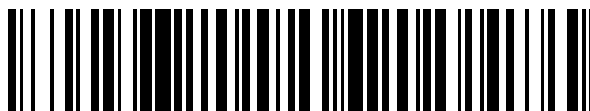


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 592**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/26** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011** **E 11703452 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014** **EP 2538987**

54 Título: **Cultivo celular en esferas de hidrogel con alginato de quitosano**

30 Prioridad:

**25.02.2010 EP 10154712**

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

**13.01.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LIÈGE (100.0%)  
Patent Department, Avenue Pré-Aily, 4  
4031 Angleur (Liege), BE**

72 Inventor/es:

**HENROTIN, YVES;  
KESTELOOT, FRÉDÉRIC y  
SANCHEZ, CHRISTELLE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 526 592 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**

Cultivo celular en esferas de hidrogel con alginato de quitosano

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a armazones para el cultivo de células formadoras de cartílago, más en concreto a condrocitos. La presente invención se refiere además a esferas celularizadas para la implantación. La presente invención se refiere además a métodos y herramientas para la reparación del cartílago.

10

**Antecedentes de la invención**

Las células formadoras de cartílago aisladas y expandidas se han utilizado para implantación desde hace varias décadas. La expansión in vitro para obtener una cantidad suficiente de células, sin embargo, puede dar lugar a células que, tras la implantación, tiene como resultado la muerte celular, tejido cicatrizal o células hiperdiferenciadas. Este es especialmente el caso de la reparación de cartílago, en la que el cultivo de condrocitos, tras la implantación, a menudo produce material fibroso o similar al hueso en lugar del cartílago hialino previsto.

15

Se han realizado intentos para cultivar células de condrocitos en una matriz tridimensional en la que se reproduce la matriz extracelular del cartílago. Se han usado diversos geles en los que se cultivan células. Por ejemplo, la técnica anterior divulga esferas con un núcleo de alginato y un recubrimiento de quitosano (Babister et al. (2008) Biomaterials 29, 58-65).

20

Los métodos para preparar esferas de hidrogel se pueden dividir en tres grupos. Un primer tipo se refiere a matrices porosas que están pobladas por células. En el presente documento, la matriz tiene un tamaño de poro grande para permitir la migración de las células al interior de la matriz. Li et al. (2008) J. Biomed. Mater. Res. A. 86, 552-559, describen un armazón poroso que contiene 2,4 % de alginato/2,4 % de quitosano que después se siembra con células.

25

A medida que las células migran desde el exterior al interior de la matriz, estas matrices a menudo tienen muchas células en las células externas y una cantidad baja de células en el interior.

30

En un segundo tipo de métodos, las células se mezclan con un constituyente de la matriz, tras lo cual se está formando la matriz. Bernstein et al. (2009) Biotechnol. Prog. 25, 1146-1152, describen métodos en los que se forman esferas con 2,5 % de alginato y 1,4 % de quitosano. El cartílago en el interior se describe como de baja calidad. En un tercer método, como se ilustra en el documento WO2007/135114, las células están encapsuladas en una solución gelificante obtenida de una solución acuosa de una mezcla de un polisacárido tal como alginato y un derivado oligosacárido de quitosano altamente ramificado. La solución acuosa se gelifica con agentes gelificantes con el objetivo de encapsular las células.

35

En cada tipo de los métodos, la elección del hidrogel tiene un fuerte impacto sobre el fenotipo de las células y después sobre la calidad del implante. En particular, en el hidrogel del documento WO2007/135114, el derivado oligosacárido de quitosano tiene un grado de derivación de al menos un 40 % y la mezcla polisacárida o la mezcla de alginato tiene una fuerza iónica que no es óptima para mantener las células vivas. Adicionalmente, esta matriz 3D no mantiene el fenotipo de los condrocitos estables, como se muestra mediante un incremento de proliferación celular y una disminución de la síntesis de agregano.

40

Existe la necesidad de mejoras adicionales en la selección del material de la matriz y en los métodos para producir implantes celularizados.

45

50

**Sumario de la invención**

Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos de producción de una matriz de hidrogel que comprende células formadoras de cartílago que comprenden las etapas de:

55

- proporcionar una solución de alginato,
- proporcionar una solución con quitosano que tiene un Pm inferior a 60 kDa,
- mezclar la solución de alginato y la solución de quitosano con células formadoras de cartílago, en la que la solución mixta comprende entre 0,5 y 0,7 % (p/v) de quitosano y entre 1 y 1,4 % de alginato (p/v).
- introducir gotas de la solución mixta en una solución con cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Sr}^{2+}$  y
- aislar las esferas gelificadas de la solución con cationes.

60

En determinadas realizaciones de métodos de la presente invención, las gotas de la solución mixta se introducen en una solución de iones  $\text{Sr}^{2+}$ .

65

En realizaciones concretas de este método, la solución mixta comprende 0,6 % de quitosano y o comprende 1,2 % de alginato.

5 En realizaciones concretas de métodos de la presente invención, la proporción entre alginato y quitosano en la solución mixta es de entre 1,4 y 2,8 o entre 1,75 y 2,25 o es de aproximadamente 2.

En realizaciones concretas de métodos de la presente invención, el quitosano tiene un Pm de entre 35 y 45 kDa y/o es de origen animal o, preferentemente, vegetal.

10 En otras realizaciones concretas de los métodos de la presente invención, el método comprende además la etapa de cultivar las esferas que comprenden células formadoras de cartílago en un medio de crecimiento. Dicho cultivo se puede realizar durante hasta 7, 14, 21 o incluso 28 días.

15 En otras realizaciones concretas de métodos de la presente invención, el medio de crecimiento comprende suero.

En otras realizaciones concretas de métodos de la presente invención, la formación de esferas se realiza pasando gotas a través de una aguja para obtener una partícula con un diámetro entre aproximadamente 0,2 y 5 mm.

20 En otras realizaciones concretas de los métodos de la presente invención, el método comprende además la etapa de mezclar las esferas cultivadas en un hidrogel termosensible. En el presente documento, la proporción entre las esferas y los hidrogeles está, por ejemplo, entre 5/1 y 1/1, o entre 4/1 y 2/1.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una esfera de hidrogel esférico que comprende una mezcla homogénea de quitosano y alginato y que además comprende células formadoras de cartílago, en el que dicha esfera se puede obtener mediante los métodos como se ha descrito anteriormente.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una esfera de hidrogel esférico con un diámetro entre 0,01 y 5 mm, que comprende una mezcla homogénea de quitosano y alginato y que además comprende células formadoras de cartílago dentro de la matriz, caracterizado por que la esfera comprende entre 1 y 1,4 % de alginato y entre 0,5 y 0,7 % de quitosano, por ejemplo, la esfera comprende 1,2 % de alginato, o, por ejemplo, la esfera comprende 0,6 % de quitosano.

35 En realizaciones concretas de esferas de la presente invención, la proporción de alginato/quitosano está entre 1,4 y 2,8, o entre 1,75 y 2,25, o entre 1,8 y 2,2.

En otras realizaciones concretas de esferas de la presente invención, el quitosano tiene un Pm entre 35 y 45 kDa.

40 En otras realizaciones concretas de esferas de la presente invención, las células formadoras de cartílago tienen una concentración de entre 50.000 o 60.000 a 100.000 o 150.000 células por esfera.

