

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 943**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 10714207 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2419152**

54 Título: **Implante y composición terapéutica para el tratamiento de daños y/o enfermedad en el área del aparato locomotor humano y/o animal**

30 Prioridad:

17.04.2009 DE 102009018640

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

13.02.2015

73 Titular/es:

**TETEC TISSUE ENGINEERING TECHNOLOGIES
AG (100.0%)
Aspenhastrasse 18
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:

MOLLENHAUER, JÜRGEN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 528 943 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

Implante y composición terapéutica para el tratamiento de daños y/o enfermedad en el área del aparato locomotor humano y/o animal

5 [0001] La presente invención se refiere a un implante y una composición terapéutica, que sirven sobre todo para el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal, así como un procedimiento de producción para el implante y la composición terapéutica.

10 [0002] El cartílago articular es capaz sólo de forma limitada de reparar daños en las superficies articulares o entre las vértebras de la columna vertebral. Se conoce una composición a base de colágeno, idónea principalmente también para la reparación del tejido cartilaginoso, del EP 0 747 067 A2.

15 [0003] Otro concepto fundamental para el tratamiento quirúrgico de lesiones del cartílago prevé la aplicación de implantes de cartílago a base de células cartilaginosas fabricadas *in vitro*. Los implantes de cartílago deberían presentar en este caso posiblemente células autólogas, para mantener bajo el riesgo de reacciones de rechazo en el paciente interesado en la medida de lo posible.

20 [0004] Dado que se pueden poner a disposición usualmente sólo unas pocas células autólogas con ayuda de biopsias, las células cartilaginosas aisladas son sometidas a división generalmente múltiples. Sin embargo a este respecto supone un problema por el hecho de que un número creciente de divisiones va acompañado de una pérdida progresiva del fenotipo celular diferenciado. Esto significa que las células cartilaginosas aisladas se alejan cada vez más en cuanto a sus características de su original natural, cuanto más frecuentemente son sometidas a un ciclo de multiplicación. Además con un número creciente de divisiones aumenta el riesgo de una mutación y con ella generalmente el riesgo de una génesis tumoral.

25 [0005] Otro problema con el cultivo *in vitro* de células cartilaginosas en placas, frascos o similares de cultivo celular consiste en que estas células normalmente no están circundadas por una matriz extracelular, que podría detener hasta cierto punto las sustancias producidas y secretadas por las células cartilaginosas. Más bien se distribuyen las sustancias celulares secretadas, por ejemplo procolágenos solubles, proteoglicanos inmaduros, subunidades glicoproteínicas, hormonas tisulares, factores de crecimiento así como proteasas extracelulares específicas, difusas en el ambiente artificial. Para compensar la pérdida de este material o sustancia, las sustancias ya citadas y otras deben ser de nuevo secretadas continuamente por las células cartilaginosas y nuevamente segregadas. Esto significa que las células cartilaginosas presentan un índice metabólico permanentemente aumentado, lo que para las células cartilaginosas significa a su vez unas condiciones de esfuerzo aumentadas. Esto puede conducir a un perjuicio de los implantes de cartílago, que se basan en tales células cartilaginosas.

30 [0006] El US 2005/0186673 A1 divulga una matriz formada esencialmente de colágeno tipo II, que se carga con un ácido nucleico para promover el crecimiento celular.

35 [0007] Del WO 2007/035778 A2 se conoce una matriz de soporte para células, que puede estar formada entre otros de colágeno tipo I, II y/o IV.

40 [0008] El objeto de US 6,444,222 B1 es una matriz fortalecida que presenta colágeno y una proteína estructural, preferiblemente elastina.

[0009] El US 2003/0152556 A1 describe un implante de cartílago con condrocitos o células madre mesenquimales y un sustrato, que contiene colágeno tipo I en forma de monómeros α -helicoidales.

45 [0010] El EP 1 254 670 A1 se refiere a una matriz para la fabricación o regeneración de tejido cartilaginoso, que consiste en una red de colágeno tipo II modificado.

50 [0011] Por lo tanto la tarea de la presente invención es proveer un implante que evite las desventajas conocidas del estado de la técnica y especialmente posibilite una regeneración del cartílago, es decir condrogénesis, especialmente mejorada frente a los implantes de cartílago convencionales y especialmente acelerada.

55 [0012] Esta tarea queda solucionada según la invención a través de un implante con las características de la reivindicación independiente 1. Las formas de realización preferidas del implante son objeto de las reivindicaciones dependientes 2 hasta 10. Una composición terapéutica es objeto de la reivindicación independiente 11. Un procedimiento para la fabricación de un implante es objeto de la reivindicación 12. Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de una composición terapéutica con las características de la reivindicación independiente 13. La invención finalmente se refiere también a utilizaciones según las reivindicaciones 14 y 15.

