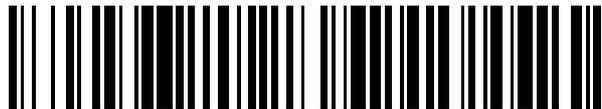


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 733**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2004 PCT/DE2004/002761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2005 WO05055877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2004 E 04816270 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 1706157**

54 Título: **Procedimiento para la producción de trasplantes de células de disco intervertebral y su aplicación como material de trasplante**

30 Prioridad:

**12.12.2003 DE 10359830  
17.02.2004 US 544315 P  
06.09.2004 DE 102004043449**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2017**

73 Titular/es:

**CO.DON AG (100.0%)  
Warthestr. 21  
14513 Teltow, DE**

72 Inventor/es:

**JOSIMOVIC-ALASEVIC, OLIVERA;  
LIBERA, JEANETTE;  
METHNER, VILMA y  
MEISEL, HANS-JÖRG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 600 733 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 de trasplantes de células de disco intervertebral y su aplicación como material de trasplante

5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de trasplantes de células de disco intervertebral mixtos autólogos tal como se describe en las reivindicaciones así como a un trasplante de células de disco intervertebral mixto autólogo que se puede obtener con este procedimiento.

10 La invención se refiere a un procedimiento para la producción *in vitro* de trasplantes de condrocitos de disco intervertebral de tejido enfermo de disco intervertebral de pacientes y su aplicación como material de trasplante para el tratamiento de discos intervertebrales enfermos. Además, la invención se refiere a tejido de cartílago de disco intervertebral tridimensional, vital y mecánicamente estable y a su uso como material de trasplante para el tratamiento de discos intervertebrales enfermos así como para ensayar principios activos. Además, son objeto de la invención los trasplantes producidos de células de disco intervertebral y la técnica de trasplante y los tejidos de cartílago de disco intervertebral producidos y preparaciones terapéuticas, por ejemplo, soluciones para inyección que contienen este tejido y los trasplantes de células.

20 La degeneración de los discos intervertebrales se desencadena durante el envejecimiento o por un traumatismo y provoca dolores agudos y crónicos e inestabilidades en la columna vertebral. Más de 300.000 pacientes en Europa padecen afecciones de disco intervertebral. Aproximadamente el 70 % de los pacientes que padecen una hernia de disco intervertebral y son tratados mediante discectomía continúan padeciendo dolores de espalda. Los intensos dolores permanentes hacen necesario un tratamiento quirúrgico adicional en el 10 % de estos pacientes (Yorimitsu *et al.*, 2001). El motivo de esto es la disminución, debida a la cirugía, de la altura del disco intervertebral, el aumento asociado a ello de la carga local del tejido de disco intervertebral (Brinckmann y Grootenboer, 1991) y, sobre todo, la falta de cicatrización y regeneración del tejido de disco intervertebral destruido y retirado (Lundon y Bolton, 2001, Meakin *et al.*, 2001). Con el avance del tiempo, esta inestabilidad del disco intervertebral afectado da como resultado cambios degenerativos de los discos intervertebrales adyacentes, por lo que se hacen necesarias intervenciones quirúrgicas adicionales y, en el peor de los casos, una fusión de los cuerpos vertebrales o la inserción de una prótesis. Por ello, la reparación o regeneración biológica del disco intervertebral es el futuro del tratamiento de los discos intervertebrales degenerados.

35 Un método conocido para la regeneración biológica de un tejido es el trasplante de condrocitos mediante el uso de células propias del cuerpo, que se aplica para el tratamiento de defectos de cartílago articular. A este respecto se aprovecha el potencial de los condrocitos articulares para generar nuevo tejido *in vivo* después del trasplante de las células. Para esto se extrae del paciente una biopsia de cartílago articular, a partir de ello se aíslan los condrocitos, se multiplican mediante cultivo celular y a continuación se trasplantan al paciente la zona del defecto tisular, por ejemplo, mediante inyección. Allí forman nuevo tejido y de este modo rellenan el defecto. Gracias a estos procedimientos se consigue que se genere tejido después de la aplicación de un trasplante de células en el cuerpo.

40 En principio, esta metodología no es aplicable para el tratamiento de la degeneración de disco intervertebral, ya que no se puede extraer de los pacientes, por motivos éticos, material de partida alguno de un disco intervertebral adyacente intacto y, a priori, no se puede usar tejido enfermo.

45 Los primeros enfoques para el reemplazo biológico del disco intervertebral parten del uso de tejido sano de disco intervertebral. Así, Handley (documento US 6.080.579) y Ferree (documento US 6.340.369 B1) describen el uso de tejido normal de disco intervertebral para el aislamiento de células de disco intervertebral y la combinación de estas células con un soporte biorreabsorbible. También muchos trabajos científicos se basan en el uso de tejido normal de disco intervertebral: Okuma *et al.*, 2000, Gruber *et al.*, 2000, Chelberg *et al.*, 1995. Sin embargo, un disco intervertebral sano de un paciente no puede servir de fuente de tejido para el tratamiento de otro disco intervertebral, ya que la retirada de tejido conduce a una destrucción, a la degeneración y, por tanto, a la pérdida de la función de este disco intervertebral. Otro enfoque es el uso de tejido de núcleo pulposo degenerado que se retira del interior de un disco intervertebral degenerado y se trata. En esta intervención quirúrgica se continúa destruyendo el disco intervertebral ya de por sí degenerado y destruido. El tratamiento del tejido, a este respecto, por un lado se propone como deshidratación (documento US 6.648.918) o la combinación de las células que se encuentran en su interior con un material de soporte (documento US 6.569.442; documento US2001/0020476 A1) y el posterior trasplante de vuelta a estos discos intervertebrales degenerados. No obstante, el tejido deshidratado no contiene células vivas y, por tanto, no representa un método de regeneración biológica. La combinación propuesta de las células del núcleo o de otras células con un material de soporte tampoco representa un método biológico puro y condiciona el uso de un material de soporte adecuado que, por ejemplo, debe ser biomecánicamente adecuado, que se debe degradar en la misma medida en la que se ha de generar nuevo tejido, que no debe obstaculizar la formación de nuevo tejido o, por ejemplo, en todo caso no debe desencadenar reacción inmunológica alguna a causa de los materiales sintéticos, alogénicos o xenogénicos usados. Otra posibilidad de tratamiento sería el uso de discos intervertebrales de otros pacientes, tratándose por tanto de un trasplante alogénico (documento 6.344.058; Keith DK *et al.*, 2003). Sin embargo, en este caso la reacción inmunológica representa un problema y mediante la mera introducción de un disco intervertebral de donante probablemente tampoco se desencadenará una regeneración biológica del disco intervertebral afectado.