45 En otras realizaciones concretas de esferas de la presente invención, las células formadoras de cartílago, tras 21 días de cultivo, expresan menos de 0,5 pg de lactato deshidrogenasa (LDH) o las células formadoras de cartílago, tras 21 días de cultivo, expresan menos de 0,02 unidades de fosfatasa alcalina por ng de LDH, cuando crecen en presencia de suero.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a células formadoras de cartílago comprendidas en una esfera como se describe o produce como se ha descrito anteriormente para su uso en la reparación de los defectos de cartílago, tal como artrosis.

50 Ventajas de las esferas como se preparan en la presente invención y su uso:

55 En los métodos de trasplante de cartílago de la técnica anterior se recogen un número bajo de condrocitos autólogos de las biopsias de cartílago que proceden de áreas normales de cartílago y después se cultivan en monocapa para proliferación hasta que se obtiene un número óptico de células para injerto. Cuando se cultivan en monocapa, los condrocitos pierden de forma progresiva su fenotipo y no forman una matriz extracelular cartilaginosa y se convierten en fibroblastos que producen principalmente tejido cicatricial. Para evitar este procesote desdiferenciación o para estimular la rediferenciación celular tras el cultivo de monocapa, los condrocitos se pueden cultivar en una matriz tridimensional, tal como esferas de alginato. No obstante, en las esferas de alginato, los condrocitos sufren una diferenciación hipertrófica y mineralizan la matriz circundante. La diferenciación hipertrófica y la mineralización de la matriz son efectos indeseables asociados con la artrosis. La presente invención demuestra que, en contraste con los condrocitos cultivados en esferas de alginato, los condrocitos cultivados en esferas de quitosano/alginato no se diferencian en condrocitos hipertróficos. Las esferas que se usan de acuerdo con la presente invención estabilizan el fenotipo de los condrocitos. De hecho, tras varias semanas de cultivo en presencia de suero, por ejemplo 10 % de FBS (que es una condición que soporta la diferenciación hipertrófica de los condrocitos), los condrocitos cultivados en esferas de quitosano/alginato entre 21 y 28 días producen cantidades insignificantes de fosfatasa alcalina (AP), que es un marcador específico de la hipertrofia, en comparación con los

condrocitos cultivados en esferas de alginato (figura 4).

Los condrocitos cultivados en esferas de quitosano/alginato produjeron cantidades significativamente más altas de la molécula específica del cartílago agrecano, que los condrocitos en las esferas de alginato y significativamente menos factores proinflamatorios y catabólicos (estromelina-1). La mezcla de quitosano/alginato descrita en el presente documento previene la diferenciación hipertrófica de los condrocitos, como se ilustra mediante la disminución de la expresión de fosfatasa alcalina.

Este efecto concreto indica que las esferas de quitosano/alginato son potenciales vehículos para el trasplante de células y, en particular, para reparar tejidos, incluidos defectos del cartílago.

### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra una sección de una esfera de alginato (A) y una esfera de quitosano/alginato (B) [quitosano: trabéculas de color gris oscuro; alginato: fondo de color gris claro].

La **Figura 2** muestra con poco aumento (A) esferas de quitosano/alginato incluidas en un hidrogel de quitosano. A un aumento mayor (B) los condrocitos son visibles (indicados por flechas).

La **Figura 3** muestra la expresión de interleuquina-6 (IL-6) (representada como nanogramos de IL-6/por ng de lactato deshidrogenasa) a diferentes puntos de tiempo. Figura 3A: barra izquierda: células cultivadas en alginato de calcio; barra de en medio: células cultivadas en esferas de quitosano (20 kDa)/alginato de calcio; barra derecha: células cultivadas en esferas de quitosano (40 kDa)/alginato de calcio. (la proporción quitosano/alginato es 1/2). La Figura 3B muestra la producción de IL-6 en condrocitos tras 9 días de cultivo en alginato (izquierda) o esferas de quitosano/alginato (derecha) usando  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  o una mezcla de  $Ca^{2+}$  y  $Sr^{2+}$ .

La **Figura 4** muestra la expresión de fosfatasa alcalina (AP) en esferas de alginato (barras cerradas) y en esferas de 0,6 % de quitosano/1,2 % de alginato (barra abierta) [quitosano 40 kDa] en medios diferentes [ITS: medio que comprende insulina, transferrina y ácido selenioso; UG: Ultrosor G; FBS suero bovino fetal]. (las concentraciones de AP se presentan como unidades de fosfatasa alcalina/por ng de lactato deshidrogenasa). El panel A muestra los valores tras 21 días de cultivo, el panel B muestra los valores tras 28 días de cultivo.

La **Figura 5** muestra la expresión de agrecano (representada como nanogramos de agrecano/por ng de lactato deshidrogenasa). La Figura 5A muestra la expresión tras 13 días de cultivo en esferas de alginato (izquierda) quitosano (20 kDa)/esferas de alginato (en medio) y esferas de quitosano (40 kDa)/alginato (la proporción quitosano / alginato es 1/2).

La Figura 5B muestra la producción de agrecano en condrocitos tras 9 días de cultivo en alginato (izquierda) o esferas de quitosano/alginato (derecha) usando  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  o una mezcla de  $Ca^{2+}$  y  $Sr^{2+}$ . MC: matriz asociada a las células; FRM: matriz eliminada adicionalmente\*;

La **Figura 6** muestra la expresión de MMP-3 (representada como nanogramos de MMP-3/por ng de lactato deshidrogenasa) a diferentes puntos de tiempo. Barra izquierda: células cultivadas en alginato de calcio; barra de en medio: células cultivadas en esferas de quitosano (20 kDa)/alginato de calcio; barra derecha: células cultivadas en esferas de quitosano (40 kDa)/alginato de calcio. (proporción quitosano/alginato es 1/2).

La **Figura 7** muestra la implantación de un hidrogel de quitosano termosensible que comprende 0,6 % de quitosano/1,2 % de alginato.

La **Figura 8** muestra la evaluación histológica del implante 15 días después de la implantación.

A: hueso subcondral; B: hidrogel colonizado por células; C: esfera de quitosano/alginato colonizada por células; D: célula incluida en lagunas de quitosano.

### Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de una matriz de hidrogel que comprende células formadoras de cartílago. En este método, las células se incluyen en los constituyentes del gel tras la formación de la matriz de hidrogel. Este método incluye las etapas siguientes:

- proporcionar una solución de alginato,
- proporcionar una solución con quitosano de Pm inferior a 60 kDa,
- mezclar la solución de alginato y la solución de quitosano con células formadoras de cartílago, en la que la solución mixta comprende entre 0,5 y 0,7 % (p/v) de quitosano y entre 1 y 1,4 % de alginato,
- introducir gotas de la solución mixta en una solución con iones de  $Ca^{2+}$  o  $Sr^{2+}$
- aislar las esferas gelificadas de la solución con cationes.

El hidrogel que se obtiene mediante este método tiene como resultado una matriz homogénea de alginato de calcio y quitosano, en la que las células están distribuidas de igual forma a lo largo de la matriz.

La matriz como se obtiene en la presente invención difiere de las matrices de la técnica anterior que tienen un núcleo de un componente recubierto por una capa de otro componente.

La matriz como se obtiene en la presente invención tiene la ventaja de que la porosidad de la matriz puede definirse con más precisión en comparación con las matrices que se liofilizan primero para obtener un grado determinado de porosidad.

- 5 La matriz como se obtiene en la presente invención tiene la ventaja de estar compuesta por un quitosano de bajo peso molecular (inferior a 60 kDa) que forma espontáneamente una red homogénea en la matriz de alginato.