60 [0013] En el caso del implante según la invención se trata de un implante, incluyendo un material portador, células cartilaginosas y/o sus células precursoras y un tipo de colágeno específico del cartílago. El implante se puede utilizar

fundamentalmente tanto en medicina humana como en la medicina veterinaria. Se prefiere la utilización en medicina humana, particularmente en el sector de la medicina regenerativa. Así el implante es idóneo especialmente para el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal.

5 [0014] Sorprendentemente se podía establecer, que las células cartilaginosa o sus células precursoras del colágeno tipo IV específicas del cartílago, que se proponen de forma *in vitro*, "se captan" y se utilizan para la creación de un tipo de matriz extracelular. A través de la creación de una matriz extracelular alrededor de las células cartilaginosa se pueden detener mejor las sustancias secretadas por las células, por lo que se reduce la pérdida de las sustancias celulares descritas ya mencionada. De esta manera se reduce el índice de metabolismo celular, por lo
10 que se reduce totalmente el estrés para las células cartilaginosa. El estrés celular inferior así como la creación de una matriz extracelular confiere al cartílago propiedades inductoras, es decir condrogénicas, totalmente mejoradas en el caso de los implantes según la invención frente a los implantes convencionales.

15 [0015] En una forma de realización preferida, las células cartilaginosa y/o sus células precursoras son de origen autólogo y/o alógeno, preferiblemente autólogo. Las células cartilaginosa y/o sus células precursoras pueden provenir de un origen fundamentalmente animal y/o de líneas celulares apropiadas. Las células cartilaginosa y/o sus células precursoras pueden ser origen fundamentalmente xenógeno. Por ejemplo según la invención, las células cartilaginosa previstas y/o sus células precursoras se pueden tratar de células de cerdos, caballos, bovinos, dromedarios, perros y/o gatos. Se prefieren células cartilaginosa y/o sus células precursoras de origen humano. Se
20 prefiere especialmente la utilización de células cartilaginosa humanas autólogas y/o las células precursoras correspondientes. Las células cartilaginosa y/o sus células precursoras pueden aislarse o en caso necesario cultivarse mediante los métodos usuales del experto en la técnica a partir de tejidos cartilaginosa humanos o animales, especialmente de tejidos cartilaginosa de la articulación y/o de tejidos de discos intervertebrales.

25 [0016] Las células cartilaginosa se seleccionan en otra forma de realización del grupo consistente en condrocitos, condroblastos y sus mezclas. Como condroblastos ("constructores de cartílago") se denominan generalmente las células precursoras de los condrocitos. Estos provienen de células madre mesenquimales y presentan la forma activa de las células cartilaginosa, puesto que pueden sintetizar todos componentes de la matriz cartilaginosa. En cuanto tienen ajustada esta función de síntesis, éstos se diferencian de los condrocitos, las verdaderas células
30 cartilaginosa. Los mismos condrocitos son más pequeños que los condroblastos, tienen forma esférica, poseen un núcleo celular redondeado y contienen mucha agua, grasa y glucógeno. Su número, capa y densidad es específico para cada tipo de cartílago. Los condrocitos aún se pueden dividir en su estado inmaduro, lo que puede llevar a la aparición característica de los así llamados grupos isogénicos. El origen de estos grupos isogénicos se basa en la división de los condrocitos, que ya están rodeados por una matriz cartilaginosa y por lo tanto no pueden seguir dividiéndose. En otras palabras en los grupos isogénicos se trata de complejos de condrocitos, donde cada complejo surge de un solo condrocito. Tan pronto los condrocitos están diferenciados entre ellos, pierden su facultad para la división. En cuanto a las células precursoras en el sentido de la presente invención se trata generalmente de células madre, preferiblemente de células madre mesenquimales. Las células madre pueden ser origen animal o humano, donde se prefieren las células madre humanas.

40 [0017] Las células cartilaginosa fundamentalmente pueden dividirse dos o más veces. Por división se entiende un ciclo técnico de crecimiento, para aumentar el número de células, las cuales normalmente se pueden obtener sólo en pequeñas cantidades en un material de biopsia. Así las células cartilaginosa se puede tratar de células secundarias, terciarias, cuaternarias, etc. Preferiblemente las células cartilaginosa se trata sin embargo de células
45 cartilaginosa primarias. Las células cartilaginosa primarias tienen la ventaja de que llegan a parecerse mucho a las células cartilaginosa naturales en cuanto a características morfológicas y bioquímicas.