El documento US2003165473 describe la producción de tejido de disco intervertebral de células del anillo fibroso, del núcleo pulposo y de la placa terminal.

5 Por los programas mencionados, por lo tanto, para el tratamiento de disco intervertebrales degenerados y para la regeneración de disco intervertebral, los objetivos generales consisten en: usar una muestra de tejido o células de partida que se pueda defender médica y éticamente, no destruir otros discos intervertebrales o el disco intervertebral enfermo afectado del paciente, usar solo materiales propios del paciente (terapia autóloga), encontrar condiciones de aislamiento y condiciones de cultivo de células óptimas para la multiplicación de las células de disco intervertebral y posterior formación de matriz de disco intervertebral, prescindir de materiales de soporte para evitar reacciones inmunitarias. Estos problemas se pueden resolver mediante el trasplante de un trasplante de células autólogas especial o mediante el trasplante de un tejido de cartílago de disco intervertebral tridimensional prefabricado fuera del cuerpo.

15 Por tanto, el objetivo de la presente invención era facilitar procedimientos para la producción de trasplantes de condrocitos de disco intervertebral y tejido de cartílago de disco intervertebral vital estable que fuesen adecuados para el trasplante autólogo, para la regeneración rápida y la conservación de la función del disco intervertebral. A este respecto es esencial que el material de partida para la producción de los trasplantes de células se pueda extraer de forma médica y éticamente defendible y que las células de disco intervertebral cultivadas de forma autóloga no cambien sus propiedades a lo largo del periodo de tiempo desde la extracción hasta el trasplante y presenten una elevada capacidad de proliferación y de diferenciación.

25 Sorprendentemente, se ha podido mostrar que como material de partida se puede usar tejido enfermo de disco intervertebral. Hasta ahora se ha supuesto que no es posible aislar, de tejido degenerado, células adultas en una cantidad suficiente que sean vitales, que proliferen suficientemente y que a continuación incluso todavía estén en disposición de diferenciarse con especificidad de tejido y generar tejido de disco intervertebral, ya que en tejidos que están sometidos a una degeneración, las células específicas de tejido cambian sus propiedades en relación con la síntesis de matriz y también mueren y son reemplazadas por otras células con otras propiedades inespecíficas de tejido. Sin embargo, sorprendentemente, se ha podido aislar, en particular de tejido herniado de disco intervertebral degenerado, una cantidad suficiente de células vitales. El tejido herniado de disco intervertebral degenerado está compuesto de partes de disco intervertebral del anillo fibroso y del núcleo pulposo, proliferando incluso las células aisladas de las dos regiones tisulares (células de anillo fibroso y células de núcleo pulposo) en las condiciones de cultivo autólogas dadas y diferenciándose de forma particularmente específica con especificidad de tejido. De este modo, estos trasplantes de células mixtas son adecuados para una terapia basada en células para restablecer la función del disco intervertebral.

35 Por tanto, se ha descrito por primera vez un procedimiento mediante el cual se pueden producir trasplantes de células de disco intervertebral mixtos autólogos particulares que, después del trasplante en un disco intervertebral lesionado/enfermo, mediante la generación de nuevo tejido de disco intervertebral permite la conservación del disco intervertebral y, por lo tanto, el restablecimiento de la función neurológica y mecánica de la columna vertebral en una afección de disco intervertebral o después de una hernia de disco intervertebral.

45 Incluso con una degeneración avanzada del disco intervertebral, es decir, incluso con degeneración o lesión traumática de la capa externa del disco intervertebral (anillo fibroso), mediante la presente invención se posibilita el restablecimiento y la conversión de la función neurológica, biológica y mecánica del disco intervertebral cuando de discos intervertebrales degenerados herniados se aíslan células mixtas de tejido que, a continuación, se cultivan hasta dar un tejido tridimensional autólogo sin el uso de materiales de soporte. El tejido aislado de disco intervertebral, es decir, las células de disco intervertebral se multiplican en condiciones de cultivo autólogas solo con la adición de suero del propio paciente en el medio de cultivo celular en monocapa. Preferentemente, las células de disco intervertebral aisladas de tejido herniado de disco intervertebral degenerado durante la multiplicación se cultivan en un medio de cultivo celular que contiene el 1-20 % de adición de suero autólogo y cuya relación de medio alfa-MEM y medio HAM-F12 se encuentra entre 2:1 y 1:2 y a 36,8-37 °C, el 5 % de dióxido de carbono contenido en el aire y una humedad del aire del 85-95 %, por lo que su síntesis de proteínas de matriz y marcadoras no cambia.

55 Además, se prefiere que las células aisladas de disco intervertebral se cultiven después de su multiplicación en monocapa en un medio de cultivo celular que contiene el 1-20 % de adición de suero autólogo y cuya relación de medio alfa-MEM y medio HAM-F12 se encuentra entre 2:1 y 1:2 y a 36,8-37 °C, el 5 % de dióxido de carbono contenido en el aire y una humedad del aire del 85-95 % y, por ello, tienen capacidad de diferenciación y forman estructuras de matriz que comprenden proteínas de matriz de disco intervertebral específicas.