10 La matriz como se obtiene en la presente invención, en la que las células se incluyen en la matriz tras la gelificación, tiene la ventaja de que las células están distribuidas de forma homogénea por las esferas de la matriz. Las esferas porosas que se siembran después con las células normalmente crearán un gradiente de células de modo que el núcleo interior de la matriz contenga menos células que la cubierta exterior de las esferas. Esto a menudo tiene como resultado poblaciones celulares en las que las células en el núcleo tienen diferentes propiedades a las de las del exterior.

- 15 Como se indica en la sección de ejemplos, el alginato y el quitosano que se usan para preparar los hidrogeles se disuelven en tampones alcalinos o ácidos fuertes que tienen un efecto de esterilización. Esta es una ventaja adicional de la invención.

20 En los métodos de acuerdo con la presente invención, las soluciones de alginato y quitosano se pueden mezclar para obtener esferas con concentraciones diferentes. Realizaciones concretas de la presente invención se refieren a esferas en las que la composición, antes de la gelificación mediante iones de calcio o de estroncio, comprende 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75 o 0,80 % (p/v) de quitosano, e independientemente del mismo comprende 0,9, 0,95, 0,1, 0,105, 0,11, 0,115, 0,12, 0,125, 0,13, 0,135, 0,14, 0,145 o 1,5 % (p/v) de alginato. En realizaciones concretas, la concentración de quitosano varía de 0,5 a 0,7 % o de 0,55 a 0,65 %. En otras realizaciones concretas, la concentración de alginato varía de 1, a 1,4 % o de 1,25 a 1,35 %. Una realización concreta de hidrogel comprende aproximadamente 0,6 % de quitosano y aproximadamente 1,2 % de alginato.

25 Realizaciones adicionales de métodos y composiciones de la presente invención se refieren a composición de hidrogel y esferas obtenidas del mismo, en las que la proporción entre alginato y quitosano en la solución mixta está entre 1,4 y 2,8, más particularmente entre 1,5 y 2,7, más particularmente entre 1,6 y 2,6 o entre 1,75 y 2,25. Valores concretos de esta proporción son de aproximadamente 1,9, 1,95, 2,0, 2,05 y 1.

30 En los métodos de la presente invención, el tamaño promedio de las esferas se puede adaptar y determinar empíricamente mediante el ajuste del diámetro de la aguja que se usa para formar las gotas que se introducen en la solución de calcio o de estroncio. En el presente documento se conciben esferas con un diámetro entre 0,01 y 5 mm. Estas dimensiones proporcionan un compromiso entre la facilidad de manipulación y la difusión de los nutrientes en las esferas.

35 Los experimentos de la presente invención indican que las propiedades físicas del quitosano pueden contribuir al fenotipo de los condrocitos formadores de cartílago. El quitosano se ha aislado de diferentes fuentes animales, tales como crustáceos (cáscaras de gambas) o calamares. Como alternativa, el quitosano es de origen vegetal, más particularmente fúngico, tal como cepas de *Mucoralean*, *Mucor racemosus* y *Cunninghamella elegans*, *Gongronella bufleri*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus sajo-caju*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans* o *Agaricus bisporus*.

40 El quitosano existe además en diversos tipos de peso molecular. En el presente documento, la longitud de cadena del quitosano puede contribuir a la estructura tridimensional de los hidrogeles. Los quitosanos típicos, para su uso en la presente invención, tiene un peso molecular promedio inferior a 60 kDa, particularmente entre 15 y 50 kDa, más particularmente entre 35 y 45 kDa.

45 Las esferas que se producen de acuerdo con la presente invención comprenden células formadoras de cartílago y se cultivan para obtener la cantidad deseada de células para otros fines, tales como implantación. El periodo de cultivo puede depender de determinados factores, tales como el tipo celular y la concentración inicial en la esferas.

50 Las esferas de la presente invención se preparan junto con condrocitos, precursores de condrocitos, células madre mesenquimatosas formadoras de cartílago o células madre formadoras de cartílago o con mezclas de condrocitos y células madre o precursoras formadoras de cartílago.

55 Se ha encontrado que los condrocitos recién aislados se pueden cultivar en las esferas de la presente invención durante 7, 14, 21 o 28 días o incluso más tiempo mientras se mantiene su propiedad para generar el cartílago hialino tras la implantación.

60 El tiempo adecuado de cultivo para los otros tipos celulares mencionados anteriormente se determina experimentalmente tras el análisis de marcadores para la estabilidad de los condrocitos que se describen en la sección de ejemplos de la presente invención.

65

Las esferas de quitosano/alginate de la presente condición permiten el cultivo de células en condiciones que se describen como perjudiciales para el cultivo de condrocitos, más particularmente permiten el crecimiento de condrocitos en un medio que comprende 5, 10, 15 % (volumen de suero/volumen del medio de crecimiento) de suero de animales fetos o adultos, y supera el uso de medios sintéticos especializados para el cultivo de condrocitos.

El método de fabricación de las esferas como se ha descrito anteriormente tiene como resultado la formación de esferas de hidrogel esféricas que comprenden una mezcla homogénea de quitosano y alginate, y comprenden además células formadoras de cartílago que también se distribuyen homogéneamente en la matriz de una esfera.

En comparación con otros tipos de esferas celularizadas, la esfera de la presente invención se puede preparar de formas más reproducibles que las esferas que se liofilizan para proporcionar cavidades para la entrada y cultivo de células.

Las propiedades superiores de las células que se cultivan en esferas que se preparan de acuerdo con los métodos de la presente invención se demuestran mediante la expresión limitada de marcadores de muerte celular tales como lactato deshidrogenasa (LDH), la expresión limitada de los marcadores de inflamación, tales como interleuquinas, la expresión limitada de marcadores que son típicos de células formadoras de hueso, tales como fosfatasa alcalina y la expresión potenciada de marcadores de cartílago tale como agrecano (Figura 5). La expresión de marcadores que son relevantes para evaluar la estabilidad fenotípica de los condrocitos de ha determinado experimentalmente mediante cultivo de células en esferas de quitosano/alginate de la presente invención y en esferas de alginate, en presencia de suero. Adicionalmente se ha observado que el tipo de catión que se ha usado en la gelificación tiene un efecto sobre la expresión de al menos agrecano e interleuquina 6. En el presente documento, el uso de estroncio en lugar de calcio disminuye también la expresión de IL-6, un marcador de inflamación como el agrecano, un marcador para la producción de MEC.

En vista de las sorprendentes propiedades de las células formadoras de cartílago, cultivadas en esferas como se prepara en la presente invención, un aspecto de la invención se refiere a células formadoras de cartílago comprendidas en una esfera como se prepara en la presente invención para su uso en el tratamiento de los defectos de cartílago, más particularmente de la artrosis. Dependiendo del tipo de defecto de cartílago, las esferas se pueden implantar poco después de la formación de las esferas de forma que las células crecerán principalmente tras la implantación. Como alternativa, las esferas se implantan tras el cultivo in vitro durante varios días o semanas.

En realizaciones concretas, las esferas con condrocitos se formulan como un material de implante bifásico formado por esferas y gel. Este implante incluye una matriz polimérica ("hidrogel") y las esferas tridimensionales esféricas que comprenden quitosano y alginate en las células.