[0018] Las células cartilaginosa y/o sus células precursoras se almacenan en una forma de realización especialmente preferida mediante una colonización *in vitro* o un cultivo *in vitro* en el implante.

50 [0019] El tipo de colágeno específico del cartílago puede ser de origen fundamentalmente recombinante o microbiológico. Preferiblemente el tipo de colágeno específico del cartílago es animal, especialmente de origen bovino, porcino y/o equino, y/o de origen humano.

55 [0020] En una forma de realización adicional el tipo de colágeno específico del cartílago proviene de un tejido biológico, especialmente humano o animal. Preferiblemente el tipo de colágeno específico del cartílago proviene de un tejido seleccionado del grupo consistente en córnea ocular, tejido placentario, tejido aórtico, tejido sinovial y sus mezclas.

60 [0021] El tipo de colágeno específico del cartílago es el colágeno tipo VI. Según la invención es preferible la utilización de colágeno tipo VI soluble en agua. Este tipo de colágeno se trata del componente principal de la llamada matriz pericelular, la cual rodea directamente las células cartilaginosa. La matriz pericelular rodea en forma de jaula una o varias células cartilaginosa. La disposición en forma de jaula a partir de matriz pericelular y células cartilaginosa se denomina también condón o territorio. Con ello la matriz pericelular se debe diferenciar de nuevo de la matriz extracelular verdadera. En el tejido cartilaginosa natural, la matriz extracelular rodea los condrones
65 recientemente mencionados y con ellos la matriz pericelular. El colágeno tipo VI es un heterotrímero, compuesto por

los polipeptidos $\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI) y $\alpha 3$ (VI). Los polipéptidos anteriormente citados presentan respectivamente en cada uno de sus extremos un dominio globular. Los dominios globulares están distanciados el uno del otro generalmente mediante una sección triple-helicoidal corta. Así se obtiene en conjunto una estructura en forma de pesa para el colágeno tipo VI monomérico. Los monómeros se pueden almacenar juntos sobre una conexión lateral en tetrámeros. Los tetrámeros pueden a su vez almacenarse juntos sobre sus extremos en estructuras en forma huso y de filamento.

[0022] En otra forma de realización el implante también puede presentar junto al tipo de colágeno específico del cartílago un tipo de colágeno no típico del cartílago, por ejemplo del grupo consistente en el colágeno tipo I, III y combinaciones de los mismos.

[0023] Preferiblemente el implante presenta adicionalmente sustancias activas biológicas. Las sustancias activas se pueden seleccionar del grupo consistente en proteasas extracelulares, anticuerpos, receptor-antagonistas, receptor-agonistas, hormonas, factores de crecimiento, factores de diferenciación, factores de reclutamiento, factores de adhesión, antibióticos, compuestos antimicrobianos, compuestos antiinflamatorios, compuestos inmunosupresores y combinaciones de los mismos.

[0024] Como componentes de reclutamiento son adecuados por ejemplo los quimiotácticos o quimiotaxinas. Como factores de adhesión se pueden usar por ejemplo compuestos del grupo consistente en citotactina, laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, V y VII, péptidos sintéticos, cuyas secuencias parciales representan diferentes adhesinas, proteínas de unión transmembrana, como por ejemplo integrina, y combinaciones de los mismos.

[0025] Los factores de crecimiento se trata preferiblemente de condrógenos, es decir factores de crecimiento que inducen el crecimiento del cartílago. Los factores de crecimiento apropiados se pueden seleccionar del grupo consistente en TGFs (factores de crecimiento transformante), BMPs (proteínas morfogénicas óseas), MSPF (factores estimuladores de proteína morfogénica), factores de crecimiento ligantes a la heparina, inhibina, factores de crecimiento diferenciadores, activina y combinaciones de los mismos. Se seleccionan preferiblemente los factores de crecimiento del grupo consistente en TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), IGF (factor de crecimiento insulínico), inhibina A, inhibina B, GDF-I (factor de crecimiento diferenciante I), activina A, activina B, activina AB y combinaciones de los mismos. Se prefiere especialmente la utilización de TGFs y/o BMPs. Los factores de crecimiento pueden aislarse a partir de fuentes nativas o naturales, por ejemplo células de mamíferos. Según la invención es posible igualmente que los factores de crecimiento sean creados sintéticamente, por ejemplo con la ayuda de técnicas de ADN recombinante o a través de métodos químicos.

