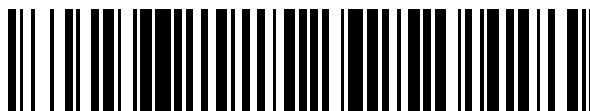


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 304**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61B 19/00 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61F 2/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2005 E 05770736 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2011 EP 1819290**

54 Título: **Constructos sin soporte para ingeniería de tejido de cartílago articular**

30 Prioridad:

09.07.2004 US 586862 P

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

23.08.2013

73 Titular/es:

**WILLIAM MARSH RICE UNIVERSITY (100.0%)
6100 Main Street
Houston, TX 77005, US**

72 Inventor/es:

**ATHANASIOU, KYRIACOS A. y
HU, JERRY C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 420 304 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

5 [0001] La presente solicitud se refiere a la ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos es un área de intenso esfuerzo hoy en el campo de las ciencias biomedicas. Se ha demostrado que la unión, extensión y replicación celular in Vitro ocurren en varios sustratos, y la formación de masas de tejido sólido ha sido demostrada para tejidos tales como cartílago. La mayoría de los métodos para preparar constructos cartilaginosos se dirige hacia el uso de varios soportes como portadores celulares. Normalmente, los condrocitos sembrados migran del soporte al fondo del recipiente o pocillo para cultivo de tejido, incluso si las placas no son tratadas para promover la adhesión celular. Normalmente, las células en placas no tratadas para tejido aún se unirán eventualmente. Dentro de una semana de cultivo, las proteínas hechas por los condrocitos o suministradas en el medio normalmente se han adsorbido por el fondo de los pocillos para promover la unión. Los resultados son una reducción en el tamaño del constructo. Otro inconveniente es que las células unidas tienden a aplanarse y cambiar a un diferente fenotipo. Esas células compiten con los condrocitos restantes por los nutrientes y no producen las proteínas deseadas de matriz extracelular para la regeneración del cartílago.

15 [0002] Ciertas técnicas de cultivo han sido investigadas para producir cartílago, incluyendo cultivo pellet^{1,2,3} y cultivo agregado. 3 En "cultivo pellet," condrocitos aislados fueron primero centrifugados en pellets. Tras un par de días de cultivo en los tubos de centrifugado (para permitir agregarse a la masa de las células), estos pellets fueron entonces transferidos sobre varias superficies, incluyendo hidrogeles, o dejados en los tubos centrifugos para cultivo. En "cultivo agregado", una baja densidad de células por superficie de área fue mantenida en placas con seis pocillos cubiertos con hidrogel con o sin turbulencia suave. Una suspensión celular cultivada en estas placas cubiertas con hidrogel forma agregados dentro de las primeras 72 h de cultivo.³ Los agregados resultantes fueron entonces cultivados en pocillos cubiertos con hidrogel. Otras técnicas de cultivo implicando agarosa incluyen la encapsulación celular, 4 en la cual los condrocitos son mezclados dentro de agarosa fundida para resultar en un constructo que contiene agarosa por todos lados. Permanece una necesidad de un forma adecuada de producir constructos de tejido de cartílago que mantenga la apariencia y las características de los condrocitos normales.

25 [0003] Cultivos de condrocitos de pollo son revelados por: TACCHETTI C ET AL: "In vitro morphogenesis of chick embryo hypertrophic cartilage." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 105, no. 2. 1 August 1987 (1987-08-01), pages 999-1006, ISSN: 0021-9525; y TURNEY J ET AL: "Changes in the expression of annexin A5 gene during in vitro chondrocyte differentiation: influence of cell adjuntarment." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 84, no. 1, 2002, pages 132-142, ISSN: 0730-2312.

30 [0004] Condrocitos humanos son revelados por: SABBATINI A ET AL: "Use of human chondrocyte cell cultures to identify and characterize reactive antibodies in arthritis sera." CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, vol. 21, no. 5, September 2003 (2003-09), pages 587-592, ISSN: 0392-856X.

35 [0005] La presente incención busca superar algunos de los inconvenientes inherentes en el estado de la técnica proporcionando métodos para usar en el cultivo de condrocitos para formar constructos que contengan porcentajes mayores de células que retienen el fenotipo condrocítico. Otro aspecto de la presente invención se refiere a los constructos producidos mediante tejido útiles para formar neocartilago conteniendo composiciones para una variedad de fines in vivo e in vitro. Otro aspecto más de la invención se refiere a métodos para tratar individuos con necesidad de crecimiento de cartilago articular. Estos y otros objetos pueden ser logrados por el proceso como se define en las reivindicaciones independientes. Mejoras adicionales son definidas en las reivindicaciones dependientes.