Esto permite formular un gel inyectable que tras la implantación garantiza una distribución óptima del espacio de las células (condrocitos u otros) en el tejido u órgano huésped. El gel inyectable que normalmente se usa en el presente documento es un gel termosensible. Estos geles permanecen líquidos a temperatura ambiente (en un dispositivo usado para introducir en el paciente), pero se convierten en un gel sólido tras la introducción en el cuerpo a aproximadamente 37 °C. Esta gelificación in situ mantiene las esferas (y las células en su interior) en su distribución espacial. En las pruebas in vitro se ha demostrado que las esferas que contienen células estaban distribuidas de forma homogénea en dicho hidrogel cuando se calientan a 37 °C. Ejemplos de hidrogeles termosensibles incluyen poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). Un tipo concreto del presente documento es quitosano.

Sin desear quedar ligado por teoría alguna, se cree que la red de quitosano dentro de las microesferas confiere propiedades mecánicas concretas en las esferas de forma que son menos comprimibles y más resistentes a la presión que las esferas hechas con solo alginate. Las matrices de la presente invención proporcionan trabéculas de quitosano interconectadas dentro de un gel de alginate, que tiene como resultado un ambiente que es favorable al cultivo celular proporcionando un medio acuoso con un pH neutro.

Dichas trabéculas se obtienen mediante quitosano insoluble que forma coacervados que crean una estructura de tipo cesta o trabéculas cuando se mezclan con alginate. Las trabéculas tienen espesores y longitud variables que proporcionan a las esferas propiedades biológicas y mecánicas concretas tal como estabilización de fenotipo, deformabilidad, elasticidad y módulo de compresión.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Aislamiento de condrocitos

Los fragmentos de cartílago se obtienen mediante biopsia y después se someten a tres tratamientos enzimáticos sucesivos (hialuronidasa 0,5 mg/ml durante 30 minutos a 37 °C; pronasa 1 mg/ml durante 1 hora a 37 °C; colagenasa 0,5 mg/ml durante 1 noche a 37 °C en presencia de 1 % de Ultrosor G) para eliminar la matriz extracelular. (Ultrosor G es un sustituto del suero de Pall Corporation). Después del paso sobre un filtro celular, los condrocitos se aclaran y se centrifugan. El sedimento celular se recoge y se suspende en la solución de

quitosano/alginato.

**Ejemplo 2. Preparación de esferas de alginato/quitosano**

5 Las esferas se preparan a partir de una mezcla homogénea de quitosano (0,6 % final) y alginato (1,2 % final). Las dos soluciones se preparan por separado antes de mezclar. Las soluciones de alginato y quitosano se preparan del siguiente modo: Se preparan una solución de alginato de 2,4 % (p/v) en NaOH 0,16M y una solución de quitosano de 1,333 % (p/v) en HAC 1,666M. A 10 volúmenes de la solución de alginato se añade 1 volumen de una solución de HEPES 1M. Tras la homogeneización, se añaden 9 volúmenes de solución de quitosano mezclando de forma regular y enérgicamente.

10 A continuación se administró un sedimento celular de condrocitos y se dispersó con precaución en la solución de quitosano/alginato a una concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml. La solución de quitosano/alginato con las células se pasó lentamente a través de una aguja de calibre 0,5 mm gota a gota en una solución de  $\text{CaCl}_2$  102 mM (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Tras la gelación instantánea, se dejó melificar las esferas adicionalmente durante 10 minutos en esta solución  $\text{CaCl}_2$ . En las esferas gelificadas, los condrocitos se distribuyen de un modo homogéneo. A escala microscópica, el quitosano (teñido en rojo por la eosina) forma una estructura de tipo cesta, compuesto por trabéculas o fibras de varios espesores y longitudes (véanse las figuras 1 y 2). Los intersticios en el presente documento se cargan con alginato (teñido con hematoxilina en violeta) que contiene los condrocitos.

**Ejemplo 3. Cultivo de condrocitos en esferas de alginato/quitosano.**

15 Las esferas gelificadas que comprenden condrocitos se lavaron con una solución salina. Las esferas se cultivaron en placas de 24 pocillos proporcionando 10 esferas en un ml de medio de cultivo [DMEM suplementado con 1 % de ITS+ (ICN Biomedicals, Asse-Relegem, Bélgica), HEPES 10 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 U/ml), 200 µg/ml de glutamina (Biowhittaker Europe, Verviers, Bélgica), 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica), prolina 2 mM (Gibco, Merelbeke, Bélgica)]. (ITS+ es un sistema de crecimiento celular premezclada que contiene en un ml: 0,625 mg de insulina, 0,625 mg de transferrina, 0,625 µg de ácido selenioso, 0,125 g de seroalbúmina bovina y 0,535 mg de ácido linoleico).

**Ejemplo 4. Caracterización de condrocitos**

Los condrocitos en la figura 2B se tiñeron con hematoxilina/eosina.

35 El agregano y la IL-6 se cuantificaron con ELISA. (Biosource Europe). La fosfatasa alcalina se cuantificó con un ensayo espectrofotométrico. En pocas palabras, se incubaron cincuenta µl de extracto celular con 100 µl de p-nitrofenilfosfato (KEM-EN-TEC, Kobenhavn, Dinamarca). En presencia de AP, p-NPP se transforma en p-nitrofenol y fosfato inorgánico, la absorbancia de p-nitrofenol se mide a 405 nm. Una preparación estándar de p-nitrofenol se uso para la calibración. Los resultados se expresaron en nmoles de p-nitrofenol liberado por minuto y por µg de ADN. Una unidad de AP se define como un nmol de p-nitrofenol liberado por minuto.

45 La lactato deshidrogenasa se cuantificó analizando su actividad enzimática en el sobrenadante del cultivo. Se mezclaron 100 µl del sobrenadante o diluciones de la solución patrón (LDH de músculo de conejo) con 50 µl de tampón Tris (Tris-HCl 10 mM (pH 8,5), 0,1% de BSA) que contiene lactato 800 mM. Se añadieron 100 µl de reactivo colorimétrico (1,6 mg/ml de cloruro de yodonitrotetrazolio (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica), 4 mg/ml de nicotinamida adenina dinucleótido (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica), 0,4 mg/ml de fenazina metosulfato (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) y la absorbancia a 492 nm se leyó tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente.

50 Estos datos muestran que los condrocitos que se cultivan en la matriz de la presente invención muestran una serie de propiedades superiores:

- las células cultivadas en quitosano/alginato muestran menos apoptosis o necrosis en comparación con las esferas de alginato como indica la medición de lactato deshidrogenasa.
- las células cultivadas en quitosano / alginato muestran menos signos de inflamación. Los condrocitos cultivados en esferas de quitosano / alginato no producen o producen cantidades muy pequeñas de IL-6, IL-8 y NO. La Figura 3 muestra una reducción espectacular de la producción de IL-6 durante el cultivo de los condrocitos en esferas mixtas (alginato/ quitosano) en comparación con las esferas de alginato.

60 La IL-1 β es una citoquina muy activa en la reacción inflamatoria y la proteólisis tisular asociada. Los efectos estimulantes de la IL-1β en la producción de mediadores de la inflamación o de enzimas proteolíticas son menos importantes en esferas de alginato / quitosano que en las esferas de alginato.

- Los condrocitos cultivados en quitosano/alginato muestran menos signos de acontecimientos catabólicos como indica la menor producción de una matriz metaloproteinasa MMP-3, que está implicada en la degradación de la matriz cartilaginosa, en comparación con los condrocitos cultivados en esferas de alginato.

- El crecimiento de los condrocitos en las esferas de quitosano/alginato tiene un efecto beneficioso y estabilizante sobre el fenotipo de los condrocitos.

