

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 053**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 35/32 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2001 E 01913858 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 1265986**

54 Título: **Procedimiento para la producción in vitro de tejido cartilaginoso u óseo tridimensional vital**

30 Prioridad:

13.03.2000 DE 10013223

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

08.04.2016

73 Titular/es:

**CO.DON AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
WARTHSTRASSE 21
14513 TELTOW, DE**

72 Inventor/es:

**LIBERA, JEANETTE;
ANDERER, URSULA;
FRITSCH, KARL-GERD y
JOSIMOVIC-ALASEVIC, OLIVERA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 566 053 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

Procedimiento para la producción in vitro de tejido cartilaginoso u óseo tridimensional vital

- 5 La invención se refiere a un procedimiento extremadamente sencillo para la producción in vitro de un agregado celular a base de tejido cartilaginoso u óseo tridimensional, vital y mecánicamente estable, y a su uso como material de trasplante para el tratamiento de defectos de cartílagos o huesos y de enfermedades degenerativas tales como, p. ej., reuma o artrosis, así como a su uso para el ensayo de principios activos y factores físicos. Conforme a la invención, se pueden producir los más diversos tejidos cartilaginosos y óseos, así, p. ej., cartílago fibroso o de tejido conjuntivo hialino y elástico tal como, por ejemplo, cartílago de las articulaciones, cartílago de la nariz, cartílago del menisco o cartílago del disco intervertebral.
- 10 En el sector de la ingeniería de tejidos se buscan desde hace tiempo soluciones para la formación de tejido propio del cuerpo. Para ello, se utilizan, por una parte, células propias del cuerpo con y sin material de soporte y, por otra, se incorporan en el defecto exclusivamente materiales de soporte, pudiendo utilizarse en cada caso, en función de la indicación, materiales resorbibles o no resorbibles.
- 15 En el caso de utilizar materiales de soporte es desventajoso que sus productos de degradación puedan dañar a otros tejidos y que, en el caso de utilizar materiales de soporte no autógenos, es decir, no propios del paciente, puedan presentarse reacciones inmunes o infecciones con gérmenes patógenos animales o humanos.
- 20 Un método conocido utilizando células propias del cuerpo es el trasplante de células cartilaginosas y óseas que se aplica para el tratamiento de defectos de cartílago y huesos. En este caso, se aprovecha el potencial de las células cartilaginosas y óseas para formar *in vivo* nuevo tejido. Así, por ejemplo, se toman del paciente biopsias de cartílago o huesos, de ellas se aíslan células cartilaginosas u óseas, se reproducen mediante cultivo celular y, a continuación, se trasplantan al paciente las células en la zona del defecto del tejido, p. ej., mediante inyección. Allí forman nuevo tejido y, por consiguiente, reponen por completo el defecto.
- Mediante los procedimientos mencionados se consigue que después de la aplicación de los trasplantes celulares o de la incorporación de los materiales de soporte en el cuerpo se forme tejido.
- 25 Otro objetivo en la ingeniería de los tejidos consiste, sin embargo, en producir ya previamente *in vitro* tejido propio del cuerpo. Para ello, se conoce de la bibliografía una pluralidad de procedimientos (véanse los documentos DE 195 40 487, WO 97/46665, DE 197 52 900, US 5.932.459) que requieren dispositivos o soportes especiales, contienen muchas etapas de procedimiento o hacen necesaria la adición de compuestos fomentadores del crecimiento que representan sustancias extrañas para el cuerpo. Por lo tanto, misión de la presente invención era proporcionar un
- 30 procedimiento en la medida de lo posible sencillo para la producción de tejido cartilaginoso u óseo típico, con el que se pueda producir tejido vital, tridimensional y mecánicamente estable que sea adecuado para el trasplante y garantice un rápido desarrollo en el cuerpo o bien una rápida subsanación del defecto del cartílago o hueso. Además, el tejido producido in vitro no debe de desencadenar, en la medida de lo posible, reacciones inmunológicas en el organismo que reciba el trasplante.
- 35 El documento US 5.723.331 da a conocer agregados celulares en forma de cilindro que, en función de las necesidades, se forman en pocillos diferentemente pre-conformados. Los pocillos pre-conformados se componen de fondos planos. De manera correspondiente, se forman trasplantes de cartílago planos que pueden ser integrados macro-quirúrgicamente en el fondo de la herida. Conforme al documento US 5.723.331 el cultivo se hace exclusivamente con sueros xenógenos.
- 40 En Franchimont et al., "Effects of hormones and drugs on cartilage repair" de Journal of Rheumatology, 1989, Vol. 16, páginas 5-9, se describe el cultivo en suspensión de condrocitos.
- 45 Fritsch et al. "Advances in autologous chondrocyte transplantation (ACT)" Primera conferencia anual sobre reparación, reemplazo y regeneración de tejido de Techvest, 27-28 de octubre, 1999, Nueva York describe la formación de racimos de cartílago después de 4 días de cultivo y que los condrocitos se reproducen en cultivo dentro de los primeros 15 días.
- Löhnert et al. "Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) im Kniegelenk; erste klinische Ergebnisse" de Arthroskopie, Vol. 12, 1999, páginas 34-42 describe la aplicación de condrocitos producidos in vitro mediante una cánula delgada en la zona del defecto.