60 Además, se prefiere que las células aisladas de disco intervertebral después de su multiplicación en monocapa se congelen en una solución del 10 % de DMSO, el 20 % de suero y el 70 % de medio de cultivo y se vuelvan a descongelar y, así, sus propiedades en relación con la síntesis de componentes de matriz específicos y marcadores no cambian y generan estructuras tisulares *in vitro* e *in vivo* que estén compuestas de proteínas de matriz específicas de disco intervertebral.

Las características descritas de la síntesis no modificada de proteínas marcadoras y de matriz no representan un objetivo o función deseada que se deba conseguir, sino que son la consecuencia de las etapas de cultivo. La mención de estas características se efectúa únicamente con motivo de una aclaración. Con la divulgación de estas características, por consiguiente, se quiere aclarar qué consecuencias tienen las etapas de uso o de procedimiento de acuerdo con la invención.

La formación de las estructuras de matriz que comprenden proteínas de matriz de disco intervertebral específicas, por tanto, no es una propiedad que se pretende obtener, sino que la formación de las estructuras mencionadas de matriz resulta a partir de las condiciones de cultivo.

Preferentemente, las células aisladas del tejido de disco intervertebral se cultivan en un recipiente de cultivo con superficie hidrófoba y fondo que se estrecha, por lo que se obtienen los agregados celulares tridimensionales.

En el tratamiento con los trasplantes de células de disco intervertebral de acuerdo con la invención es ventajoso que antes del trasplante, la envoltura externa del disco intervertebral, el anillo fibroso, que se ha lesionado por la salida del tejido de disco intervertebral, cure de tal manera que ya no pueda salir líquido, como los trasplantes de células producidos, del interior del disco intervertebral. Este periodo de tiempo depende de cada paciente. Durante este periodo de tiempo se producen los trasplantes de células de disco intervertebral, obteniendo las células de disco intervertebral mixtas durante la multiplicación en el cultivo celular sus propiedades específicas de tejido en relación con su potencial de diferenciación y, por tanto, el éxito del trasplante. A diferencia de esto, este potencial en caso de cultivo independiente de las células de anillo fibroso y núcleo pulposo se reduce, no expresándose después del paso al entorno tridimensional algunos marcadores específicos de disco intervertebral. Por lo tanto, solo los cultivos mixtos son particularmente adecuados para generar tejido de disco intervertebral después de su trasplante a un disco intervertebral degenerado.

Además, los trasplantes de células y tejido producidos *in vitro* no deben desencadenar reacciones inmunológicas en el organismo que recibe el trasplante. Sorprendentemente, se ha encontrado que estas células y tejidos producidos de forma autóloga de acuerdo con la invención no desencadenan reacciones inmunológicas.

El tejido de disco intervertebral enfermo propio del paciente extraído se puede continuar tratando de diferente modo:

(a) De las biopsias se aíslan las células mixtas de disco intervertebral mediante digestión enzimática del tejido, mediante migración o mediante reactivos que reconocen células diana con métodos habituales. Estas células se cultivan entonces solo con adición de suero propio del paciente y sin adición de compuestos exógenos que fomenten el crecimiento y sin la adición de antibióticos y con medio de cultivo habitual en recipientes de cultivo celular y se multiplican hasta que esté disponible una cantidad suficiente de células (Fig. 2). Este tiempo se mantiene tan corto como sea posible para no cambiar sus propiedades fenotípicas. Después de una suficiente multiplicación de las células, las mismas se recogen y se facilita el trasplante de células compuesto de una suspensión de células de disco intervertebral para usos terapéuticos. De acuerdo con la invención, las células aisladas de disco intervertebral se usan en una mezcla, es decir, las células no se clasifican y separan por células de anillo fibroso y de núcleo pulposo, cuyas fracciones tisulares están contenidas en el tejido herniado de disco intervertebral, o no se cultivan solo como un tipo de célula individual. Precisamente en estas condiciones mixtas se consigue una posterior diferenciación mejorada con especificidad de disco intervertebral de las células (véase la Fig. 3). Esta técnica de cultivo mixto autólogo para la multiplicación de las células de disco intervertebral posibilita, por lo tanto, por primera vez una diferenciación específica del disco intervertebral de estas células cultivadas de este modo, después de que las mismas se pasen a un entorno tridimensional.

(b) En otro procedimiento se precultivan las células aisladas de disco intervertebral y se multiplican sin pase de las células solo brevemente. Después se recogen las células precultivadas y se congelan y se almacenan congeladas hasta el momento del trasplante. Antes del trasplante se descongelan las células y se continúan cultivando hasta alcanzar un número de células suficiente con suero autólogo y en un medio de cultivo celular convencional. Después de una suficiente multiplicación de las células, las mismas se recogen y se facilita el trasplante de células compuesto de una suspensión de células de disco intervertebral. Sorprendentemente se ha comprobado que las células de disco intervertebral no pierden debido a la congelación y descongelación sus propiedades específicas en relación con la síntesis de proteínas específicas marcadoras y de matriz (véase la Fig. 5).

(c) En otro procedimiento preferente se usa como material de partida también tejido de disco intervertebral enfermo propio del paciente. Se aíslan de las biopsias las células que generan tejido del anillo fibroso y del núcleo pulposo mediante digestión enzimática del tejido, mediante migración o mediante reactivos que reconocen las células diana con métodos habituales. Entonces, estas células mixtas se cultivan en condiciones autólogas y con un medio de cultivo habitual en primer lugar en monocapa hasta que se haya conseguido un número de células suficiente y a continuación se traspan a recipientes de cultivo celular con superficie hidrófoba y fondo que se estrecha y allí se cultivan en suspensión hasta que se produzca un agregado celular tridimensional que incluye al menos el 40 % en volumen, preferentemente al menos el 60 % en volumen hasta como máximo el 99 % en volumen de matriz extracelular (ECM) sintetizada *de novo*, en la que están incluidas

células diferenciadas. El experto en la materia puede determinar estos valores mediante la extracción de muestras de menor tamaño. El agregado celular producido presenta una forma externa en la que están presentes células con capacidad de proliferación y migración (véase la Fig. 1).