40 [0006] De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, se proporciona un proceso para producir un constructo de cartilago articular producido por ingeniería de tejido el cual comprende: a) cubrir al menos una superficie de un recipiente de cultivo de tejido con un material adecuado que no es conduce a la unión celular (por ejemplo, un hidrogel); b) introducir sobre cada superficie cubierta con material una suspensión de condrocitos vivos en un medio de cultivo donde la suspensión comprende casi 1×10^6 o más condrocitos vivos por cm^2 de la al menos una superficie cubierta con material; c) permitir que los condrocitos se sedimenten sobre el material de revestimiento para formar un agregado celular. Este proceso de agregación celular para resultar en un constructo, o un intermedio del mismo, es denominado el "Proceso de Auto Ensamblaje." El proceso además incluye d) cultivar el agregado para dar el constructo del cartilago, o intermedio del mismo. Para facilidad de referencia, los pasos del proceso son denotados como pasos a, b, c, etc. Un orden fijo de realización de los pasos no está necesariamente afectado por el orden en el cual los pasos son listados, sin embargo. En algunas realizaciones, el paso a) incluye cubrir una o más superficies del recipiente de cultivo con el hidrogel. Alternativamente, el recipiente de cultivo (por ejemplo, una pluralidad de pocillos) es extraída de un molde de hidrogel, o se usa un hidrogel para formar uno o más pocillos o recipientes con cultivo celular. En algunas realizaciones, el paso d) da el intermedio, y el proceso también incluye e) sembrar el intermedio con los condrocitos vivos adicionales; y f) cultivar el intermedio sembrado para aumentar el grosor del constructo o intermedio del mismo en realizaciones preferidas, paso b) de un proceso arriba descrito incluye sembrar cada superficie cubierta con hidrogel con una suspensión conteniendo al menos 25×10^6 condrocitos vivos por cm^2 de superficie cubierta con hidrogel. En ciertas realizaciones, un proceso arriba descrito comprende seleccionar un hidrogel comprendiendo agarosa, alginato o polyHEMA. En algunas realizaciones ello comprende 0.5 - 4 % (p/v) agarosa, preferiblemente 2%.

5 **[0007]** También se proporciona de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente revelación una composición comprendiendo al menos un constructo producido por ingeniería de tejido sin soportes preparado por un proceso como se describe arriba, y comprendiendo una multiplicidad de condrocitos vivos diferenciados redondeados. En algunas realizaciones, el constructo comprende una periferia que es sustancialmente carecedora de condrocitos no fenotípicos. En realizaciones preferidas el constructo comprende condrocitos capaces de producir colágeno de tipo II. Algunas realizaciones proporcionan una composición en donde el constructo comprende un módulo de compresión de al menos un cuarto del tamaño del cartílago de codo bovino nativo. En algunas realizaciones, el módulo de compresión del constructo es al menos un tercio del cartílago de codo bovino nativo. Otra composición proporcionada por la presente revelación comprende un tapón bifásico incluyendo un componente óseo y un constructo de cartílago producido mediante ingeniería de tejido antes descrito.

[0008] Se revela un método para tratar a un individuo con necesidad de sustitución de cartílago articular. Este método comprende implantar en un sitio en el individuo donde el cartílago articular es deseado una composición que comprende al menos un constructo producido mediante ingeniería de tejido conteniendo una multiplicidad de condrocitos vivos redondeados diferenciados preparados por un proceso como se describe arriba.

15 **[0009]** La presente revelación también proporciona un método para tratar a un individuo con necesidad de sustitución de cartílago articular comprendiendo implantar en un sitio en el individuo donde el cartílago articular se desee una composición comprendiendo al menos un constructo producido mediante ingeniería de tejido comprendiendo una composición como se describe arriba.

20 **[0010]** Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la presente invención se harán patentes con referencia, a modo de ejemplo, a la siguiente descripción y dibujos.

Fig. 1 es una fotomicrografía mostrando una vista superior de discos de un constructo de cartílago con forma de bol de 12 mm preparado de acuerdo a una realización de la presente invención;

Fig. 2 es una fotomicrografía mostrando una vista lateral de los discos en la Fig. 1. Cada marca representa 1 mm;

25 Fig. 3 es una fotomicrografía de secciones de 14 μ m de discos teñidos con safranina-O/verde rápido, similar a los mostrados en la Fig. 1;

Fig. 4 es una fotomicrografía de secciones de 14 μ m teñidas para colágeno de tipo II, similar al mostrado en la Fig. 1;

30 Fig. 5 es un gráfico mostrando la correlación de valores de modelo agregado (HA) de cartílago articular nativo y constructos formados sobre agarosa a GAG/DW y para colágeno/DW. HA muestra una fuerte correlación positiva con colágeno/DW ($R^2 = 1.00$) y una fuerte correlación negativa con GAG/DW ($R^2 = 0.99$);

35 **[0011]** Un nuevo proceso para hacer un constructo comprendiendo condrocitos generalmente incluye tomar condrocitos aislados en suspensión, permitiendo que las células se sedimenten sobre una o más superficies de cultivo de tejido recubierto, en el que el recubrimiento comprende un material que no es conductor para unión celular y que no es tóxico y por el contrario adecuado para inclusión en un entorno de cultivo de tejido. Las células sedimentarias se agregan y crecen en constructos que contienen condrocitos redondeados y los cuales contienen colágeno y glucosaminoglucano en todos ellos. Como aquí se usa, un "constructo" o "constructo producido mediante ingeniería de tejido" se refiere a una masa tridimensional con longitud, anchura y grosor, y la cual comprende tejido mamífero vivo producido in vitro. El proceso de células agregándose para resultar en un constructo es denominado "Proceso de Auto Ensamblaje". Los nuevos constructos también demuestran propiedades mecánicas, tal como módulo de compresión, las cuales mejoran con el tiempo en cultivo. De este modo, el proceso descrito aquí forma cartílago articular in vitro sin el uso de soportes. La siguiente descripción es ofrecida a modo de ilustración.