5 Gruber et al. "Untersuchung zur In-vitro Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von autologem Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung der möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen-Erkrankungen"; Laryngo-Rhino-Otol. 75 (1996) 105-108, observa un comportamiento mejorado en la proliferación en el caso de condrocitos humanos cultivados con suero humano, minimizando el riesgo de una infección mediante priones.

Sorprendentemente, se encontró que este problema se puede resolver con el procedimiento sencillo indicado en la reivindicación 1.

10 Conforme a la invención, como material de partida se utilizan biopsias o muestras de tejido o células madre mesenquimales propias del paciente, p. ej., de la sangre periférica o médula ósea. A partir de las biopsias se aíslan con métodos habituales las células generadoras de tejido mediante digestión enzimática del tejido, mediante migración o mediante reactivos que reconocen células diana. Estas células se cultivan entonces de acuerdo con la invención de una manera sencilla con un medio de cultivo habitual en recipientes de cultivo celular con superficie hidrófoba y fondo que se estrecha en suspensión de manera estacionaria hasta que se forme un agregado celular tridimensional que contenga preferiblemente al menos 40% en volumen, preferiblemente al menos 60% en volumen hasta como máximo 95% en volumen de matriz extracelular (ECM), en el que están embutidas células diferenciadas. El agregado celular resultante presenta una zona exterior en la que están presentes células susceptibles de proliferación y migración. Esta formación de los agregados celulares obtenidos de acuerdo con la invención la explican las fotografías microscópicas en las Figs. 1 y 1a, representando la Fig. 1 el aumento en detalle de la sección transversal de un agregado celular de acuerdo con la invención, con vP como zona de la aparición de las primeras proteínas de la matriz específicas para el tejido y M como zona de la formación de proteínas de la matriz específicas del tejido, y mostrando la Fig. 1a todo el agregado celular con la zona externa de células P susceptibles de proliferación y susceptibles de migración (zona de la expresión de la proteína S 100).

25 Es sorprendente que todas las células que están integradas en los esferoides producidos según esta invención, sobrevivan y que no mueran las células en el interior, tampoco después de un tiempo de cultivo progresivo. Con un tiempo de cultivo progresivo se diferencian las células en el interior de los agregados y se forman esferoides que se componen de ECM, células diferenciadas y una zona de proliferación en el borde. El proceso de la formación de esta matriz específica para el tejido con células embutidas es muy similar al proceso de formación de tejido o bien de nuevo formación y de reestructuración del tejido en el cuerpo. Durante la diferenciación en el cultivo celular, la distancia de las células agregadas es cada vez mayor mediante la formación de la matriz específica para el tejido. En el interior de los esferoides se forma una histología del tejido que es muy similar al tejido natural. El abastecimiento de las células en el interior de los esferoides tiene lugar, al igual que también en el cartilago natural, únicamente mediante la difusión de las sustancias nutricias. Durante la producción ulterior de los esferoides se forma la zona de células susceptibles de proliferación y susceptibles de migración en el borde de los esferoides. Esta zona tiene la ventaja incalculable de que después de la incorporación de los esferoides en los defectos, las zonas que se encuentran en esta zona del borde están en condiciones de migrar y de crear activamente el contacto con el tejido circundante o bien posibilitar una integración del tejido formado in vitro en su entorno. Con ello, los agregados celulares específicos para tejidos producidos son extraordinariamente adecuados para el tratamiento de defectos de tejidos y para la regeneración de tejido in vitro e *in vivo*.

40 En función del tamaño del defecto del tejido a tratar puede ser ventajoso trasplantar ya grandes trozos de tejido con el fin de alcanzar una rápida subsanación del defecto. Para este caso se fusionan al menos dos, pero mejor más de dos agregados celulares obtenidos, al continuar cultivándolos hasta el tamaño deseado conjuntamente bajo las mismas condiciones y en los mismos recipientes de cultivo que los arriba descritos.

La Fig. 1b muestra dos esferoides a fusionar después de un día.