5 De acuerdo con la invención, las células aisladas de disco intervertebral se usan en una mezcla, es decir, las células no se clasifican y separan por células de anillo fibroso y núcleo pulposo o no se cultivan solo como un tipo individual de células. Precisamente en estas condiciones mixtas se favorece en el cultivo tridimensional y, por tanto, con la formación de tejidos tridimensionales de disco intervertebral, la diferenciación específica de disco intervertebral de las células mixtas, pudiendo conseguirse la expresión de marcadores específicos de disco intervertebral solo en estos cultivos y quedando favorecida la formación del tejido tridimensional de disco intervertebral mediante el uso de los cultivos mixtos (véase la Fig. 3). Esta técnica de cultivo mixto autóloga posibilita, por tanto, por primera vez la producción y el uso de un trasplante tisular con especificidad de disco intervertebral que se ha producido de forma autóloga a partir de tejido herniado de disco intervertebral degenerado.

15 Las células mixtas de disco intervertebral que se aíslan de tejido enfermo de disco intervertebral y a partir de las cuales se producen agregados de células de disco intervertebral tridimensionales, de tal manera que las células extraídas están integradas en un tejido sintetizado *de novo*, sobreviven incluso con una duración progresiva de cultivo, es decir, las células en el interior de los agregados no mueren. Con una duración progresiva de cultivo, las células en el interior de los agregados diferencian y se forman tejidos de cartílago de disco intervertebral que están compuestos de ECM, células diferenciadas y una zona de proliferación en el borde (véase la Fig. 1). Durante la diferenciación en el cultivo de células autólogo, la separación de las células agregadas por formación de la matriz específica de tejido cada vez es mayor (véase la Fig. 3 comparación (3c) con (3d)). En el interior de tejido de disco intervertebral producido *in vitro* se genera una histología tisular que es muy similar a la del tejido natural. Durante la posterior producción de tejido de cartílago de disco intervertebral se configura la "zona de proliferación" en el borde del mismo. Esta zona tiene la ventaja inestimable de que después de la introducción del tejido de cartílago de disco intervertebral generado de este modo en discos degenerados, las células que se encuentran en esta zona de borde están en disposición de migrar al exterior y establecer activamente el contacto con el tejido circundante o posibilitar una integración del tejido de cartílago de disco intervertebral formado *in vitro* en su entorno. De este modo, los agregados celulares con especificidad de tejido producidos son adecuados de forma excelente para el tratamiento de discos intervertebrales degenerados y para la nueva generación de tejido de disco intervertebral *in vivo*.

A causa de la carga biomecánica de los discos intervertebrales directamente después del tratamiento así como el fin de restablecer el disco intervertebral en su altura de forma igual con el trasplante de tejido de cartílago de disco intervertebral, puede ser ventajoso trasplantar trozos de tejido ya de mayor tamaño y mecánicamente estables. En este caso se fusionan al menos dos, pero mejor un mayor número de los tejidos de cartílago de disco intervertebral obtenidos *in vitro* al continuar cultivando los mismos conjuntamente en las mismas condiciones y en los mismos recipientes de cultivo como se ha descrito anteriormente hasta el tamaño deseado (véase también la Fig. 4).

40 Como medio de cultivo celular se puede usar medio habitual tanto para el cultivo en suspensión como el cultivo en monocapa, por ejemplo, MEM de Dulbecco, con adición de suero. Preferentemente se emplea DMEM y Hams en relación 1:1. Sin embargo, para evitar reacciones inmunológicas del paciente al tejido producido *in vitro* se emplea, como suero, suero autólogo del paciente.

45 Al medio de cultivo de acuerdo con la invención no se añaden antibióticos, fungistáticos u otros coadyuvantes. Se ha mostrado que solo el cultivo autólogo de las células y los agregados celulares así como el cultivo sin antibióticos y fungistáticos posibilita una proliferación así como diferenciación sin influencias de las células en el cultivo en monocapa y una formación sin alteraciones de la matriz específica en los agregados celulares. Además, al prescindir de sustancias adicionales durante la producción después de la introducción del tejido producido *in vitro* en el organismo humano e incluso animal quedan descartadas reacciones inmunológicas.

50 El tamaño del tejido producido de disco intervertebral depende del número de células introducido por volumen de medio de cultivo. Si se introducen, por ejemplo,  $1 \times 10^7$  células en 300  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo, entonces en el intervalo de una semana se generan agregados de células de disco intervertebral tridimensionales de un diámetro de aproximadamente 500-700  $\mu\text{m}$ . La otra posibilidad es la fusión *in vitro* de los pequeños agregados celulares hasta unos de mayor tamaño, tal como se ha descrito anteriormente, y la introducción de los mismos en el disco intervertebral. Preferentemente se usan de acuerdo con la invención entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^7$  células en 300  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo para la producción de los pequeños agregados celulares, de forma particularmente preferente  $1 \times 10^5$  células. Los tejidos de disco intervertebral formados *in vitro* después de algunos días se cultivan entonces durante al menos 2-4 semanas, dependiendo del tipo de células y las características específicas del paciente, en el medio de cultivo adecuado para inducir la formación de la matriz específica de tejido. En un caso particular, entonces se pueden fusionar tejidos de disco intervertebral *in vitro* individuales a partir de aproximadamente una semana de cultivo para aumentar el tamaño del trozo de tejido.