[0026] El implante presenta preferiblemente condrones y/o fases previas de tipo condón. Como ya se ha descrito, a este respecto se trata de estructuras en forma de jaula, que están formadas por una matriz pericelular junto a una o varias células cartilaginosas.

[0027] El material portador se forma preferiblemente como una estructura tridimensional o red o matriz tridimensional, particularmente una matriz proteínica. El material portador puede existir reticulado o no reticulado. Es preferible que el material portador sea reticulado, especialmente químicamente reticulado. Como reactivos de reticulación se pueden usar aldehídos, dialdehídos, diisocianatos o carbodiimida.

[0028] El material portador comprende preferiblemente un material, que se selecciona del grupo consistente en proteínas o sales de las mismas, polisacáridos o sales de los mismos, polihidroxialcanoatos, fosfatos cálcicos, membranas animales, compuestos de los mismos y combinaciones de los mismos. Como proteínas especialmente ventajosas se deben mencionar sobre todo las proteínas fibrosas o sales de las mismas, especialmente las proteínas extracelulares o sales de las mismas, preferiblemente seleccionadas del grupo consistente en colágeno o sales del mismo, gelatina o sales de la misma, elastina o sales de la misma, reticulina o sales de la misma y combinaciones de los mismos. Los colágenos preferidos se seleccionan del grupo consistente en colágeno tipo I, II, III y combinaciones de los mismos. La utilización de colágeno tipo II como material portador es preferible, puesto que a este respecto se trata del componente principal del colágeno de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso natural. Los polisacáridos se pueden seleccionar del grupo consistente en derivados de la celulosa, quitosano, derivados del quitosano, glucosaminoglicanos, sales de los mismos y combinaciones de los mismos. Los derivados de la celulosa se trata preferiblemente de alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, carboxialquilcelulosas, sales de las mismas y/o combinaciones de las mismas. Por consiguiente se pueden seleccionar ejemplos para derivados de la celulosa apropiados del grupo consistente en metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilcelulosa, carboximetilcelulosa, sales de las mismas y combinaciones de las mismas. Los glucosaminoglicanos apropiados se pueden seleccionar del grupo consistente en ácido hialurónico, heparina, heparán sulfato, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato, sales de los mismos y combinaciones de los mismos. Como posibles polihidroxialcanoatos se deben mencionar sobre todo el ácido poliglicólico, ácido poliláctico, poli-3-hidroxibutirato, poli-4-hidroxibutirato, copolímeros de los mismos o mezclas de los mismos. Los fosfatos cálcicos preferidos se pueden seleccionar del grupo consistente en fluoroapatitas, hidroxiapatitas, fosfato tricálcico, fosfato tetracálcico y combinaciones de los

mismos. En las membranas animales se trata preferiblemente de pericardio, especialmente de origen bovino.

[0029] En caso necesario el material portador puede contener también sustancias de refuerzo, especialmente fibras de refuerzo, preferiblemente seleccionadas del grupo consistente en fibras de polisacárido, fibras proteínicas, seda, fibras de algodón, fibras de ácido poliláctico, fibras de gelatina y combinaciones de las mismas.

[0030] El material portador formado es generalmente poroso, preferiblemente tiene una porosidad efectiva. De manera ventajosa el material portador presenta una porosidad interconectante. El material portador puede presentar además poros con un tamaño poral entre 50 y 500 μm , especialmente 50 y 350 μm , preferiblemente 100 y 200 μm .

[0031] En otra forma de realización el material portador está construido por varias capas. El material portador presenta preferiblemente al menos una primera capa y al menos una segunda capa. Al menos la primera capa y al menos la segunda capa se unen generalmente a lo largo de una superficie de límite común. La conexión a lo largo de la superficie de límite común puede estar basada en ligamentos químicos y/o físicos. Por ejemplo puede unirse al menos la primera capa y al menos la segunda capa a través de enlaces covalentes, particularmente mediante un reticulante químico. Además se pueden pegar entre sí al menos la primera capa y al menos la segunda capa. En una variante ventajosa la conexión entre al menos la primera capa y al menos la segunda capa se lleva a cabo mediante una liofilización, especialmente mediante una coliofilización de las capas.

[0032] Al menos la primera capa posee preferiblemente una estructura densa, especialmente impermeable a células. Según la invención puede verse que al menos la primera capa posee una estructura permeable a sustancias nutritivas, sustancias biológicas activas, sustancias médicas o farmacéuticas activas y/o compuestos de bajo peso molecular en general. Por ejemplo al menos la primera capa puede presentar poros con un tamaño poral $< 2 \mu\text{m}$, especialmente $< 1 \mu\text{m}$.