45 La Fig. 1c muestra que ya algunas horas más tarde ya no se puede reconocer el límite entre los dos esferoides. Después de otra semana, los esferoides están completamente fusionados y ha resultado un gran trozo de tejido in vitro (Fig. 1d). La formación de los grandes agregados celulares, así obtenidos, es idéntica a la de los esferoides primeramente obtenidos. Pueden contener como máximo 95% de ECM y todas las células contenidas en el trozo de tejido obtenido son vitales.

50 El tejido cartilaginoso u óseo obtenido es extremadamente estable. Los agregados celulares pueden comprimirse hasta ¾ de su diámetro sin que se rompan o se desintegren, por ejemplo al inyectarlos en el cuerpo mediante una cánula. Es posible retirar del recipiente del cultivo celular estos trocitos de tejido con unas pinzas o una pipeta.

Con el fin de disponer de células cartilaginosas u óseas suficientes para el cultivo en suspensión de acuerdo con la invención, las células obtenidas del paciente, en una forma de realización ventajosa de la invención, se cultivan primeramente en un cultivo monocapa de manera en sí conocida. El paso de las células en el cultivo monocapa se mantiene lo más bajo posible. Después de alcanzar el estadio confluyente, las células desarrolladas en la monocapa se recolectan y se cultivan conforme al procedimiento de acuerdo con la invención en suspensión, tal como se describe arriba.

Como medio de cultivo celular puede utilizarse, tanto para el cultivo en suspensión como para el cultivo en monocapa, medio habitual, p. ej., *MEM de Dulbecco*, bajo adición de suero. Preferiblemente, se emplea DMEM y Hams en la relación 1:1. Con el fin de evitar, sin embargo, reacciones inmunológicas del paciente sobre el tejido producido in vitro, se emplea como suero preferiblemente suero autógeno del paciente. También es posible utilizar suero xenógeno o alógeno.

Al medio de cultivo no se añaden, conforme a la invención, antibióticos, fungiestáticos u otros coadyuvantes. Se ha demostrado que sólo el cultivo autógeno, xenógeno o alógeno de las células y agregados celulares, así como el cultivo sin antibióticos y fungiestáticos posibilita una morfología inafectada, así como una diferenciación de las células en el cultivo monocapa y una formación no perturbada de la matriz específica en los agregados celulares. Además, mediante la renuncia a todos los aditivos durante la producción después de la incorporación del tejido producido in vitro en el organismo humano y también animal, están excluidas todas las reacciones inmunológicas.

No obstante, es sorprendente que ni en el caso del cultivo en suspensión ni en el caso del cultivo monocapa sean necesarios factores de crecimiento u otros aditivos fomentadores del crecimiento. A pesar de la ausencia de estos aditivos se obtienen, ya después de un cultivo en suspensión de acuerdo con la invención de dos días, agregados celulares tridimensionales con propiedades específicas para el tejido. El tamaño depende naturalmente del número de células incorporado por volumen de medio de cultivo. Por ejemplo, si se incorporan 1×10^7 células en 300 μ l de medio de cultivo, entonces se forman, en el espacio de 1 semana, esferoides tridimensionales de aprox. 500-700 μ m de diámetro. Para un defecto de tejido de 1 cm^2 , se deberían trasplantar, p. ej., inyectar 100 esferoides de este tipo. La otra posibilidad es la fusión in vitro de los pequeños agregados celulares para formar agregados mayores - tal como se ha descrito arriba - y la incorporación de éstos en el defecto. Preferiblemente, de acuerdo con la invención se utilizan entre 1×10^4 y 1×10^7 células en 300 μ l de medio de cultivo para la producción de los agregados celulares pequeños, de manera particularmente preferida 1×10^5 células. Los esferoides formados al cabo de algunos días se cultivan entonces durante al menos 2-4 semanas, en función del tipo de célula y de las características específicas del paciente, en el medio de cultivo adecuado, con el fin de inducir la formación de la matriz específica para el tejido. En casos especiales, pueden entonces fusionarse esferoides individuales a partir de aprox. una semana de cultivo con el fin de aumentar el tamaño del trozo de tejido.

Como recipientes de cultivo celular deben emplearse para el cultivo de acuerdo con la invención en suspensión aquellos con una superficie hidrófoba, es decir, que impide la adherencia tal como, p. ej., poliestireno o teflón. Recipientes de cultivo celular con superficie no hidrófoba pueden ser hidrofobizados mediante revestimiento con agar o agarosa. No son necesarios otros aditivos. Preferiblemente, como recipientes de cultivo celular sirven placas con pocillos. En este caso, para la producción de los agregados celulares pequeños, pueden encontrar aplicación, por ejemplo, placas de 96 pocillos, y para la producción de los agregados fusionados, placas de 24 pocillos.