Aislamiento y Sembrado del Condrocito.

45 **[0012]** Condrocitos articulares fueron aislados del fémur distal de terneros machos con una semana de edad (Research 87 Inc., Boston, MA), menos de 36 horas tras su matanza, con colagenasa tipo I (Worthington, NJ) en medio de cultivo. El medio era DMEM con 4.5 g/L-glucosa y Lglutamina (Biowhittaker), 10% de suero fetal bovino (Biowhittaker), fungizone (Biowhittaker), penicilina/estreptomina (Biowhittaker), aminoácidos no esenciales (Life Technologies), 0.4 mM prolina (productos químicos ACS), 10 mM HEPES (Científico Fisher), y 50 μ g/ml L-acido ascórbico (Acros Organics). Los condrocitos se congelaron en medio de cultivo suplementado con 20% de FBS y 10% de DMSO a -80°C durante dos semanas a un mes antes que las células de dos donantes de pierna fueran juntadas. Alternativamente, se usan células frescas. Debido a la capsula de junta, el cartílago articular existe en un estado "inmune privilegiado". Por esta razón, cartilagos articulares xenogénicos (por ejemplo, cartilago producidos a partir de células bovinas o porcinas) son opciones viables para la implantación en muchos ejemplos.

55 Alternativamente, si el constructo va a ser usado para sustitución de tejido in vivo, el origen de condrocitos articular es puede ser cartílago autólogo de una pequeña biopsia del propio tejido del paciente, siempre que el paciente tenga cartílago articular saludable que pueda ser usado como comienzo de una expansión in Vitro. Otra fuente adecuada

de condrocitos es condrocitos heterólogos de tejido de cartilago histocompatible obtenido a partir de un donante o linea celular.

Recubrimiento con Hidrogel de Placas de Pocillo.

5 [0013] Los fondos y lados de placas de 96 pocillos fueron recubiertos con 100 µA12% de agarosa (p/v), y las placas fueron sacudidas enérgicamente para retirar el exceso de agarosa. La superficie de área en el fondo del pocillo en una placa con 96 pocillos es 0.2 cm². Las placas enfriadas fueron entonces aclaradas con medio de cultivo antes de la introducción de las células. Mientras que 2% de agarosa es una concentración preferida, pueden ser obtenidos resultados aceptables con cualquier concentración de agarosa en el rango de cerca de 0.5% a cerca de 4%. El uso de concentraciones menores de agarosa ofrece la ventaja de costes reducidos; sin embargo, en concentraciones por debajo de 1% la agarosa no rigidiza lo suficiente para facilidad óptima de manejo. Una alternativa a las placas de pocillo es pocillos hechos completamente de agarosa.

15 [0014] Como una alternativa a la agarosa, puede ser usado otro tipo de hidrogel adecuado (por ejemplo, alginato y/o 30 PolyHEMA). Un "hidrogel" es un coloide en el cual las partículas están en la fase externa o de dispersión y el agua está en la fase interna o dispersada. Hidrogeles adecuados no son tóxicos para las células, no inducen unión de condrocito, permiten la difusión de nutrientes, no se degradan significativamente durante el cultivo, y son lo suficientemente firmes para ser manejados. Los resultados obtenidos usando agarosa son considerados representativos de resultados que serán obtenidos con otros hidrogeles adecuados.

Sedimentación del Condrocito.

20 [0015] Condrocitos articulares fueron descongelados en suspensión. Esta suspensión fue luego introducida dentro de los pocillos cubiertos con hidrogel en 5 x 10⁶ células por pocillo en 300 µl de medio de cultivo (5 x 10⁶ células/0.2 cm² superficie cubierta con hidrogel). Los condrocitos se sedimentaron y formaron una capa celular continua dentro de las 24 horas, a partir de cuyo momento fue cambiado diariamente 200 µl del medio. Tras un mes de cultivo, estos constructos de condrocitos fueron transferidos a placas con 48 pocillos cubiertas con hidrogel, con 1 ml de medio de cultivo. El área de cultivo cubierta con hidrogel de cada pocillo en las placas con 48 pocillos es de 0.95 cm². A partir de ese punto en adelante, 800 µl de medio de cultivo eran cambiados diariamente. El momento cero es definido como el día que los condrocitos fueron sembrados.