[0033] Al menos la segunda capa presenta preferiblemente una estructura porosa, especialmente tiene porosidad efectiva. Según la invención es preferible que al menos la segunda capa posea una estructura permeable o infiltrable a células. Preferiblemente al menos la segunda capa presenta poros con un tamaño poral entre 50 y 250 μm , especialmente 130 y 200 μm .

[0034] En una forma de realización adicional al menos la primera capa posee una estructura membranosa. Especialmente al menos la primera capa puede estar formada como un cuerpo membranoso. Al menos la segunda capa posee preferiblemente una estructura esponjosa. Al menos la segunda capa puede estar formada especialmente como un cuerpo esponjoso. Respecto a los materiales, los cuales pueden presentar al menos la primera capa y/o al menos la segunda capa, se toman como referencia completamente los materiales portadores hasta ahora descritos. Sin embargo según la invención se prefiere que al menos la primera capa presente un material, el cual se selecciona del grupo consistente en colágeno o sales del mismo, especialmente colágeno tipo I y/o III o sales de los mismos, elastina o sales de la misma, polímeros bioreabsorbibles, pericardio, compuestos, glucosaminoglicanos o sales de los mismos y combinaciones de los mismos. Al menos la segunda capa presenta preferiblemente un material, especialmente un material hidrófilo, el cual se selecciona preferiblemente del grupo consistente en colágeno o sales del mismo, especialmente colágeno tipo I y/o III o sales de los mismos, ácido hialurónico o sales del mismo, alginatos o sales de los mismos, quitosano o sales del mismo, gelatina o sales de la misma, materiales procesados, compuestos, fibrina o sales de la misma y combinaciones de los mismos. El material de al menos la segunda capa puede existir además reticulado, especialmente químicamente reticulado.

[0035] En una forma de realización particularmente preferida al menos la primera capa es una membrana pericárdica, especialmente una membrana pericárdica bovina, y al menos la segunda capa es un cuerpo esponjoso, preferiblemente a base de colágeno tipo I y/o III o de sales de los mismos.

[0036] En otra forma de realización al menos la primera capa y al menos la segunda capa presentan diferentes tiempos de resorción. Especialmente al menos la primera capa posee un tiempo de resorción más largo al de al menos la segunda capa. En los tiempos de resorción se trata preferiblemente de tiempos de resorción medidos *in vivo*.

[0037] Preferiblemente en el caso del implante se trata de un implante de cartílago, especialmente de un implante de células cartilaginosas autólogas. Es preferible el implante de un implante de células cartilaginosas, que presenta células cartilaginosas autólogas y un material portador tridimensional bifásico basado en colágeno. La primera fase del material portador está formada preferiblemente como un cuerpo esponjoso, preferiblemente con poros dispuestos en forma de columna y preferiblemente conectados unos con otros. Así es posible con una ventaja especial una distribución tridimensional uniforme de las células cartilaginosas en el cuerpo esponjoso. La segunda fase del material portador presenta preferiblemente una membrana cobertura y especialmente resistente, especialmente una membrana pericárdica. La membrana impide con una ventaja especial una migración de las células cartilaginosas *in vivo* a partir de la zona de defecto. La membrana permite además una manipulación quirúrgica sencilla, como por ejemplo un cosido seguro y ligero del implante. El solicitante vende comercialmente un implante de condrocito autólogo correspondiente bajo la denominación NOVO-CART 3D.

[0038] El implante se usa preferiblemente en la medicina regenerativa, particularmente en el sector de la ingeniería de tejidos. Conforme a lo anteriormente mencionado, el implante es idóneo sobre todo para el tratamiento de daños y/o enfermedades del aparato locomotor humano y/o animal. En caso de daño se puede tratar de lesiones, las cuales han sido causadas especialmente por sucesos traumáticos, como por ejemplo accidentes deportivos o de tráfico. Los daños, que se pueden tratar mediante el implante según la invención, pueden también ser consecuencia de una enfermedad sistémica del aparato locomotor humano y/o animal, por ejemplo una artritis. Preferiblemente el implante se usa con el trasplante de células cartilaginosa autólogas o alogénicas, preferiblemente autólogas. Otro campo de la aplicación del implante se refiere a su aplicación con el trasplante de células madre mesenquimales autólogas y/o alogénicas, especialmente para la regeneración de cartílago, de tendón, de ligamento y/o de hueso. Es especialmente preferible la utilización del implante para el tratamiento de daños y/o enfermedades del tejido cartilaginosa humano y/o animal, especialmente del tejido cartilaginosa de articulación y/o tejidos de discos intervertebrales. Otra aplicación posible del implante se refiere a la curación de una herida en el cuerpo humano y/o animal.

