

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 510**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/30** (2006.01)

**A61F 2/44** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2007 PCT/US2007/061590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2007 WO07092801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007 E 07763383 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 1989289**

54 Título: **Método y composiciones para la reparación del cartílago usando un biorreactor in vivo**

30 Prioridad:

**07.02.2006 US 771172 P**

**24.03.2006 US 785478 P**

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

**31.05.2017**

73 Titular/es:

**SPINALCYTE, LLC (100.0%)  
17300 EI Camino Real, Suite 110  
Houston, TX 77058, US**

72 Inventor/es:

**SEVRAIN, LIONEL C. y  
VERDIER-SEVRAIN, SYLVIE Y.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 614 510 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

Método y composiciones para la reparación del cartílago usando un biorreactor *in vivo*

5 La presente invención se refiere en general al menos a los campos de la medicina, cirugía, anatomía, biología, biología celular y/o biología molecular. En aspectos particulares, la presente invención se refiere a los campos de la reparación del cartílago, tales como la reparación del cartílago articular. Más particularmente, el campo de la invención se refiere a dispositivos de encapsulación de matriz celular para el cultivo, proliferación y/o diferenciación de las células en células de tipo condrocito bajo estrés mecánico.

10 Normalmente, el cartílago articular es un tejido que no se regenera de manera natural una vez dañado. Recientemente, se han hecho esfuerzos para reconstruir los tejidos biológicos dañados mediante la regeneración de una parte de los tejidos dañados en el laboratorio. Este enfoque, que se define como "ingeniería de tejidos" ha suscitado una enorme atención.

15 La ingeniería de tejidos implica el desarrollo de materiales biocompatibles capaces de interactuar específicamente con tejidos biológicos para producir equivalentes de tejidos funcionales. La ingeniería de tejidos tiene como concepto básico recoger un tejido deseado de un paciente, aislar células de la muestra de tejido, proliferar las células, sembrar las células proliferadas en un armazón polimérico biodegradable, cultivar las células durante un período predeterminado *in vitro* y trasplantar de nuevo la construcción célula/polímero en el paciente. Después del trasplante, las células en el armazón trasplantado usan oxígeno y nutrientes obtenidos por difusión de los fluidos corporales para proliferar y diferenciarse para formar un tejido nuevo a medida que el armazón se disuelve.

20 El armazón usado para la regeneración de tejido biológico normalmente se compone de un material que sirve de matriz para permitir que las células se unan a la superficie del material y formen un tejido tridimensional. Este material debe ser no tóxico, biocompatible y biodegradable. Los polímeros biodegradables más ampliamente usados, que cumplan los requisitos físicos antes mencionados, incluyen polímeros orgánicos tales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli-ε-caprolactona (PCL), poliaminoácidos, polianhídridos, poliolefinas; hidrogeles naturales tales como colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa, quitosano; hidrogeles sintéticos tales como poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(propileno fumarato-co-etilenglicol) [P(PF-co-EG) y copolímeros de los mismos.

25 Los polímeros mencionados anteriormente han sido investigados para fabricar un armazón poroso. Sin embargo, las técnicas de fabricación convencionales generalmente tienen como resultado armazones con porosidades bajas que no soportan adecuadamente el crecimiento celular. Los poros en la superficie del armazón están a menudo bloqueados, los nutrientes no se suministran suficientemente a las células y las células tienen dificultades para crecer en el armazón. Recientemente, la aplicación de la tecnología de microfabricación en el campo de la ingeniería de tejidos ha hecho posible el desarrollo de un andamiaje complejo con resolución a escala micrométrica. Estos armazones, denominados "armazones microfluídicos" presentan una red de micro-canales que permite el flujo de fluido dentro del armazón. Esta red de microcanales ayuda a proporcionar nutrientes y factores solubles a las distintas secciones del armazón.

30 El armazón también puede estar encapsulado con una membrana semipermeable. La publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2006/0147486 se refiere a un armazón poroso envuelto con una membrana semipermeable. Esta membrana semipermeable introduce selectivamente nutrientes en el armazón desde el exterior del armazón, así como la excreción de desechos metabólicos generados por las células de tejido al exterior del armazón. La publicación describe el método para cultivar las células dentro de este armazón *in vitro* para la regeneración de un tejido biológico.

35 La patente US-6.627.422 describe un dispositivo que contiene células en una matriz de hilo encapsulada en una membrana semipermeable. En este caso, la membrana semipermeable permite que las células implantadas reciban nutrientes, pero también permite que las moléculas terapéuticas producidas por las células implantadas se difundan a las células del hospedador. Este dispositivo se utiliza para la terapia de células: las células encapsuladas secretan proteínas endógenas al hospedador. Este dispositivo funciona como un órgano bioartificial (por ejemplo, como páncreas artificial mediante la secreción de insulina).

40 A pesar de tales avances en la ingeniería de los armazones con una mejor difusión de nutrientes, el armazón, una vez trasplantado al paciente dispone de una cantidad limitada de nutrientes. De hecho, *in vivo*, los nutrientes y el oxígeno son suministrados a las células del disco a través de los vasos sanguíneos en las placas terminales de las vértebras adyacentes al disco. En la enfermedad degenerativa del disco, las placas terminales vertebrales de las vértebras no funcionan bien y no permiten la difusión suficiente de nutrición al armazón de células implantado.