De acuerdo con la invención, los recipientes de cultivo celular deben presentar un fondo que se estrecha, preferiblemente curvado. Se ha demostrado que el tejido de acuerdo con la invención no se forma con un fondo plano. Evidentemente, la depresión sirve para encontrar las células.

La presente invención da a conocer también el tejido cartilaginoso u óseo producido según el procedimiento arriba descrito, el cual puede encontrar aplicación como material de trasplante autógeno, xenógeno o alógeno en el tratamiento de defectos de cartílago o huesos y de enfermedades degenerativas tales como, p. ej., artrosis o reuma. Para ello, los agregados celulares producidos in vitro de acuerdo con la invención se incorporan mediante inyección en el tejido enfermo o degradado. Para ello, la aguja de inyección u otro sistema de aplicación adecuado tiene que tener al menos el diámetro de los esferoides. Las células en la zona de las células susceptibles de proliferación y susceptibles de migración en el borde de los esferoides crecen rápidamente en el tejido circundante y posibilitan una unión rápida del tejido producido in vitro y representan un potencial para la reconstitución de tejido en el entorno de los esteroides, dado que estas células proliferan todavía y forman matriz. Este tratamiento puede tener lugar artroscópicamente, en un avance con respecto a procedimientos habituales en la ingeniería de los tejidos.

La presente invención da a conocer también preparados terapéuticos que comprenden el tejido cartilaginoso u óseo de acuerdo con la invención, p. ej., disoluciones para inyección.

La presente invención da a conocer también el uso de tejido cartilaginoso u óseo de acuerdo con la invención para el ensayo de diferentes factores tales como, p. ej., sustancias activas y factores físicos que influyen, p. ej., sobre la formación y diferenciación de la matriz y células, en donde los factores físicos pueden ser, p. ej., presión o campos eléctricos. Para ello, los esferoides celulares se producen de acuerdo con la invención y se añaden, en diferentes estadios de maduración, a los medicamentos a ensayar y caracterizan a los parámetros más diversos de la formación y maduración de esferoides. Estos ensayos son muy específicos para el paciente en comparación con los ensayos de medicamentos habituales en animales o sistemas de tumores mediante el uso de sólo material autólogo y posibilitan un diagnóstico individual.

En lo que sigue se ha de explicar con mayor detalle la invención en ejemplos de realización, sin limitarla a los mismos.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Producción in vitro de tejido cartilaginoso

De pacientes se toma una biopsia de una zona del cartílago hialino sano. De esta biopsia se aíslan los condrocitos mediante digestión enzimática mediante incubación con disolución de colagenasa. Después de la separación de las células aisladas del tejido cartilaginoso no digerido, éstas se transfieren a frascos de cultivo celular y, bajo la adición de medio de cultivo DMEM / Hams F12 (1/1) y suero autólogo al 10% del paciente, se incuban a 37°C y 5% de CO₂. Dos veces por semana se lleva a cabo un cambio de medio. Después de alcanzar el estadio confluyente, la capa de células se lava con solución salina fisiológica y se recoge mediante tripsina de la superficie del cultivo celular. Después de un lavado adicional, se transfieren 1×10^5 células en cada caso en un recipiente de cultivo celular que está revestido con agarosa. Al cabo de un día, las primeras células se han dispuesto en agregados. Estos agregados se abastecen cada 2 días con medio reciente y se cultivan durante al menos 2 semanas. Ya después de una semana se detectaron en los agregados colágeno tipo II y proteoglicanos. Para ello, se utiliza un anticuerpo específico contra colágeno tipo II. El anticuerpo primario unido a colágeno tipo II se detectó con ayuda de un segundo anticuerpo y un sistema ABC acoplado al mismo. Es decir, al 2º anticuerpo está acoplada, a través de avidina-biotina, la enzima fosfatasa alcalina que reacciona con el sustrato fucsina, formándose un colorante rojo.

Los proteoglicanos se detectaron mediante tinción de Goldner. Colágeno de tipo II y proteoglicanos son componentes de la matriz del cartílago *in vivo* y representan las proteínas estructurales más importantes que son de importancia decisiva para la función del cartílago.

En la capa externa de los agregados se detectó en el mismo momento la proteína S 100 específica para células cartilaginosas. S 100 no es expresada en el tejido óseo y el tejido conjuntivo. Solamente estos tejidos podrían también formarse en este caso. Por consiguiente, se detectó inequívocamente que el tejido desarrollado es tejido cartilaginoso.