**Ejemplo 5. Formulación de esferas en un hidrogel termosensible**

El medio de cultivo se retira mediante aspiración y las esferas mezclan con un hidrogel de quitosano vegetal (*Agaricus bisporus*) (Kitozyme, Alleur, Bélgica]. Esta etapa se lleva a cabo por debajo de 27 °C para evitar la gelificación del hidrogel. Se ha usado una relación de esferas/hidrogel de 3/1 (v/v).

**Ejemplo 6. Efecto de los cationes sobre el fenotipo de los condrocitos**

Las Figuras 3B y 5B muestran el efecto de la elección del catión utilizado en la formación del hidrogel. Mientras que la elección de calcio o de estroncio no tiene ningún efecto sobre la expresión de los marcadores interleucina-6 y agregano en esferas que consisten enteramente en alginato, se observa un efecto significativo cuando el quitosano/alginato se forma con iones de calcio o de estroncio.

**Ejemplo 7. Implantación en un modelo animal**

Un gel como se describe en el ejemplo 5, sin condrocitos, se ha implantado en un defecto de cartílago en una articulación de conejo (Figura 7). Después de 15 días desde la implantación se evaluó el implante (Figura 8). La lesión permanece rellena con el implante. Además, se observa que el implante está colonizado por células procedentes de la médula ósea subyacente. Se encontraron células en el hidrogel de quitosano sedimentado termosensible (B), así como en las esferas de alginato de quitosano (C) (las trabéculas de quitosano están indicadas por D). Esta prueba confirma que el implante bifásico puede manipularse e injertarse fácilmente. La naturaleza biodegradable del implante garantiza una resorción progresiva después de la implantación.

**Ejemplo 8. Efecto del peso molecular del quitosano en la formación de las esferas**

En el procedimiento de acuerdo con la invención se han usado diferentes pesos moleculares de quitosano nativo. Se midieron diferentes parámetros físicos tales como el pH y la viscosidad de la solución mixta (con condrocitos). La osmolaridad del hidrogel resultante se midió de acuerdo con una técnica bien conocida en la materia.

Tabla 1

Soluciones	pH	Viscosidad (Cps)	Osmolaridad (mOsm/kg)
Alginato 1,2 % / quitosano 22 kDa 0,6 %	7,8	110,7	324
Alginato 1,2 % / quitosano 30 kDa 0,6 %	8,3	230	305
Alginato 1,2 % / quitosano 32 kDa 0,6 %	7,8	192	308
Alginato 1,2 % / quitosano 55 kDa 0,6 %	8,0	279	290
Alginato 1,2 % / quitosano 55 kDa 0,6 %	8,2	336	302
Alginato 1,2 % / quitosano 91 kDa 0,6 %	Imposible mezclar		
Alginato 1,2 % / quitosano 146 kDa 0,6 %	Imposible mezclar		

Los inventores llegaron a la conclusión de que las esferas mixtas se pueden elaborar con el quitosano nativo por debajo de 55 kDa. Por ejemplo, a 91 kDa, las esferas no se pueden fabricar usando el proceso descrito en la invención y con la relación entre alginato al 1,2% y quitosano al 0,6 %, la solución de quitosano es demasiado viscosa. Por lo tanto, la selección del peso molecular del quitosano es un elemento esencial en la presente invención.

**Ejemplo 9. Efecto del peso molecular del quitosano sobre el comportamiento de los condrocitos**

El peso molecular tiene una influencia sobre el comportamiento de los condrocitos como se ilustra en las figuras 3A, 5A y 6. El efecto del quitosano de 40 kDa sobre la MMP-3, la IL-6 y el agregano es significativamente diferente del obtenido con 20 kDa. El quitosano de 20 kDa es menos eficiente sobre la síntesis de IL-6 y de MMP-3 que el quitosano de 40 kDa, pero más eficaz sobre la síntesis de agregano que el de 40 kDa. Esto demuestra claramente que la actividad biológica del quitosano nativo depende directamente del peso molecular.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de producción de una matriz de hidrogel que comprende células formadoras de cartílago, comprendiendo dicho método las etapas de:
- proporcionar una solución de alginato,
  - proporcionar una solución con quitosano que tiene un Pm inferior a 60 kDa,
  - mezclar la solución de alginato y la solución de quitosano con células formadoras de cartílago, en donde dicha solución mixta comprende entre el 0,5 y el 0,7 % (p/v) de quitosano y entre el 1 y el 1,4 % de alginato (p/v),
  - 10 - introducir gotas de la solución mixta en una solución con cationes de  $Ca^{2+}$  o  $Sr^{2+}$  y
  - aislar esferas polimerizadas de la solución con cationes.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución mixta comprende el 0,6 % de quitosano.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha solución mixta comprende el 1,2 % de alginato.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el alginato y el quitosano en dicha solución mixta están presentes en una proporción entre 1,75 y 2,25.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho quitosano tiene un Pm de entre 35 y 45 kDa.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende la etapa de cultivar en un medio de crecimiento dichas esferas que comprenden células formadoras de cartílago.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho medio de crecimiento comprende suero.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichas gotas se pasan a través de una aguja para obtener una partícula con un diámetro entre 0,01 a 5 mm.
- 30 9. Una esfera de hidrogel esférica con un diámetro entre 0,01 y 5 mm, que comprende una mezcla homogénea de alginato y quitosano de Pm inferior a 60 kDa y que además comprende células formadoras de cartílago dentro de dicha matriz, **caracterizada por que** dicha esfera comprende entre el 1 y el 1,4 % p/v de alginato y entre el 0,5 y el 0,7 % p/v de quitosano.
- 35 10. La esfera de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha esfera comprende 1,2 % p/v de alginato.
11. La esfera de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en donde dicha esfera comprende el 0,6% p/v de quitosano.
- 40 12. La esfera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el quitosano tiene un Pm de entre 35 y 45 kDa.
- 45 13. La esfera que comprende células formadoras de cartílago de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para su uso en la reparación de los defectos del cartílago.