30 [0016] La suspensión celular fue directamente introducida en los pocillos cubiertos con hidrogel. Los condrocitos se sometieron a un Proceso de Auto Ensamblaje y fueron cultivados en estos pocillos. Los condrocitos se sedimentaron en un agregado dentro de 24 horas tras su sembrado. En t =4 semanas, el examen microscopico reveló que las células seguían siendo redondas dentro de los constructos producidos, indicando que el fenotipo condrocítico se mantenía. Las constructos mostraron un ligero rizo alrededor de todos los bordes, como un bol, y midieron aproximadamente 8 mm de diámetro cuando se aplanaron. El grosor de las constructos en ese momento era de unos 0.5 mm. En t = 7 semanas, las constructos habían crecido hasta más de 10 mm de diámetro cuando se aplanaban. El grosor del constructo es aproximadamente de 1.0 mm. Fig. 1 muestra un disco de 1 mm de grosor de diámetro de 6 mm por punzonado de un constructo de 12 mm con forma de bol. La Fig. 2 muestra el mismo disco visto desde el lateral. En estas fotografías, cada marca representa 1 mm.

Evaluación Histológica.

40 [0017] La evaluación histológica de una sección de 14 µm de disco teñido con safranina-O/verde rápido mostró glucosaminoglucano (Fig. 3) y una sección de 14 µm de colágeno tipo II teñida con IHC del disco reveló colágeno de tipo II (Fig. 4) por todo el constructo producido. Estas observaciones sugieren que las células condrocíticas del constructo mantienen sus funciones fenotípicas. Notablemente, se ha mostrado que la matriz extracelular producida in Vitro por condrocitos esféricos comprende colágeno de tipo II. Por el contrario, se ha mostrado también que los condrocitos aplanados no fenotípicos producen colágeno tipo I. Ya que el colágeno de tipo II es el tipo de colágeno predominante en el cartilago, el cultivo in Vitro de condrocitos puede incluir estimular las células para producir colágeno de tipo II.

Propiedad Mecánica.

50 [0018] "Módulo agregado" es una medida convencional usada al caracterizar cartilago. Dispositivos apropiados de medición son conocidos en la técnica.^{5,6} En estudios tempranos, pruebas mecánicas del agregado o constructo representativo dieron un módulo agregado de 4 kPa en 4 semanas tras su sembrado, aumentándose a aproximadamente 50 kPa en 7 semanas a partir del sembrado inicial del cultivo. Estos resultados son bastante significativos, porque sugieren que los constructos producidos en 7 semanas tienen considerable integridad estructural. Por ejemplo, este módulo agregado en 7 semanas es de aproximadamente un cuarto del cartilago de codo bovino nativo (casi 200 kPa). Estudios adicionales arrojarán a datos mecánicos presentados en la Tabla 1.

TABLA 1

Propiedades Mecánicas de Constructos Cultivados sobre el Sustrato de Agarosa y en Tejido Cultivado Plástico

(TCP)*

	HA (kPa)	K (10^{-10} m ⁴ Ns)	v	
5				
	Semana 4, sobre agarosa	19± 3	17± 6	0.23±0.08
	Semana 8, sobre agarosa	43±13	40±21	0.11±0.08
	Semana 12, sobre agarosa	53±9	22±24	0.03±0.05
10	Semana 4, sobre TCP	13±4	24±10	0.22±0.11
	Semana 8, sobre TCP	19±3	33±21	0.07±0.09
	Cartílago Articular	139±41	42±28	0.01±0.01

*Los datos son mostrados como desviación media estándar

15 Como se muestra por la Tabla 1, los constructos formados sobre agarosa usando el Proceso de Auto Ensamblaje tienen mejores propiedades mecánicas que aquellos formados sobre TCP.

20 **[0019]** Se observó que los constructos continuaron incrementando las propiedades mecánicas hasta al menos 12 semanas. Además de aumentar las propiedades mecánicas, el contenido bioquímico de los constructos también tendía hacia el tejido nativo (Fig. 5). La Fig. 5 muestra que desde la semana 4 hasta la semana 12, las correlaciones entre las propiedades mecánicas del constructo (eje y) y las propiedades bioquímicas (eje x) son relaciones lineales. Además, la relación entre las propiedades mecánicas y bioquímicas del tejido nativo caen en la misma tendencia. Las propiedades mecánicas del constructo pueden alcanzar finalmente las del tejido nativo al que se dan periodos más largos de cultivo o aplicación de estímulos bioquímicos/biomecánicos.

25 **[0020]** Los métodos aquí descritos evitan algunas de las consecuencias indeseadas de la unión celular a un soporte u otra superficie, en las cuales el soporte o superficie está diseñado para promover la unión celular. Desventajas comunes presentadas por previos métodos de cultivo celular son listadas en la Tabla 2. En el presente caso, la unión no es deseable ya que el uso más eficiente de condrocitos emplea el mayor porcentaje de células redondeadas. En el ejemplo representativo arriba, una suspensión celular es directamente introducida dentro de pocillos cubiertos por hidrogel. Los condrocitos se agrupan lentamente en un agregado y son cultivados en estos pocillos. Al cubrir los pocillos con un hidrogel, los condrocitos permanecen redondeados y diferenciados. Los nutrientes son capaces de difundirse desde el hidrogel en el fondo de los constructos, a diferencia de cultivos en los cuales el constructo está en contacto con una superficie plástica. Los constructos de tejido resultantes serán empleados ventajosamente para sustitución de tejidos así como para uso como sustitutos de tejido para cultivo celular y en construcción de prótesis. A diferencia de los métodos de ingeniería de tejido que emplean soportes, no se forma una cápsula gruesa (por ejemplo, decenas de micras) de células aplanadas alrededor de los presentes constructos sin soportes. Ciertas ventajas del presente proceso de auto-ensamblaje son listadas en la Tabla 2 y son contrastadas con inconvenientes comunes de procesos convencionales.