Al cabo de 1-2 semanas de cultivo, las células se encuentran todavía muy próximas una junto a otra. Con un tiempo creciente del cultivo, aumenta la proporción de la matriz extracelular y disminuye la proporción de células. Al cabo de una semana se puede detectar al menos el 40% de ECM y después de 3 semanas se desarrolló ya aprox. el 60% de ECM. Después de 3 meses de cultivo del tejido cartilaginoso, la proporción de ECM ha aumentado hasta 80-90%. Es decir, en el interior de los agregados producidos se constituyó tejido a modo de cartílago que, en su estructura, corresponde al cartílago *in vivo* y también puede adoptar la función del tejido cartilaginoso.

Ejemplo 2: Trasplante de tejido cartilaginoso

El tejido producido en el Ejemplo 1 (aprox. 200 esferoides de en cada caso 1×10^5 células) se recogió en solución salina fisiológica y se inyectó en un defecto de cartílago del voluntario de aprox. 1 cm^2 de tamaño cubierto con periostio. Se comprobó que el defecto del cartílago ya se había rellenado en el espacio de 1 a 2 meses con tejido cartilaginoso, mientras que mediante el trasplante actual de células cartilaginosas jóvenes, únicamente cultivadas in vitro, sólo se puede registrar un relleno de un defecto de un tamaño de este tipo sólo después de 6-12 meses. El tejido cartilaginoso producido in vitro de acuerdo con la invención garantiza, por lo tanto, junto al cumplimiento de la función mecánica del tejido producido, la rápida integración de los trozos de tejido producidos mediante las células susceptibles de proliferación y susceptibles de migración en la capa externa de los agregados. Por consiguiente, la estructura y función de los trozos de tejido permite también la rápida reparación de defectos y tejido cartilaginoso degenerado.

Ejemplo 3: Producción in vitro de tejido óseo

De pacientes se toma una biopsia de una zona del hueso esponjoso. De esta biopsia se aíslan los osteoblastos mediante digestión enzimática mediante incubación con disolución de colagenasa. Después de la separación de las células aisladas del tejido óseo no digerido, éstas se transfieren a frascos de cultivo celular y, bajo la adición de medio de cultivo DMEM / Hams F12 (1/1) y suero autólogo al 10% del paciente, se incuban a 37°C y 5% de CO₂. Dos veces por semana se lleva a cabo un cambio de medio. Después de alcanzar el estadio confluyente, la capa de células se lava con solución salina fisiológica y se recoge mediante tripsina de la superficie del cultivo celular. Después de un lavado adicional, se transfieren 1×10^5 células en cada caso en un recipiente de cultivo celular que está revestido con agarosa. Al cabo de un día, las primeras células se han dispuesto en agregados. Estos agregados se abastecen cada 2 días con medio reciente y se cultivan durante al menos 2 semanas.

Ya después de una semana se detectaron en los agregados colágeno tipo I y proteoglicanos. Para ello, se utiliza un anticuerpo específico contra colágeno tipo I. Mediante la detección de colágeno I se detectó, sin lugar a dudas, que no se trata de tejido cartilaginoso. El anticuerpo primario unido a colágeno tipo I se detectó con ayuda de un segundo anticuerpo y un sistema ABC acoplado al mismo. Es decir, al 2º anticuerpo está acoplada, a través de avidina-biotina, la enzima fosfatasa alcalina que reacciona con el sustrato fucsina, formándose un colorante rojo.

Los proteoglicanos se detectaron mediante tinción de Goldner como en el Ejemplo 1. Colágeno de tipo I y proteoglicanos son componentes de la matriz del hueso *in vivo* y representan las proteínas estructurales más importantes que son de importancia decisiva para la función del hueso.

En la capa externa de los agregados se detectaron en el mismo momento células óseas susceptibles de proliferación.

Al cabo de 2 semanas de cultivo, las células se encuentran todavía muy próximas una junto a otra. Con un tiempo creciente del cultivo, aumenta la proporción de la matriz extracelular y disminuye la proporción de células. Al cabo de una semana se puede detectar al menos el 40% de ECM y después de 3 semanas se desarrolló ya aprox. el 60% de ECM. Es decir, en el interior de los agregados producidos se constituyó tejido a modo de hueso que, en su estructura, corresponde al hueso *in vivo* y también puede adoptar la función del tejido óseo.