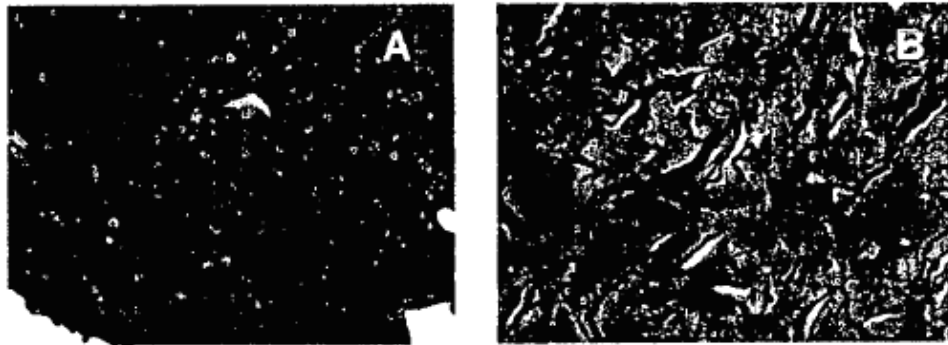


Figura 1

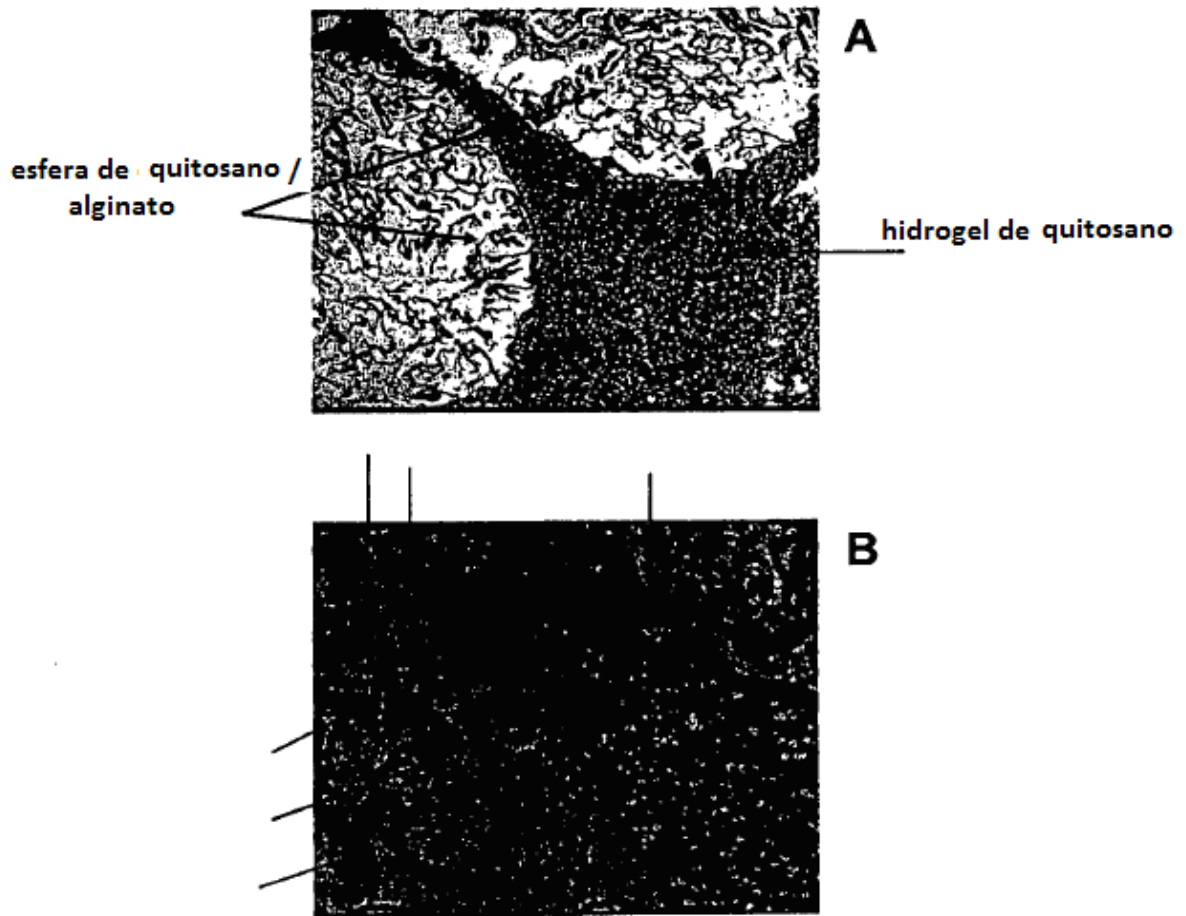
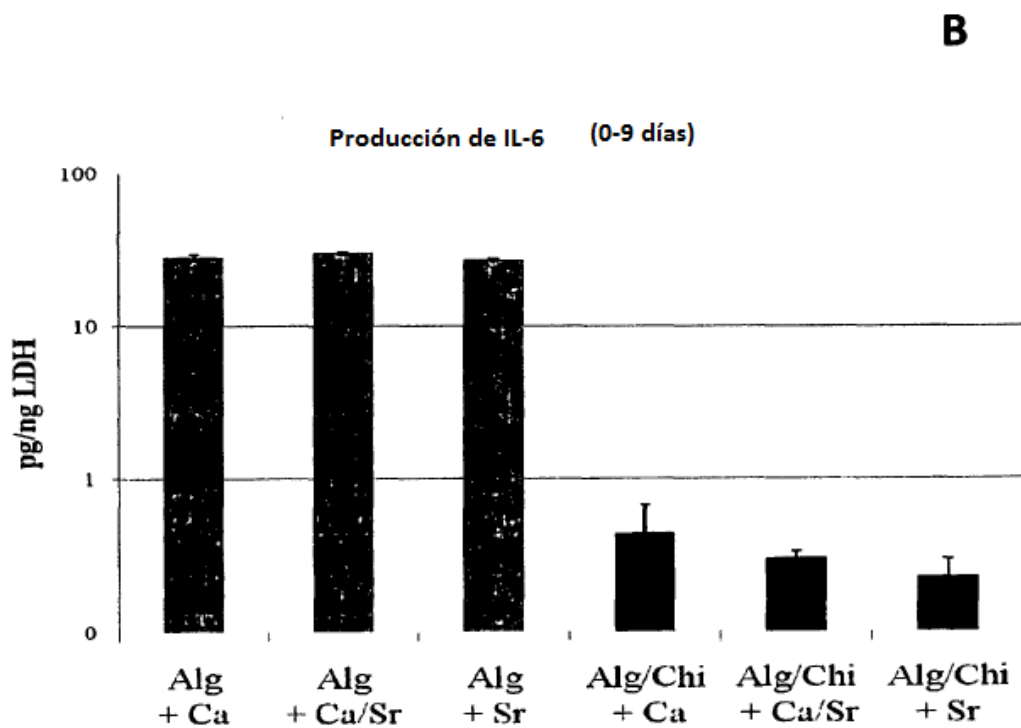
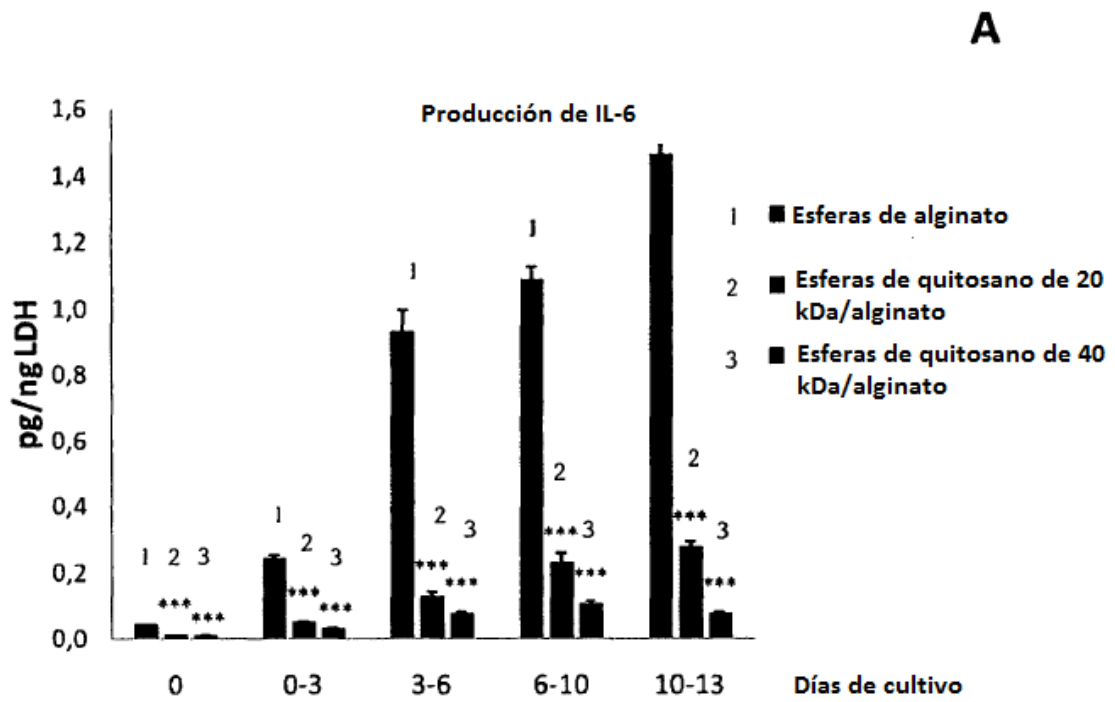
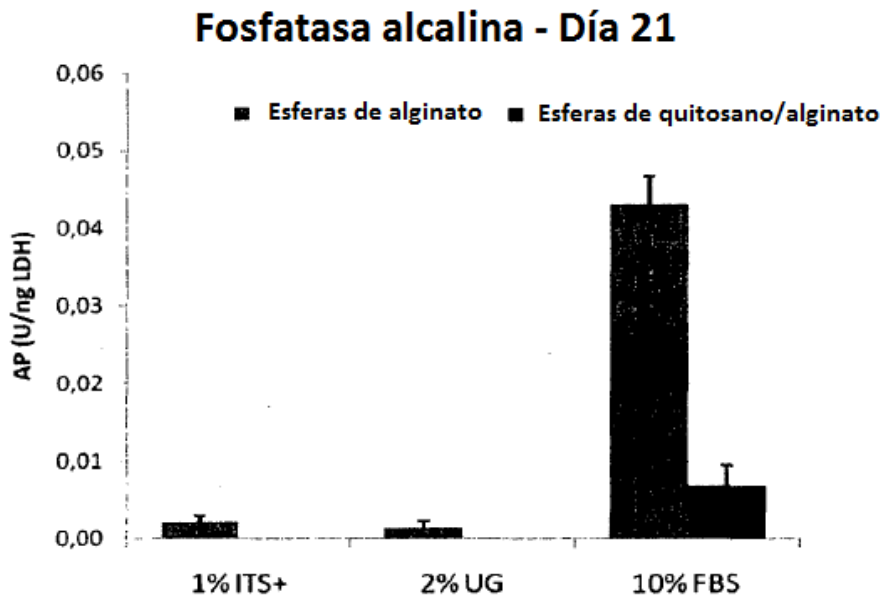