65 Como recipientes de cultivo celular, para el cultivo de acuerdo con la invención en suspensión se consideran preferentemente aquellos con una superficie hidrófoba, es decir que reduce la adhesión, tales como, por ejemplo poliestireno o teflón. Los recipientes de cultivo celular con superficie no hidrófoba se pueden hidrofobizar mediante

revestimiento con agar o agarosa. No se necesitan otras adiciones. Preferentemente, placas de pocillos sirven de recipientes de cultivo celular. A este respecto, para la producción de los pequeños agregados celulares se pueden usar, por ejemplo placas de 96 pocillos y para la producción de los agregados fusionados, placas de 24 pocillos.

5 También se describe la técnica quirúrgica para el trasplante de las células de disco intervertebral y de los tejidos de cartílago de disco intervertebral tridimensionales producidos *in vitro* en el disco intervertebral lesionado. El trasplante se lleva a cabo mediante inyección de las células de disco intervertebral con control fluoroscópico después de la desinfección de la piel, cobertura estéril del área cutánea y con anestesia local y preferentemente de manera necesaria evitando el uso de agentes de contraste. Para esto, los trasplantes de células de disco intervertebral, en particular después de su producción en el laboratorio, se cargan en tubos de transporte especiales con un fondo que se estrecha, de forma redondeada o en punta, y se cargan en el quirófano mediante una aguja de punción con una salida de cánula por ejemplo biselada en una jeringa. Sobre todo gracias al fondo inclinado del recipiente de transporte y la salida biselada de la cánula es posible recibir por completo la solución que contiene las células. Para asegurar la descarga de las células al disco intervertebral sin dañar las células y con la menor pérdida posible de líquido y, por tanto, de células, la aguja de punción en esencia tiene un diámetro interno de 0,4 a 2 mm. El trasplante mediante inyección de las células de disco intervertebral al disco intervertebral que se va a tratar se realiza especialmente en el lado opuesto al lado previamente intervenido del disco intervertebral (eliminación de hernia de disco intervertebral) mediante una aguja de punción con salida biselada. La inyección del trasplante de células tiene lugar con control fluoroscópico, ya que la descarga real de las células al espacio interior del disco intervertebral se debe controlar. De forma convencional se pueden usar agentes de contraste que, sin embargo, dañan las células, por lo que se impide el éxito del trasplante de células. Después de la descarga de células de disco intervertebral al espacio del disco intervertebral se retira la aguja de punción del disco intervertebral. Para el paciente se produce preferentemente un estricto reposo en cama de 12 horas, un posterior reposo regular de 12-24 horas en cama y un reposo en cama de 24-48 horas con ejercicios fisioterapéuticos. A continuación se realiza, por ejemplo, durante algunas semanas la estabilización de la columna vertebral a través de una prótesis ortopédica adecuada convencional.

El trasplante de los trasplantes de cartílago de disco intervertebral producidos *in vitro* tridimensionales se realiza, como para las células de disco intervertebral, en particular mediante una aguja de punción. Para asegurar que se evite un daño mecánico y, por tanto, biológico de los trasplantes de cartílago de disco intervertebral durante la inyección se usa una aguja de punción con un diámetro de al menos 500 µm. Además, para evitar el daño mecánico de los trasplantes de cartílago de disco intervertebral, en esencia se da un único paso a través de la aguja de punción. Por ello, los trasplantes de cartílago de disco intervertebral después de su producción en el laboratorio ya se traspasan a una jeringa sobre la que entonces, en el quirófano, se aplica ya solo la aguja de punción. También en este caso, la aguja de punción debe presentar, de acuerdo con la invención, una salida biselada para posibilitar gracias a la superficie de descarga ampliada una descarga rápida de los trasplantes de cartílago de disco intervertebral en el menor volumen posible de líquido (volumen de descarga). A continuación se produce la inyección tal como se ha descrito anteriormente para los trasplantes de células.

40 También son objeto de la invención preparaciones terapéuticas que comprenden los trasplantes de células de disco intervertebral y el tejido de cartílago de disco intervertebral de acuerdo con la invención, por ejemplo, soluciones para inyección.

45 También es objeto de la invención el uso del tejido de cartílago de disco intervertebral de acuerdo con la invención para ensayar principios activos que influyen, por ejemplo, en la formación y diferenciación de matriz y células. Para esto se producen de acuerdo con la invención los agregados de células de disco intervertebral y en diferentes estadios de maduración se añaden los medicamentos que se van a ensayar y se caracterizan los más diversos parámetros de la producción y maduración de tejido de disco intervertebral *in vitro*. Estos ensayos, en comparación con los ensayos de medicamentos convencionales en animales o en sistemas de células tumorales, gracias al uso solo de material autólogo son específicos de paciente y posibilitan un diagnóstico individual.

A continuación se va a aclarar con mayor detalle la invención con ejemplos de realización, sin limitarla a los mismos.

### **Ejemplos de realización**

#### **Ejemplo 1: producción de trasplantes de células de disco intervertebral**

A partir del tejido enfermo de disco intervertebral, mediante digestión enzimática por incubación con solución de colagenasa se aíslan los condrocitos de disco intervertebral del anillo fibroso y del núcleo pulposo. Después de la separación de las células aisladas de tejido no digerido, las mismas se traspasan como poblaciones de células mixtas a matraces de cultivo celular y se incuban con adición de medio de cultivo DMEM/Hams F12 (1/1) y el 10 % de suero autólogo del paciente a 37 °C y con el 5 % de CO<sub>2</sub>. Dos veces a la 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 de cultivo celular. Después de otro lavado se traspasan las células de disco intervertebral a la solución salina fisiológica y se ponen a disposición para el trasplante.

En un modelo *in vitro* se ha podido mostrar el potencial de diferenciación de las células de disco intervertebral contenidas en el trasplante de células. Se expresan proteínas de matriz y proteínas marcadoras específicas de disco intervertebral (Fig. 3) y, por tanto, se genera una estructura tisular específica de disco intervertebral.