Ejemplo 4: Trasplante de tejido óseo

El tejido producido en el Ejemplo 3 (aprox. 50 trozos) se recoge en solución salina fisiológica y se inyecta en la zona de una fractura de hueso de difícil curación. Se comprobó que se podía inducir el proceso de la curación del hueso y que ya al cabo de 3 semanas se había formado nuevo tejido óseo, mientras que en el caso de no se hubiera tratado el defecto, la curación de la fractura sólo habría tenido lugar al cabo de meses. El tejido óseo cultivado *in vitro* garantiza, por lo tanto, la rápida integración del tejido en el tejido circundante y la subsanación de defectos de huesos. Por consiguiente, la estructura y función de los trozos de tejido permite la curación de defectos de huesos, la inducción de la osteosíntesis y el tratamiento de enfermedades degenerativas de los huesos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción *in vitro* de un agregado celular a base de tejido cartilaginoso u óseo tridimensional, vital, que es un esferoide, caracterizado por que células cartilaginosas, células óseas o células madre mesenquimales obtenidas de un organismo humano o animal se cultivan en recipientes de cultivo celular con superficie hidrófoba y fondos que se estrechan en forma de cultivo en suspensión bajo la adición de suero autógeno o suero autólogo y sin factores de crecimiento y sin antibióticos y sin fungiestáticos hasta que resulta un agregado celular, que es un esferoide y que contiene hasta al menos 40% en volumen de matriz extracelular (ECM) en la que están embutidas células diferenciadas, y que presenta una zona externa en la que están presentes células susceptibles de proliferación y de migración.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las células cartilaginosas u óseas obtenidas del material explantado se cultivan primero en cultivo monocapa y, a continuación, se efectúa el cultivo en suspensión conforme a la reivindicación 1.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que en función del tamaño de tejido deseado se fusionan al menos dos de los agregados celulares resultantes, que son esferoides, al continuar cultivándose en suspensión conjuntamente en recipientes de cultivo celular con superficie hidrófoba y fondos que se estrechan.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que como recipientes de cultivo celular se emplean placas con pocillos.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que recipientes de cultivo celular con superficie no hidrófoba se hidrofobizan mediante revestimiento con agar o agarosa.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el cultivo se lleva a cabo en cultivo en suspensión hasta que el agregado celular obtenido presente al menos 60% de ECM.