TABLA 2

Comparación del Uso de Soporte para Proceso de Auto Ensamblaje

	Posibles Problemas de Soporte	Soluciones de auto ensamblaje
1.	Procesos de sembrado estresante tales como procesos reticulantes (activadores de polimerización tóxicos o UV) y cizallamiento inestable de recipiente.	Ninguna tensión extra de sembrado.
2.	Perdida del fenotipo asociado con algunos soportes sólidos.	El fenotipo muestra ser retenido en proceso de auto -ensamblaje.
3.	Inhibición de migración celular y comunicación célula a célula.	Las células están inicialmente en contacto directo entre sí.
4.	Blindaje de tensión de las células en mecanotransducción.	La totalidad de neot tejido es expuesta a estímulos mecánicos.
5.	Soporte obstruye el crecimiento celular y remodelación de ECM.	Producción / remodelación sin obstrucciones de ECM.
6.	Productos tóxicos de degradación.	No productos de degradación.
7.	Respuesta inflamatoria hacia el soporte.	No soporte para que el cuerpo reaccione a ello.
8.	Invasión de otros tipos de célula dentro del soporte.	Las células forman constructo cohesivo que no tiene espacio para otras células.

5 Para restaurar la función para un defecto articular lo mejor es evitar introducir problemas adicionales, como a menudo ocurre con constructos existentes basados en soporte (Tabla 2). Otras técnicas que confían en el uso de condrocitos encapsulados en agarosa⁴ pueden encontrar problemas en un momento dado tales como la persistencia de que el remodelamiento del biomaterial o matriz sea estorbado por el biomaterial. Por el contrario, los presentes métodos emplean como soporte externo una capa o sustrato de un material que no es conductivo para la adhesión celular a la superficie cubierta. De este modo, el material cubriendo la superficie o capa de apoyo es fácilmente retirado del constructo cultivado (por ejemplo pelando la capa de hidrogel del constructo terminado). Otros procedimientos, utilizando encapsulación de agarosa, sufren una desventaja cuando intentan liberar el constructo de la agarosa. Este problema sucede debido al hecho que los condrocitos, y así el tejido formado, son encapsulados en la agarosa. Como consecuencia, la agarosa se integra bien dentro del constructo resultante de tal modo que la agarosa no puede ya ser eliminada. No es esperable que tales constructos, conteniendo agarosa embebida, sean satisfactorios para la implantación in Vitro.

10 **[0021]** En los anteriores ejemplos, los condrocitos eran cultivados en placas con 96 pocillos, Sin embargo, los condrocitos se comportarán de manera similar sin distinción del tamaño del pocillo. El recubrimiento de hidrogel y una densidad celular suficiente para sembrado siendo los factores más importantes. Dependiendo del tamaño de las células (por ejemplo, las células de diferentes especies, zonas, y números de paso pueden variar en tamaño), menos de aproximadamente 1 millón de células por cm² de superficie de hidrogel no lograrán cubrir toda la superficie con al menos una capa de células, y por tanto tenderán a resultar en agregados que no son continuos. De este modo, cuando son sembradas demasiadas pocas células, las células no forman una lámina continua de cartílago. Puede usarse sembrar más que los arriba descritos 25 x 10⁶ condrocitos por cm² de superficie cubierta con hidrogel para producir constructos que sean más gruesos. Para producir una prótesis o un sustituto de tejido para cultivo celular, el proceso arriba descrito puede ser escalado simplemente cubriendo placas Petri con hidrogeles y sembrando el número apropiado de células. Los tapones pueden ser luego perforados de la lámina de neo-tejido que formarán. Una placa Petri de 10 cm de diámetro dará 78.5 cm² de neo-tejido, suficiente para recubrir casi la mitad de una rodilla adulta, con 10²-10³ cm².(7)

5 **[0022]** Pueden ser también producidos constructos con un componente "óseo" para dar como resultado un tapón bifásico que será fácilmente transplantado en áreas enfermas. Los constructos producidos mediante ingeniería de tejido preparados como aquí se describe pueden ser usados en dispositivos protésicos para la reparación o sustitución de cartilago dañado, tal como cartilago de junta articular. Las técnicas usadas para implantar las constructos cartilaginosos formados serán similares a las ahora usadas para procedimientos de artroplastia. Constructos cartilaginosos preparados como se describe aquí pueden tambien encontrar uso como sustituto de tejido para cultivo celular.

10 **[0023]** Sin más elaboración, se cree que un entendido en la materia puede, usando la descripción realizada, utilizar la presente invención en su plena extensión. Las realizaciones anteriores deben entenderse como ilustrativas, y no como limitativas de nada de la descripción.