Figura 2

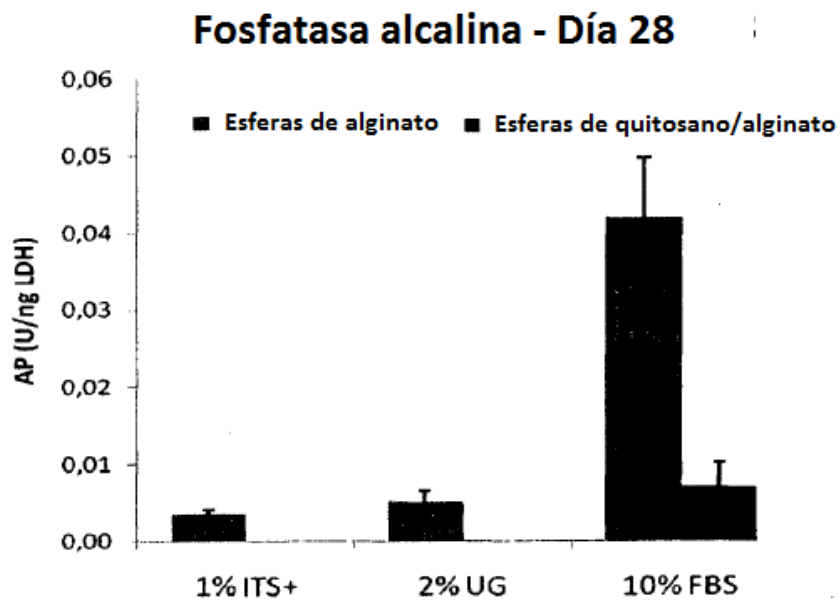


**Figura 3**

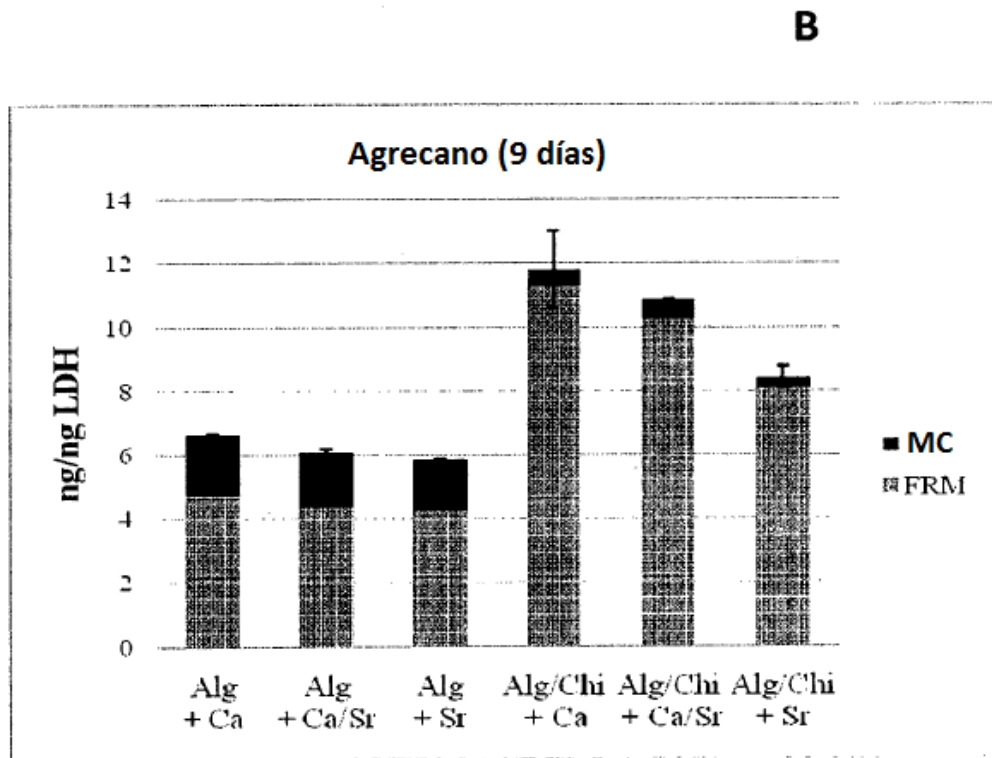
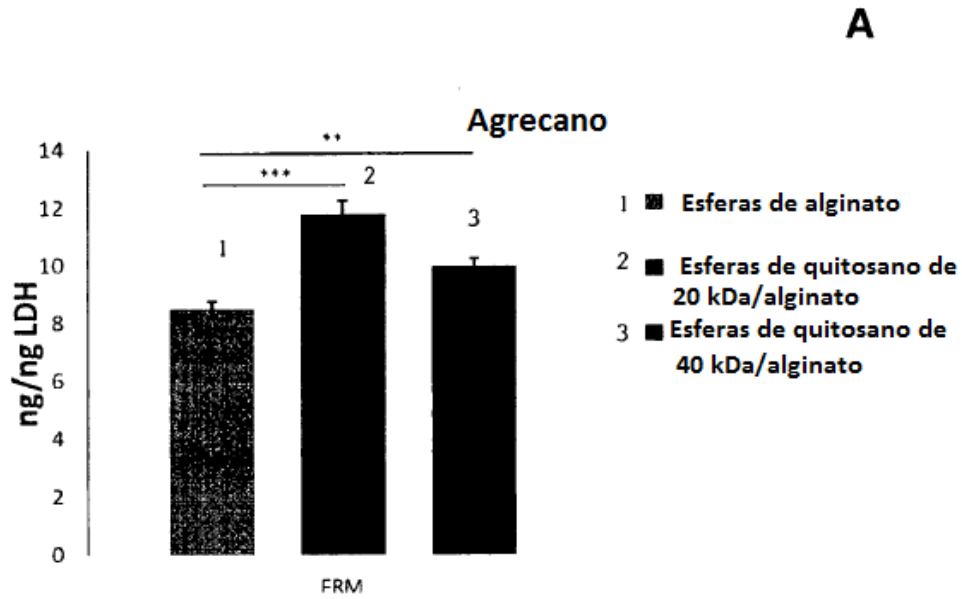
**A**