[0039] Otro aspecto de la presente invención se refiere una composición terapéutica, que incluye células cartilaginosa y/o sus células precursoras y un tipo de colágeno específico del cartílago. Las células cartilaginosa se seleccionan preferiblemente del grupo consistente en condrocitos, condroblastos y combinaciones de los mismos. Respecto a las células precursoras se trata generalmente de células madre, preferiblemente células madre mesenquimales. Las células cartilaginosa y/o sus células precursoras pueden ser de origen humano y/o animal. Se prefieren las células cartilaginosa y/o sus células precursoras procedentes de humanos. Además las células cartilaginosa y/o sus células precursoras pueden ser de origen autólogo o alogéno. Preferentemente en las células cartilaginosa y/o sus células precursoras se trata de células autólogas. El tipo de colágeno específico del cartílago proviene preferiblemente de un tejido biológico, especialmente humano o animal, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en córnea ocular, tejido placentario, tejido aórtico, tejido sinovial y combinaciones de los mismos. Respecto al tipo de colágeno específico del cartílago se trata de colágeno tipo VI. La composición terapéutica se encuentra en forma de suspensión acuosa. La composición terapéutica es idónea sobre todo para un cultivo *in vitro* o colonización *in vitro* de un material portador con células cartilaginosa y/o células precursoras de las mismas. Además la composición se usa preferiblemente en el trasplante de células cartilaginosa autólogas o alogénicas, preferiblemente autólogas. Además la composición también puede emplearse también en el trasplante de células madre mesenquimales autólogas y/o alogénicas, preferiblemente autólogas, especialmente para la regeneración de cartílago, tendón, ligamento y/o hueso. Es especialmente preferible la utilización de la composición para el tratamiento de daños y/o enfermedades del tejido cartilaginosa humano y/o animal, especialmente de tejidos cartilaginosa de articulación y/o tejidos de discos intervertebrales. En relación a otras características y ventajas de la composición terapéutica se toma referencia completamente de la descripción precedente.

[0040] Otro aspecto de la presente invención comprende un procedimiento de producción para el implante, que incluye los pasos:

1. a) Disponer de células cartilaginosa y/o sus células precursoras y un tipo de colágeno específico del cartílago y
2. b) Cargar o inocular un material portador con las células cartilaginosa y/o sus células precursoras y el tipo de colágeno específico del cartílago.

[0041] En una forma de realización preferida se ponen a disposición las células cartilaginosa y/o sus células precursoras junto con el tipo de colágeno específico del cartílago en forma de mezcla acuosa. La mezcla acuosa a su vez puede ponerse a disposición en forma de dispersión acuosa, suspensión acuosa, solución acuosa, hidrogel o pasta acuosa. Para la fabricación de la mezcla acuosa se usa preferiblemente una suspensión acuosa de células cartilaginosa y/o sus células precursoras. A tal objeto se pueden pretratar enzimáticamente en caso necesario las células cartilaginosa y/o sus células precursoras. Las mismas células cartilaginosa pueden tomarse de líneas celulares correspondientes, cultivos celulares y/o muestras de biopsia. Además para la fabricación de la mezcla acuosa es preferible usar una solución o suspensión del tipo de colágeno específico del cartílago. La solución o suspensión presenta preferiblemente una concentración del tipo de colágeno específico del cartílago entre 10 µg/ml y 10 mg/ml. Para la fabricación de la mezcla acuosa, especialmente la suspensión, de las células cartilaginosa y/o sus células precursoras y/o de la solución o suspensión del tipo de colágeno específico del cartílago, se pueden usar fundamentalmente todos los biofluidos. Por ejemplo se pueden usar biofluidos del grupo consistente en agua, soluciones reguladoras, soluciones electrolíticas, soluciones de nutrientes y líquidos corporales, por ejemplo sangre y/o líquido sinovial. La mezcla acuosa puede contener además sustancias biológicas activas, especialmente una concentración entre 10 y 500 ng/ml.

[0042] En una forma de realización posible se carga el material portador en primer lugar únicamente con las células cartilaginosa y/o sus células precursoras. En este caso se permite que las células migren en el material portador normalmente durante un período determinado, que se encuentra normalmente en el rango entre 1 y 2 días, antes de que se cargue a continuación el material portador con el tipo de colágeno específico del cartílago.