Referencias

[0024]

1. Graff RD, Kelley SS, Lee GM. Role of pericellular matrix in development of a mechanically functional neocartilage. *Biotechnol Bioeng*, 2003 May 20; 82(4): 457-64.
- 15 2. Malda J, Krejiveld E, Temenoff JS, et al. Expansion of human nasal condrocitos on 30 macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials*, 2003 Dec; 24(28): 5153-61.
3. Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, and Macleod IN. Phenotypic stability of articular condrocitos in vitro: The effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and suero supplementation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000 Jan; 15(1): 166-7.
- 20 4. Mauck, RL, et al., The role of cell sembrandodensity and nutrient supply for cartilago articular tejido ingenieria with deformational loading. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. 11(12): p. 879-90.
5. Athanasiou, KA, Agarwal, A, and Dzida, FJ, Comparative study of the intrinsic mechanical properties of the human acetabular and femoral head cartilage. *J Orthop Res*, 1994. 12(3): p. 340-9.
- 25 6. Mow, VC, et al., Biphasic creep and stress relaxation of cartilago articular in compression. Theory and experiments. *J Biomech Eng*, 1980.102(1): p. 73-84.
7. Eckstein F, Winzheimer M, Hohe J, et al.. Interindividual variability and correlation among morphological parameters of knee joint cartilage placas: analysis with three-dimensional MR imaging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001 Feb; 9(2): 101-11.

30 **[0025]** Los presentes constructos producidos mediante tejido conteniendo condrocitos vivos producidos pueden ser usados para una variedad de propósitos in vivo e in Vitro. Ademas de usar las constructos producidas mediante tejido como dispositivos protésicos para la reparación y la sustitución de cartilago dañado, tal como constructos producidos mediante tejido de cartilago de junta articular, pueden tambien servir como sistemas de suministro in vivo para proteínas u otras moléculas segregadas por las células del constructo. Otro uso más de los constructos producidas mediante ingeniería de tejido como un modelo in Vitro de función de tejido o como un sistema modelo para probar los efectos de un tratamiento o medicamento de interés. También se espera que los métodos de cultivo de hidrogel arriba descritos serán aplicables a tipos de célula distintos a condrocitos articulares.

35

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un constructo de cartílago articular producido mediante ingeniería de tejido comprendiendo:
- 5 a) recubrir al menos una superficie de un recipiente de cultivo de tejido con un material de recubrimiento que no es conductivo para unión celular;
- b) introducir sobre dicha al menos una superficie recubierta de material una suspensión de condrocitos vivos en medio de cultivo, en donde la suspensión comprende 1×10^6 o más condrocitos vivos por cm^2 de la al menos una superficie cubierta por material;
- 10 c) permitir a los condrocitos sedimentarse en dicho recubrimiento para formar un agregado celular inicial a través de un proceso de auto ensamblaje; y
- d) cultivar dicho agregado inicial para dar un constructo de cartílago sin soportes, o un intermedio del mismo.
2. Un proceso para producir un constructo de cartílago articular producido mediante ingeniería de tejido comprendiendo:
- 15 a) formar una pluralidad de pocillos de cultivo de tejido de un material polimerico que no es conductivo para la unión celular;
- b) introducir sobre dichos pocillos una suspensión de condrocitos vivos en medio de cultivo, en donde la suspensión comprende 1×10^6 o más condrocitos vivos por cm^2 de la superficie del pocillo;
- 20 c) permitir a los condrocitos sedimentarse en dichos pocillos para formar un agregado celular inicial a través de un proceso de auto ensamblaje; y
- d) cultivar dicho agregado inicial para dar un constructo de cartílago sin soportes, o un intermedio del mismo.
3. El proceso de la Reivindicación 1 o 2, en donde el paso d) da dicho intermedio, y dicho proceso comprende
- e) sembrando dicho intermedio con condrocitos vivos adicionales; y
- 25 f) cultivar dicho intermedio sembrado para aumentar el grosor de dicho constructo o intermedio del mismo.
4. El proceso de acuerdo a una de las Reivindicaciones precedentes, en donde el paso b) comprende sembrar cada dicha superficie cubierta por material con una suspensión comprendiendo al menos 25×10^6 o más condrocitos vivos por cm^2 de área cubierta por material.
5. El proceso de acuerdo a una de las Reivindicaciones precedentes, donde dicho material comprende un hidrogel.
- 30 6. El proceso de la Reivindicación 5 en donde dicho hidrogel es elegido del grupo formado por agarosa, alginato y polyHEMA.
7. El proceso de la Reivindicación 6 en donde dicho hidrogel comprende 0.5 - 4 % (p/v) de agarosa.
8. El proceso de la Reivindicación 7 en donde dicho hidrogel comprende 2% (p/v) de agarosa
9. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a la 8 además comprendiendo el paso de formar un tapón bifásico comprendiendo un componente oseo y el constructo de cartílago sin soportes.
- 35 10. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a la 8 además comprendiendo el paso de usar el constructo de cartílago sin soportes en formar un dispositivo protésico para la reparación o sustitución del cartílago dañado.
11. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a la 8 además comprendiendo el paso de perforar los tapones del constructo de cartílago sin soportes.