5 Ejemplo 2: trasplante de condrocitos de disco intervertebral

Los trasplantes de células de disco intervertebral producidos en el Ejemplo 1 (al menos 1.000 células, como máximo 100 millones de células), con preferencia aproximadamente 1 millón de condrocitos de disco intervertebral, se recogieron en solución salina fisiológica y se inyectaron en el disco intervertebral enfermo. Entre otras cosas se comprobó que vuelve a aumentar el contenido de agua en el disco intervertebral tratado y que se puede conservar la altura del espacio intervertebral, lo que se debe a las proteínas de matriz sintetizadas por los condrocitos de disco intervertebral.

Los trasplantes de células de disco intervertebral producidos *in vitro* de acuerdo con la invención son aceptados por el paciente, garantizan una rápida integración de las células con capacidad de proliferación y con capacidad de migración y una regeneración del tejido de disco intervertebral gracias a la capacidad de diferenciación de las células contenidas. Así, los trasplantes de células de disco intervertebral permiten el rápido restablecimiento de tejido de disco intervertebral, una rápida curación de los pacientes y el restablecimiento de la función del disco intervertebral.

20 Ejemplo 3: producción *in vitro* de tejido de cartílago de disco intervertebral

Del tejido herniado de disco intervertebral se aíslan mediante digestión enzimática por incubación con solución de colagenasa los condrocitos de disco intervertebral del anillo fibroso y del núcleo pulposo. Después de la separación de las células aisladas del tejido no digerido, las mismas se traspasan como cultivo mixto a matraces de cultivo celular y se incuban con adición de medio de cultivo de DMEM/Hams F12 (1/1) y el 10 % de suero autólogo del paciente a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>. 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 de cultivo celular. Después de otro lavado se traspasan  $1 \times 10^5$  células a en cada caso un recipiente de cultivo celular que está revestido con agarosa. Después de un día se han dispuesto las primeras células en agregados. Estos agregados se alimentan de forma regular con medio fresco y se cultivan durante al menos 2 semanas.

La estructura del tejido de cartílago de disco intervertebral obtenido se aclara por la imagen de microscopía en la Fig. 1, que muestra el corte transversal de un tejido de disco intervertebral producido de acuerdo con la invención con ECM como zona de proliferación reducida y formación de proteínas de matriz específicas de tejido y P como zona de proliferación externa.

En estos tejidos de disco intervertebral *in vitro* se constató la expresión y deposición de constituyentes de matriz específicos de disco intervertebral y proteínas reguladoras tales como agregcano (Fig. 3a), proteoglicanos específicos de hialina (Fig. 3b), colágeno de tipo I (Fig. 3c), colágeno de tipo II (Fig. 3d) y colágeno de tipo III (Fig. 3e). Estos son constituyentes del tejido de cartílago de disco intervertebral nativo *in vivo* y representan las proteínas estructurales más importantes, que son importantes para la función del cartílago de disco intervertebral.

Fue sorprendente que las células de disco intervertebral aisladas de tejido enfermo de disco intervertebral, cuando se cultivan como mezcla de anillo fibroso y núcleo pulposo, presentan una elevada capacidad de proliferación (Fig. 2) así como un potencial muy alto de diferenciación para la formación de proteínas de matriz específicas de disco intervertebral y proteínas reguladoras (véase también la Fig. 3) y sus propiedades se pueden mantener mediante el procedimiento de la congelación y descongelación (véase también la Fig. 5).

50 Ejemplo 4: trasplante de tejido de cartílago de disco intervertebral

El tejido de cartílago de disco intervertebral producido en el Ejemplo 3 (aproximadamente 10 a 1000 trozos de tejido en cada caso de  $1 \times 10^5$  células), preferentemente 100 trozos de tejido, se recogió en solución salina fisiológica ya en el laboratorio en una jeringa y se inyectó en el espacio intervertebral de discos intervertebrales enfermos o lesionados mediante una aguja de punción con salida biselada. El tejido de cartílago de disco intervertebral producido *in vitro* de acuerdo con la invención es aceptado por los pacientes y garantiza, aparte del cumplimiento de la función mecánica del tejido producido, la rápida integración de los trozos de tejido producidos gracias a las células con capacidad de proliferación y capacidad de migración en la capa exterior de los agregados así como una regeneración del tejido de disco intervertebral gracias a la capacidad de diferenciación de las células contenidas. De este modo, la estructura y la función de los trozos de tejido permite el rápido restablecimiento de tejido de disco intervertebral, una rápida curación de los pacientes y el restablecimiento de la función del disco intervertebral.

La Fig. 4 muestra cinco tejidos de disco intervertebral que se fusionan. Se puede ver que las esferas de tejido están adheridas entre sí y, por así decirlo, se funden, ya no se puede reconocer el límite entre dos tejidos de disco intervertebral. Después de un tiempo más prolongado de cultivo se fusionan por completo los tejidos de disco