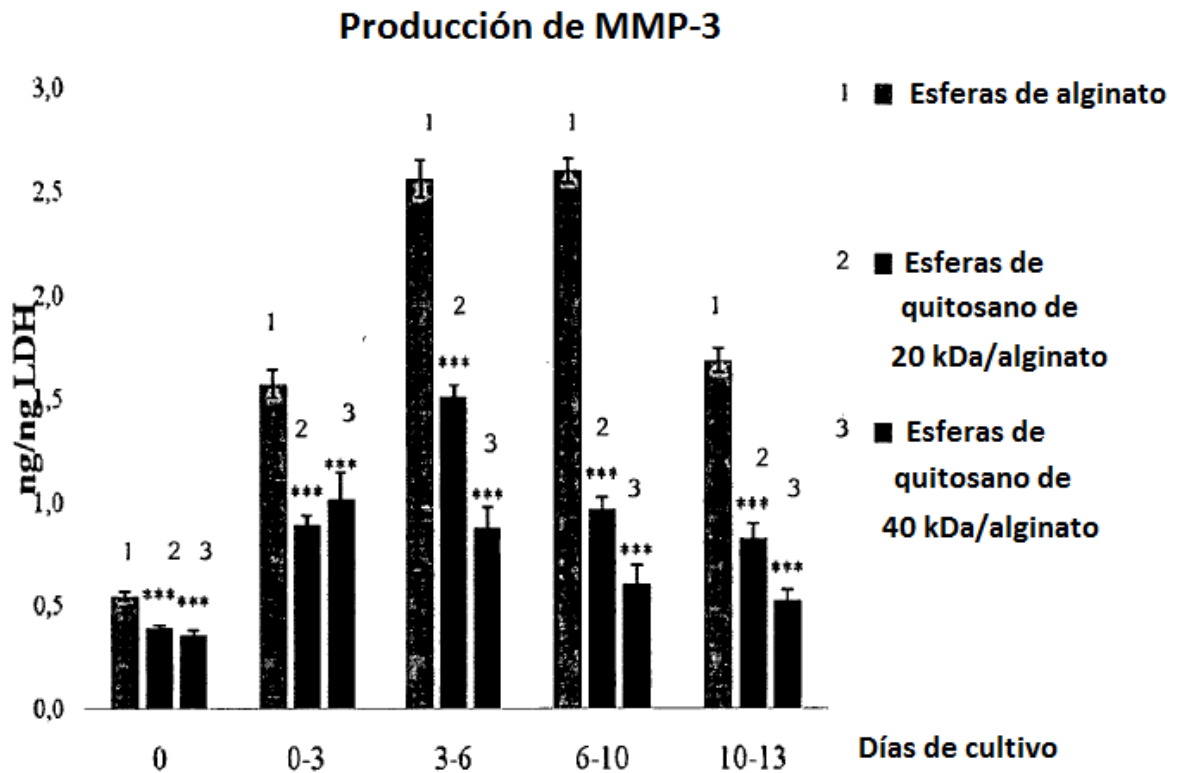
**B**



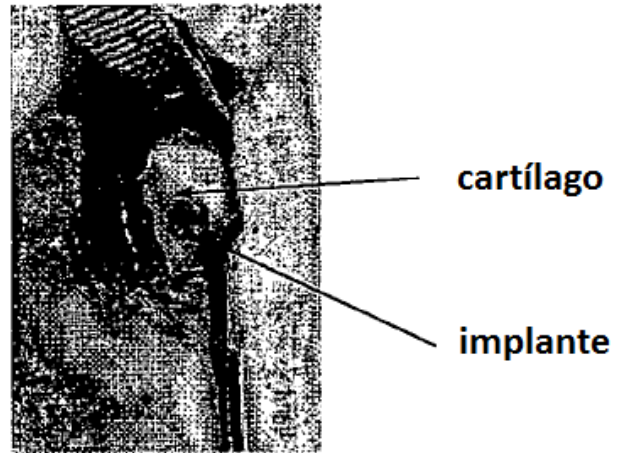
**Figura 4**



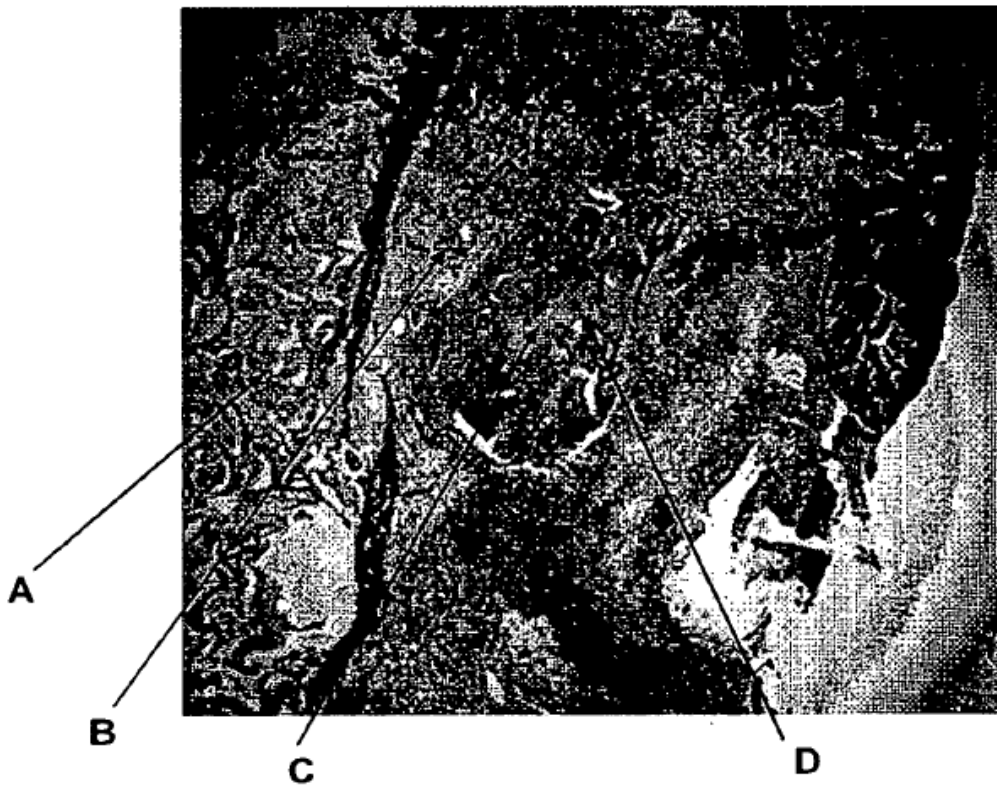
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**