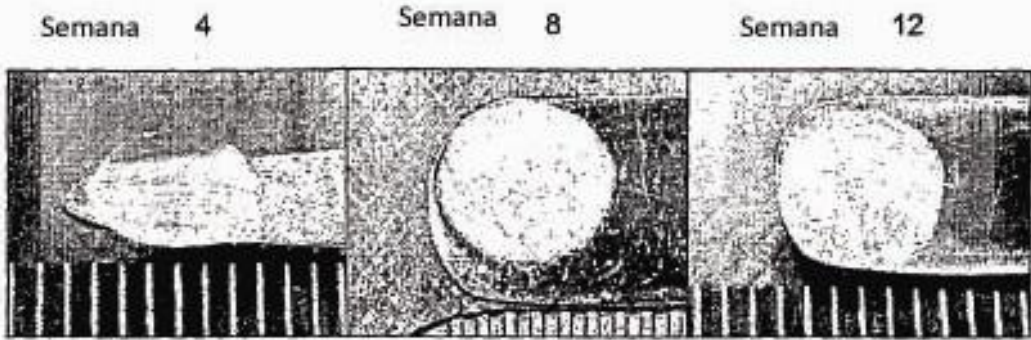


FIG. 1

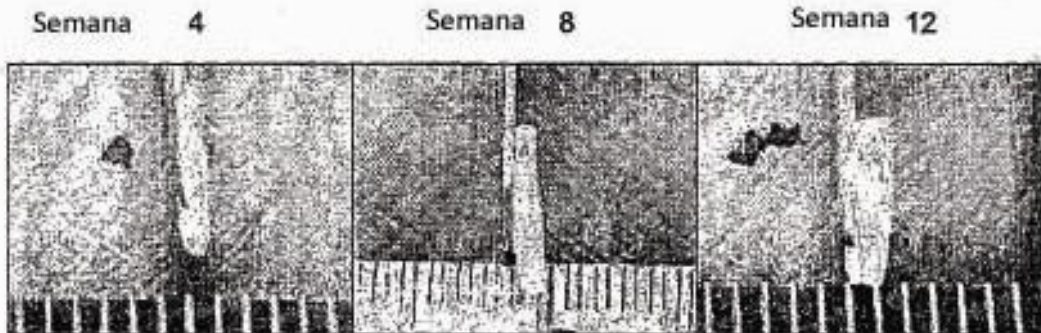


FIG. 2

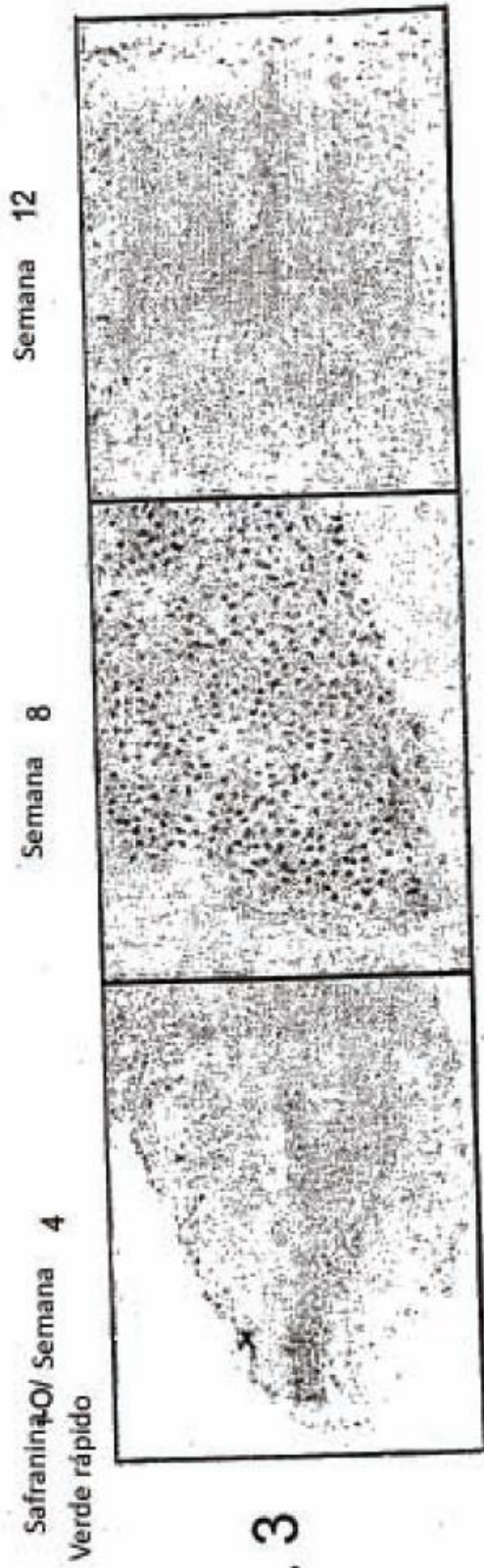