[0043] En una forma de realización preferida se lleva a cabo una coincubación de las células cartilaginosa y/o de sus células precursoras y del tipo de colágeno específico del cartílago, preferiblemente en la mezcla acuosa ya mencionada, antes de cargar el material portador. La coincubación puede llevarse a cabo dentro de un período

entre 1 y 48 horas, especialmente 2 y 36 horas, preferiblemente 4 y 24 horas. Alternativamente o en combinación a esto se puede realizar una coincubación de las células cartilagosas y/o de sus células precursoras y del tipo de colágeno específico del cartílago sobre o en el material portador. La incubación en este caso se lleva a cabo preferiblemente durante entre 2 y 24 horas. Las coincubaciones descritas en esta sección se llevan a cabo preferiblemente en un rango de temperatura entre 0 y 39°C, especialmente 30 y 39 °C.

[0044] La presente invención comprende también un implante, que se produce o se puede producir según uno de los métodos descritos en las formas de realización anteriores.

[0045] Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de producción para la composición terapéutica. Según la invención, para la fabricación de la composición se mezcla un líquido acuoso, preferiblemente una suspensión acuosa, que contiene células cartilagosas y/o sus células precursoras, con una solución acuosa (o suspensión acuosa), que contiene un tipo de colágeno específico del cartílago.

[0046] Para la fabricación de la suspensión acuosa se pueden pretratar enzimáticamente en caso necesario las células cartilagosas y/o sus células precursoras. La solución acuosa (o suspensión acuosa) del tipo de colágeno específico del cartílago presenta preferiblemente una concentración del tipo de colágeno específico del cartílago entre 10 µg/ml y 10 mg/ml. En relación a otras características y propiedades, especialmente respecto a las células cartilagosas y/o sus células precursoras y el tipo de colágeno específico del cartílago, se remite completamente a la descripción anterior.

[0047] Finalmente la presente invención también se refiere a la utilización de un material portador de células cartilagosas y/o sus células precursoras y la utilización de un tipo de colágeno específico del cartílago para la fabricación de un implante, especialmente para el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal. Además la presente invención se refiere también a la utilización de una suspensión acuosa que contiene células cartilagosas y/o sus células precursoras, y de una solución acuosa (o suspensión acuosa) que contiene un tipo de colágeno específico del cartílago, para la fabricación de una composición terapéutica, preferiblemente para el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal. En relación a otras características y detalles, especialmente respecto a las células cartilagosas y/o sus células precursoras así como al tipo de colágeno específico del cartílago, se toma referencia completamente igualmente a la descripción anterior.

[0048] Otras características y ventajas de la invención resultan de la descripción sucesiva de una forma de realización preferida en forma de ejemplo en relación con las reivindicaciones secundarias. En este caso las características se pueden llevar a cabo respectivamente por sí mismas o en combinación entre varios. El siguiente ejemplo sirve únicamente a la explicación de la presente invención y no está considerado de forma restrictiva de ninguna manera.

Ejemplo de realización

[0049] Se extrajo el cartílago de la articulación de la cabeza radial de una paciente de 37 años de edad, se limpió de todos restos tisulares y sanguíneos y se troceó en una placa de Petri con bisturíes. Se añadieron los trozos de cartílago sobre el colador de una cámara digestiva con un tubo magnético y se removieron con 50 ml de solución de hialuronidasa (25 mg hialuronidasa en 50 ml PBS (solución salina común tamponada con fosfato)) durante 25 minutos a 37 °C. Posteriormente se incubó el tejido con 50 ml 0.25 % peso tripsina/EDTA (45 minutos, 37 °C, removido) y se lavó 5 minutos con 50 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle-Medium, glucosa alta) más 10 % volumen FKS (suero de fetos de terneros). La eliminación de las células cartilagosas del apósito tisular se realizó con un tratamiento con colagenasa triple, en el cual el tejido fue incubado con 50 ml de solución de colagenasa (25 mg en 50 ml DMEM más 10 % volumen FKS más 100 U/ml penicilina más 100 µg/ml estreptomycin) bajo remoción a 37°C y se centrifugaron las células de la solución goteante (500 x g, 5 minutos). El tejido fue digerido con colagenasa en primer lugar durante 2 horas, posteriormente dos veces más durante la noche. A continuación se enjuagaron otras células mediante DMEM más 10 % volumen FKS del tejido y se centrifugaron como anteriormente.