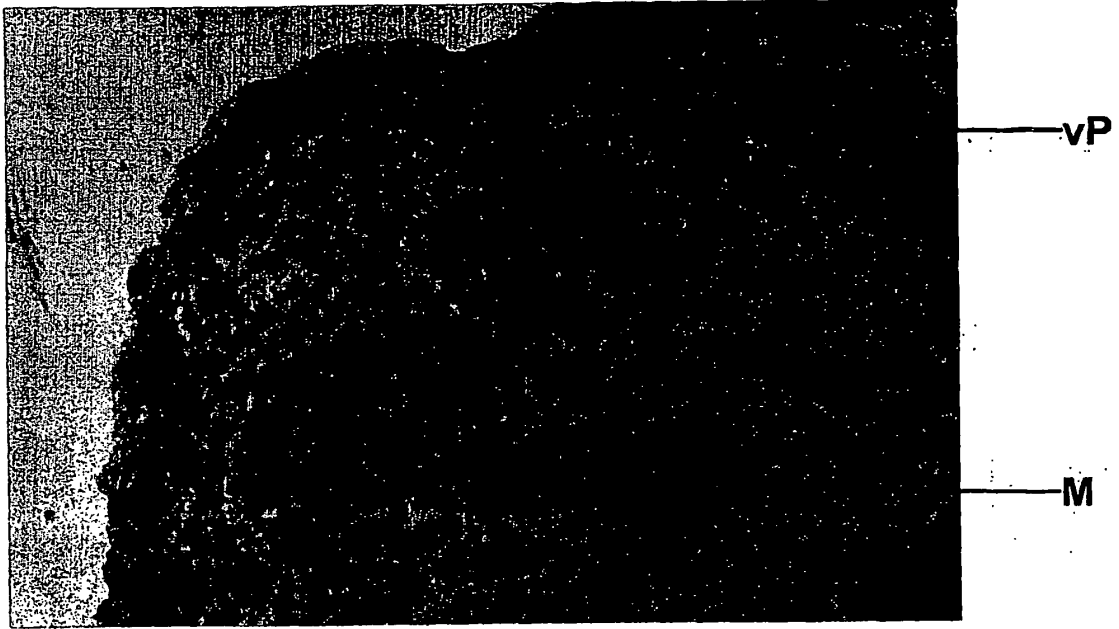


Fig . 1

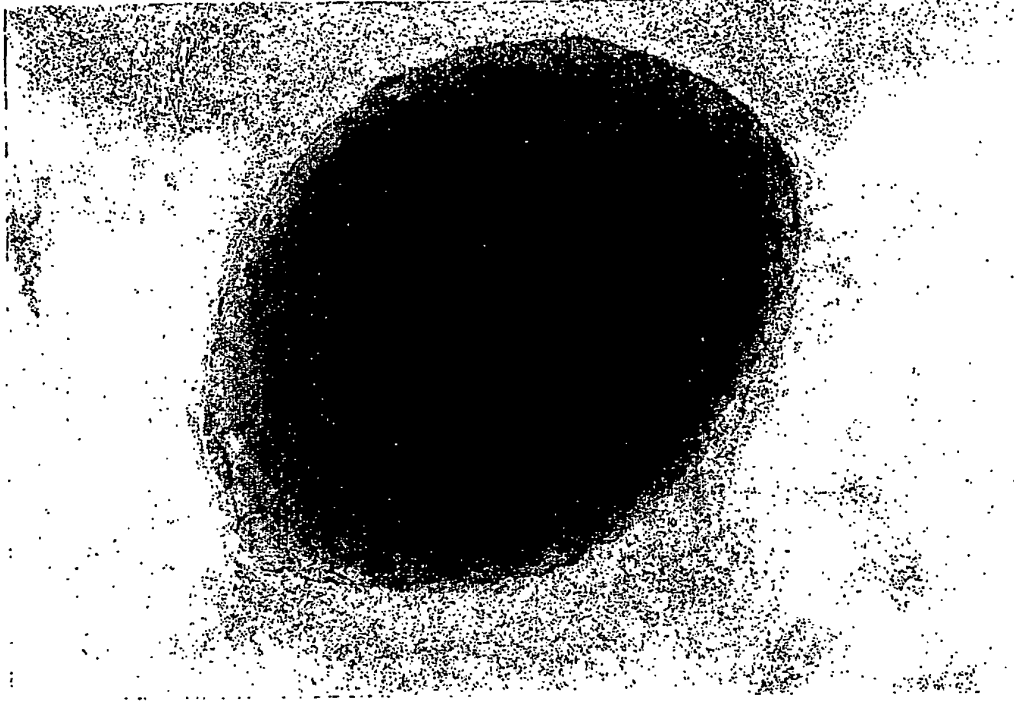


Fig. 1a

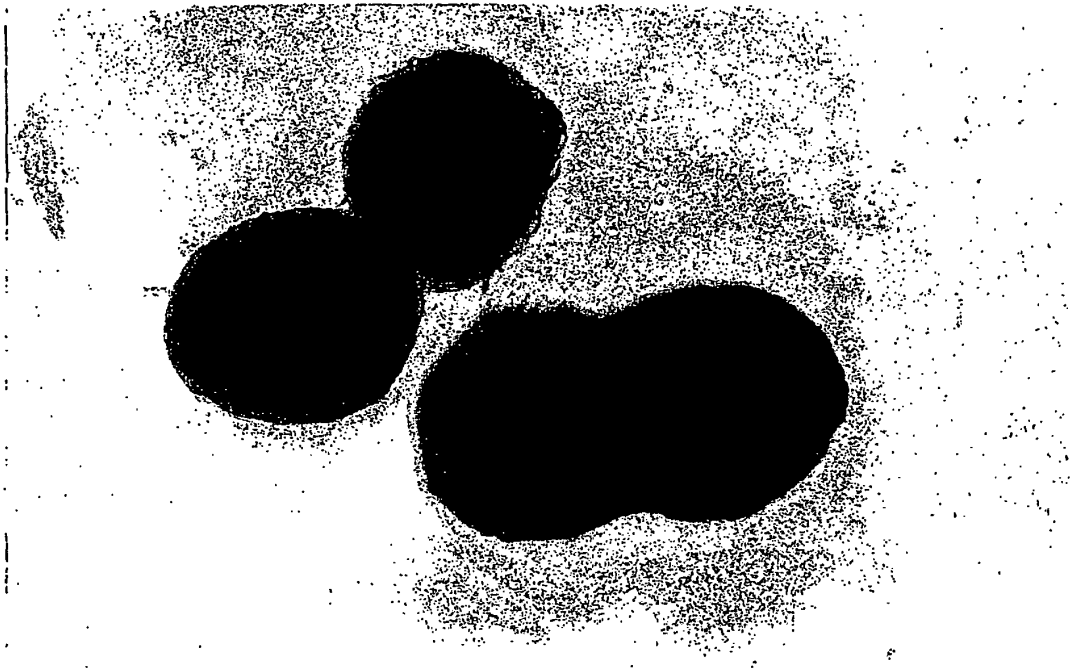