FIG. 3

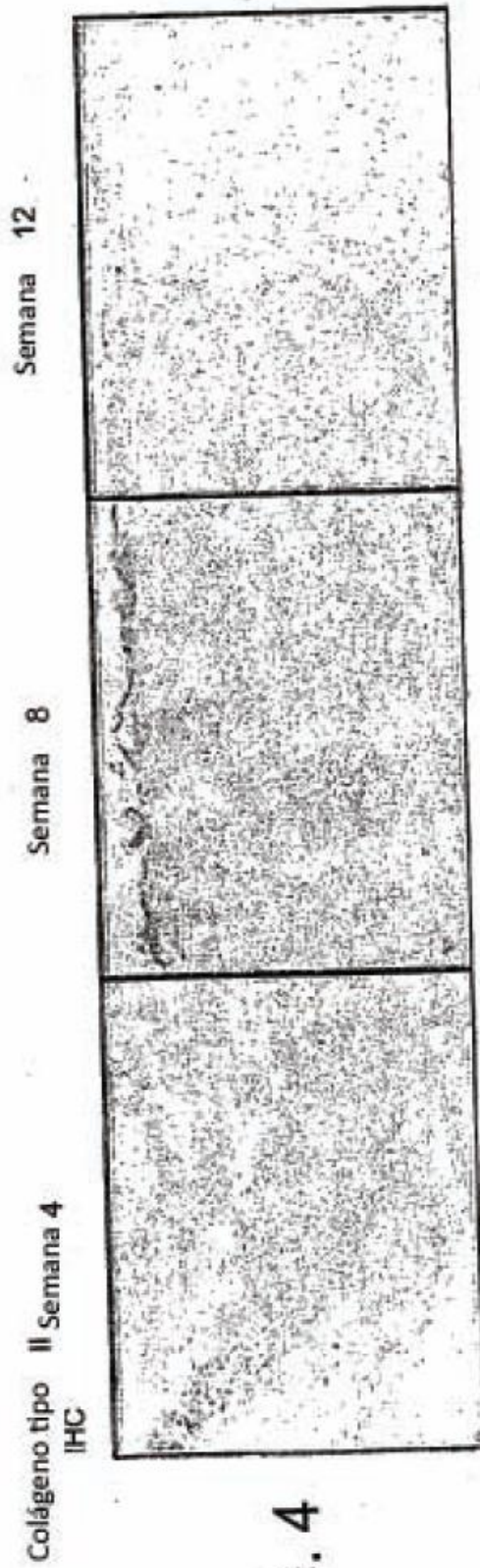


FIG. 4

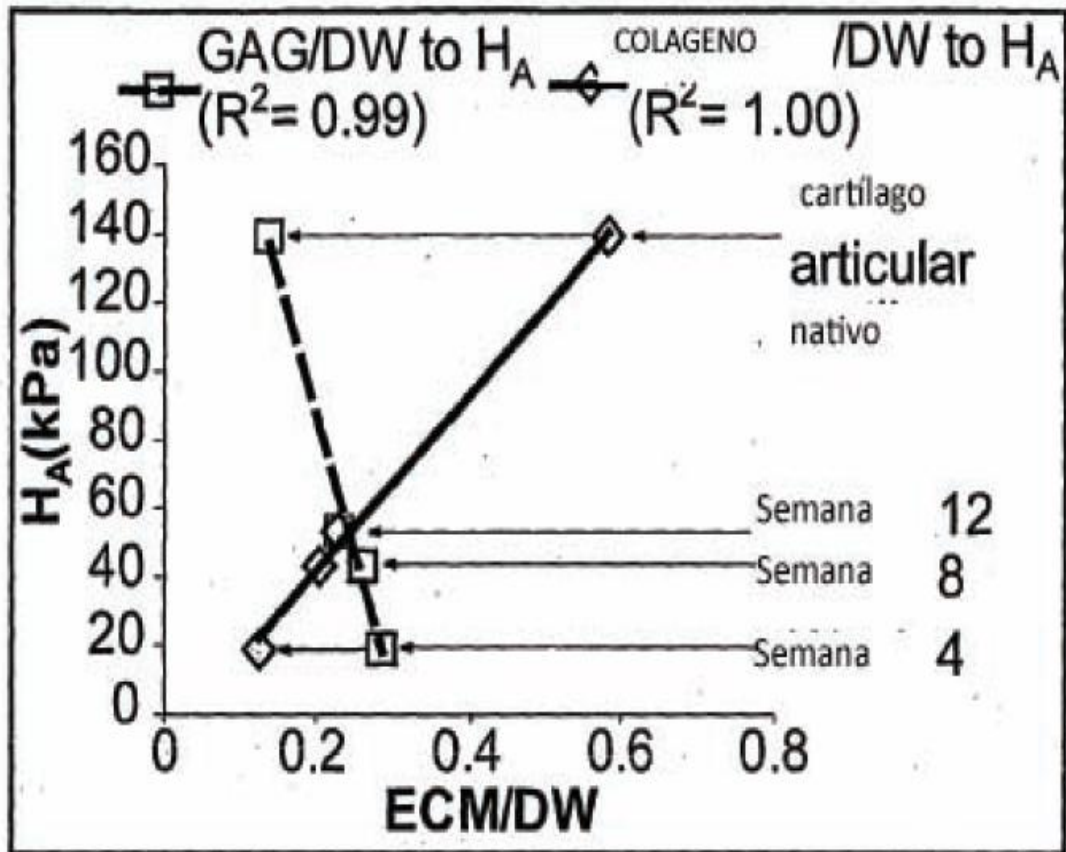


FIG. 5