[0050] Las células cartilagosas aisladas se introdujeron a continuación en una suspensión acuosa. La suspensión acuosa fue mezclada a continuación con una solución acuosa, que contenía el colágeno tipo IV. En la mezcla creada fueron co-incubadas las células cartilagosas y el colágeno tipo IV durante un período de aproximadamente 18 horas. A continuación se cargó un material portador biocompatible (scaffold) con la mezcla. Respecto al material portador se trataba de un material de un compuesto sobre la base de una primera capa membranosa y una segunda capa conformada esponjosa. La primera capa presentaba una membrana pericárdica. La segunda capa estaba formada esencialmente de gelatina reticulada. Según la carga del material del compuesto se dejó que transcurrieran aproximadamente 24 horas, para que la segunda capa conformada esponjosa pudiera ser infiltrada en suficiente medida por las células cartilagosas.

[0051] A continuación se implantó con éxito el material del compuesto así cargado en una región defectuosa del cartílago articular de la paciente anteriormente mencionada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Implante, que comprende un material portador, células cartilaginosas y/o sus células precursoras y un tipo de colágeno específico del cartílago, especialmente para su utilización en el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal, **caracterizado por el hecho de que** el tipo de colágeno específico del cartílago es colágeno tipo VI.
- 10 2. Implante según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** las células cartilaginosas y/o sus células precursoras son de origen autólogo o alógeno, preferiblemente autólogo.
- 15 3. Implante según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** en el caso de las células cartilaginosas se trata de células cartilaginosas primarias.
- 20 4. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** las células cartilaginosas y/o sus células precursoras se almacenan mediante una colonización *in vitro* o un cultivo *in vitro* en el implante.
- 25 5. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** el tipo de colágeno específico del cartílago es de origen animal, especialmente bovino, porcino y/o equino, y/o humano.
- 30 6. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** el tipo de colágeno específico del cartílago proviene de un tejido del grupo consistente en córnea ocular, tejido placentario, tejido aórtico y tejido sinovial.
- 35 7. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** el implante presenta condrones y/o fases previas de tipo condrón.
- 40 8. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** el material portador comprende un material seleccionado del grupo consistente en proteínas o sales de las mismas, polisacáridos o sales de los mismos, polihidroxicanoatos, membranas animales y combinaciones de los mismos.
- 45 9. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** el material portador está formado por varias capas, presenta preferiblemente al menos una primera capa y al menos una segunda capa, donde preferiblemente al menos la primera capa posee una estructura membranosa y al menos la segunda capa posee una estructura esponjosa.
- 50 10. Implante según una de las reivindicaciones anteriores para su utilización en la medicina regenerativa, especialmente para su utilización en el sector de la ingeniería de tejidos, en la curación de heridas, en el trasplante de células cartilaginosas autólogas o alógenas, en el trasplante de células madre mesenquimales autólogas o alógenas para la regeneración de cartílago, tendón, ligamento y/o hueso y/o para el tratamiento de daños y/o enfermedades del tejido cartilaginoso humano y/o animal.
- 55 11. Composición terapéutica, que incluye células cartilaginosas y/o sus células precursoras y un tipo de colágeno específico del cartílago, preferiblemente para su utilización en el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal, **caracterizada por el hecho de que** el tipo de colágeno específico del cartílago es colágeno tipo VI y existe la composición terapéutica en forma de suspensión acuosa.
- 60 12. Procedimiento para la fabricación de un implante según una de las reivindicaciones 1 hasta 10, que comprende los pasos:
- 65 a) Disposición de las células cartilaginosas y/o sus células precursoras y el tipo de colágeno específico del cartílago y
 b) Carga del material portador con las células cartilaginosas y/o sus células precursoras y el tipo de colágeno específico del cartílago.
13. Procedimiento para la fabricación de una composición terapéutica según la reivindicación 11, donde se mezclan una suspensión acuosa, que contiene células cartilaginosas y/o sus células precursoras, y una solución acuosa, que contiene un tipo de colágeno específico del cartílago, **caracterizado por el hecho de que** el colágeno específico del cartílago es colágeno tipo VI.
14. Aplicación de una suspensión acuosa, que contiene células cartilaginosas y/o sus células precursoras, y de una solución acuosa, que contiene un tipo de colágeno específico del cartílago, para la fabricación de una composición terapéutica, especialmente para su utilización en el tratamiento de daños y/o enfermedades en el área del aparato locomotor humano y/o animal, **caracterizadas por el hecho de que** el tipo de colágeno específico del cartílago se trata del colágeno tipo VI.

15. Utilización de un material portador, de células cartilaginosas y/o sus células precursoras y un tipo de colágeno específico del cartílago para la fabricación de un implante según una de las reivindicaciones 1 hasta 10, **caracterizado por el hecho de que** el tipo de colágeno específico del cartílago es colágeno tipo VI.