Fig . 1b

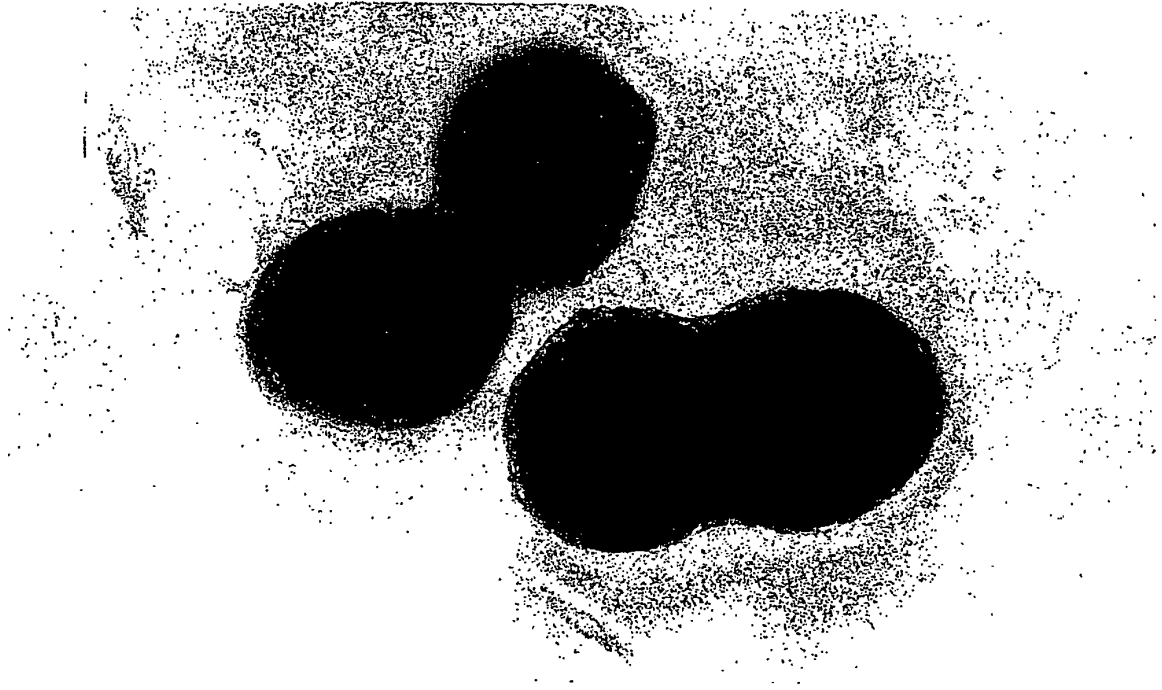


Fig. **1c**

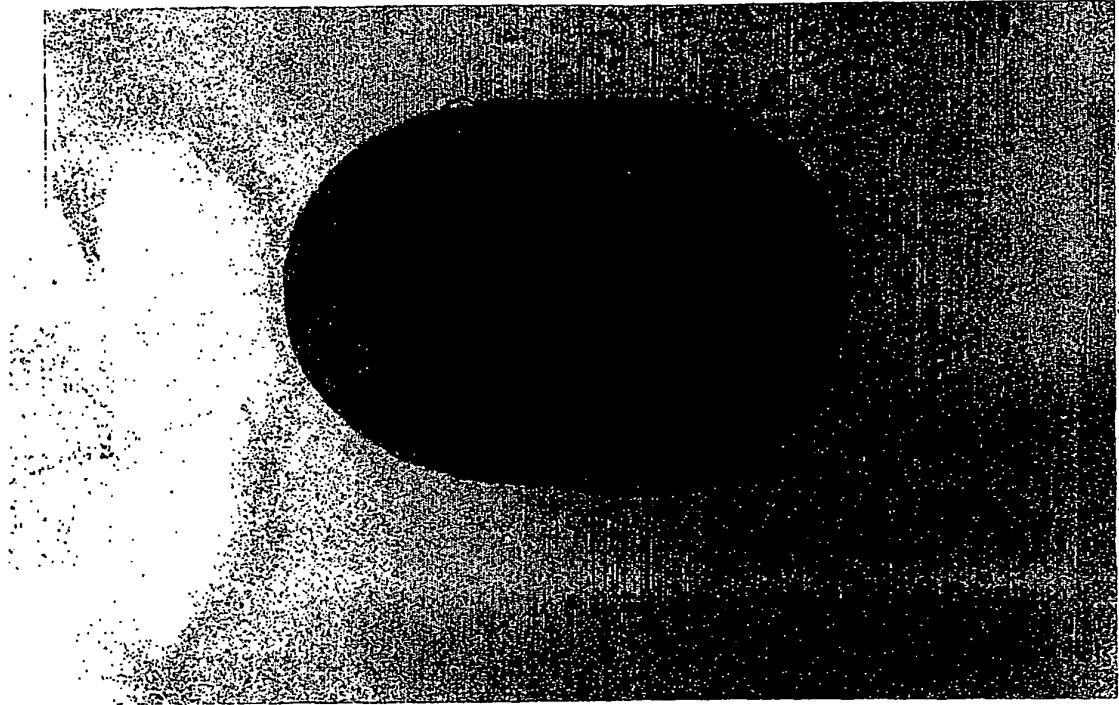


Fig. . 1d