intervertebral y se produce un trozo de tejido *in vitro* de mayor tamaño. La estructuración de los agregados de células de mayor tamaño obtenidos de este modo se puede comparar con tejido de disco intervertebral *in vitro*. Pueden incluir hasta como máximo 99 % de ECM y las células contenidas son vitales.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de trasplantes de células de disco intervertebral mixtos autólogos, caracterizado por que a partir de tejido herniado de disco intervertebral degenerado y/o tejido de disco intervertebral enfermo se aíslan células vitales de disco intervertebral como mezcla de partes de disco intervertebral del anillo fibroso y del núcleo pulposo, se cultivan solo con adición de suero del propio cuerpo en un medio de cultivo celular sin adición de compuestos exógenos que favorecen el crecimiento y sin adición de antibióticos como monocapa y, así, se obtienen trasplantes de células de disco intervertebral que están compuestos de una suspensión de células de disco intervertebral.
- 10 2. Procedimiento para la producción de trasplantes de células de disco intervertebral mixtos autólogos de acuerdo con la reivindicación 1, además caracterizado por que dichos trasplantes de células de disco intervertebral se cultivan a continuación hasta dar un tejido tridimensional autólogo sin el uso de materiales de soporte.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, además caracterizado por que las células de disco intervertebral aisladas del tejido herniado de disco intervertebral degenerado se cultivan durante la multiplicación en un medio de cultivo celular que contiene el 1-20 % de adición de suero autólogo y cuya relación de medio alfa-MEM y medio HAM-F12 se encuentra entre 2:1 y 1:2 y a 36,8-37 °C, el 5 % de dióxido de carbono contenido en el aire y una humedad del aire del 85-95 %.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que las células aisladas de disco intervertebral se cultivan después de su multiplicación en monocapa en un medio de cultivo celular que contiene el 1-20 % de adición de suero autólogo y cuya relación de medio alfa-MEM y medio HAM-F12 se encuentra entre 2:1 y 1:2 y a 36,8-37 °C, el 5 % de dióxido de carbono contenido en el aire y una humedad del aire del 85-95 % y, por ello, tienen capacidad de diferenciación y forman estructuras de matriz que comprenden proteínas de matriz de disco intervertebral específicas.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que las células aisladas de disco intervertebral después de su multiplicación en monocapa se congelan en una solución del 10 % de DMSO, el 20 % de suero y el 70 % de medio de cultivo y se vuelven a descongelar, no cambiando sus propiedades en relación con la síntesis de componentes de matriz específicos y marcadores y generándose estructuras tisulares *in vitro* e *in vivo*, que están compuestas de proteínas de matriz específicas de disco intervertebral.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado por que las células aisladas del tejido de disco intervertebral se cultivan en un recipiente de cultivo con superficie hidrófoba y fondo que se estrecha.
- 35 7. Trasplante de células de disco intervertebral mixto autólogo que se puede obtener de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. Trasplante de células de disco intervertebral mixto autólogo de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que se encuentra en una jeringa para el trasplante.
- 45 9. Uso del trasplante de células de disco intervertebral mixto autólogo de acuerdo con la reivindicación 7 para el ensayo *in vitro* de principios activos.
- 50 10. Preparaciones para terapia celular que comprenden trasplantes de células de disco intervertebral mixtos autólogos de acuerdo con la reivindicación 7.
11. Trasplante de células de disco intervertebral mixto autólogo de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 8 para el uso en el tratamiento de defectos de disco intervertebral.

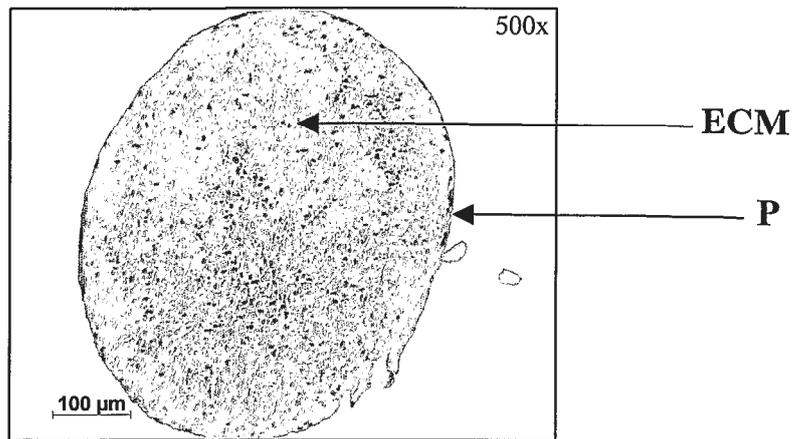


Fig. 1: Histología de tejidos de cartílago de disco intervertebral tridimensionales producidos *in vitro*. En el interior de los tejidos se encuentran células diferenciadas vitales que han formado una matriz extracelular (ECM). En el borde se encuentra una zona de proliferación (P).

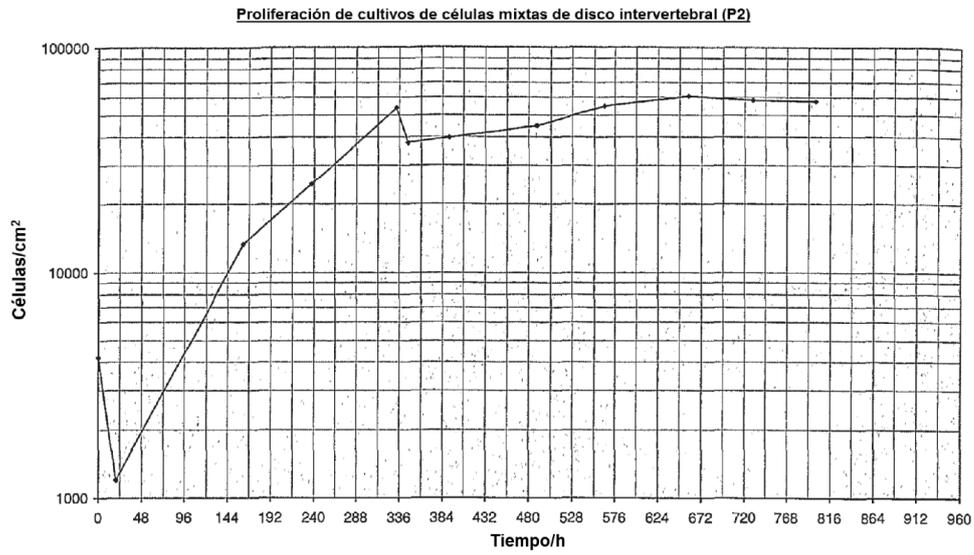


Fig. 2: Proliferación de células de disco intervertebral en cultivo mixto en el pase de monocapa 2.

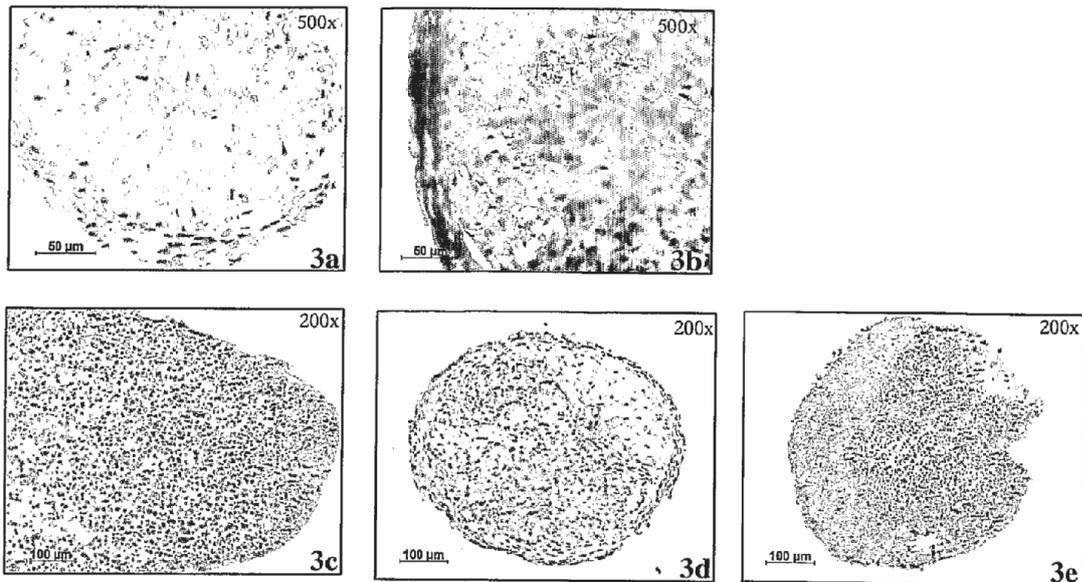


Fig.3: Expresión de proteínas de matriz por condrocitos mixtos de disco intervertebral después de multiplicación en cultivo en monocapa y posterior cultivo en condiciones de cultivo celular tridimensionales. (3a) Expresión de agregano después de 4 semanas, (3b) expresión de proteoglicanos específicos de hialina comprobados mediante tinción con safranina O después de 4 semanas, (3c) expresión de colágeno de tipo I después de 2 semanas, (3d) expresión de colágeno de tipo II después de 4 semanas, (3e) expresión de colágeno de tipo III después de 4 semanas.

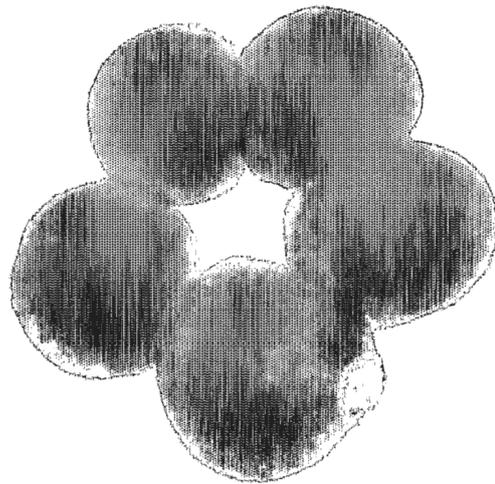


Fig. 4: 5 tejidos de cartilago de disco intervertebral tridimensionales que se fusionan.

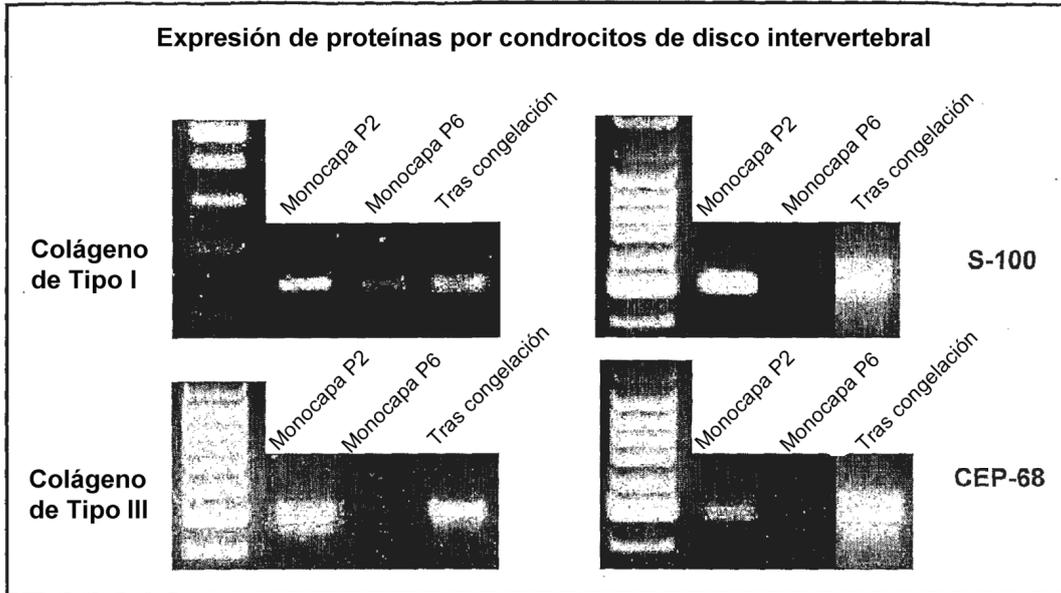


Fig. 5: Expresión de distintas proteínas de matriz y proteínas reguladoras por condrocitos de disco intervertebral que se han cultivado en monocapa en distintos pases y que se han cultivado después de la congelación y descongelación de nuevo en monocapa. Monocapa Pase 2 (P2), monocapa Pase 6 (P6), después de congelación y descongelación (tras congelación).