45 Se pueden utilizar diferentes tipos de células para diseñar el cartílago articular. Se pueden usar células diferenciadas primarias de cartílago articular (es decir, condrocitos) de biopsias de cartílago existente. Estas células a menudo se obtienen de una fuente autóloga ya que la obtención de células heterólogas o células de cadáveres conlleva el riesgo inherente de la transferencia de patógenos. Las células madre mesenquimales (CMM), que son células

embrionarias como las que se encuentran en la médula ósea, son capaces de diferenciación en diferentes tipos de tejidos mesenquimales y tejidos especialmente cartilagosos; por lo tanto, son otra fuente de células para la ingeniería del cartílago.

5 Sin embargo, estas fuentes de células plantean muchas cuestiones. Los condrocitos del disco intervertebral son difíciles de cosechar, ya que las células autólogas se obtienen a partir del disco del paciente y por lo tanto se requiere un procedimiento invasivo (cirugía de la espalda) para realizar una biopsia. Si las células se cosechan a partir de un disco sano, se pone en peligro el funcionamiento del disco sano. Si las células son cosechadas a partir de un disco dañado durante la discectomía, se proporcionan células anormales de un tejido degenerado. Por otra parte, los condrocitos son difíciles de expandir en cultivo, ya que se desdiferencian. Con respecto a los condrocitos de otros cartílagos, el cartílago elástico del oído es fácil de cosechar, pero produce solamente cartílago hialino y no cartílago fibroso, como en el disco. Las CMM también tienen algunas desventajas, ya que requiere una biopsia de la médula ósea. Si bien se necesita una gran cantidad de células para la ingeniería de tejidos, es difícil obtener una gran cantidad de células madre adultas.

15 Numerosos trabajos han descrito las condiciones de cultivo que estimulan la condrogénesis de las células madre mesenquimales o la desdiferenciación de los condrocitos. Estas condiciones son las siguientes: cultivo de micromasa de alta densidad; hipoxia; suplementación con factores de crecimiento, tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en particular BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7, factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y/o factor de crecimiento de insulina uno (IGF-I); suplementación con ácido ascórbico; cultivo en una matriz específica, tal como alginato; cultivo bajo tensión mecánica como presión hidrostática intermitente (PHI) (Watt, 1988; Dozin *et al.*, 1992; Sullivan *et al.*, 1994; Denker *et al.*, 1999; Zur Nieden *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2004; Majumdar *et al.*, 2001; Barry *et al.*, 2001; Elder *et al.*, 2005; Mow *et al.*, 1992; Domm *et al.*, 2000).

25 Pocos estudios han informado de la conversión de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) en células de tipo condrocito. La patente US-6.489.165 se refiere a la conversión de HDF en células de tipo condrocito en cultivo de micromasa de alta densidad e hipoxia. French MM *et al.* (2004) describieron la conversión de HDF en condrocitos cuando las células se cultivan en el proteoglicano, agregano y se suplementan con el factor de crecimiento de insulina uno (IGF-I).

30 El documento US2002/0106625 divulga biorreactores *in vitro* e *in vivo* para la producción de células cartilagosas.

### **Enfermedad degenerativa del disco**

35 La enfermedad degenerativa del disco (DDD) requiere la realización de 700.000 procedimientos al año, realizados por 4.500 cirujanos de columna, y la mayoría de los trastornos del disco se producen en pacientes jóvenes. Por lo tanto, es fundamental desarrollar estrategias eficaces y seguras para el tratamiento de esta enfermedad.

40 Un disco intervertebral (DIV) es una estructura compleja que comprende tres tejidos distintivos: el anillo, el núcleo y las placas terminales de cartílago. El anillo es una estructura bien organizada, de varias capas de fibras de colágeno. El núcleo se compone principalmente de glicosaminoglicano (polímero hidrófilo). Las placas terminales cartilagosas suministran nutrientes. La combinación anterior permite que el disco normal realice dos funciones contradictorias: estabilidad y flexibilidad.

45 El disco intervertebral absorbe los golpes, mantiene el movimiento y mantiene la estabilidad. De forma similar a otros cartílagos, la capacidad de reparación innata del disco intervertebral (que actúa como una unión entre dos vértebras) es baja, debido a que es avascular y está nutricionalmente soportado únicamente por difusión pasiva en las placas terminales. En consecuencia, una vez que se activa el proceso degenerativo, se considera que en última instancia es una condición irreversible. Una vez dañado, el disco degenerado puede sobresalir o extrudirse, y por lo tanto tiene que ser eliminado.

50 En la actualidad, el tratamiento quirúrgico común para los pacientes con dolor lumbar crónico debido a la enfermedad degenerativa del disco es o discectomía o fusión vertebral. La discectomía es un procedimiento adecuado y se lleva a cabo rutinariamente para eliminar el núcleo degenerado a través de una fenestración dentro del anillo: permite la eliminación tanto del núcleo extruido (herniectomía) como de los fragmentos de núcleo intervertebrales restantes degenerados. Aunque este procedimiento es ideal para descomprimir y aliviar el sistema nervioso (raíz o cola de caballo), no es una operación adecuada para la columna vertebral, ya que crea una condición potencialmente incapacitante que conduce a una cascada degenerativa que puede requerir un procedimiento quirúrgico invasivo adicional, como la fusión o la artroplastia, por ejemplo. La discectomía proporciona un buen efecto a corto plazo en el alivio del dolor radicular, pero provoca la reducción de la altura del disco con estenosis neuroforaminal, inestabilidad del nivel tratado, resultado insatisfactorio en cuanto al dolor de espalda y/o complicaciones, como la estenosis vertebral o dolor de facetas, por ejemplo.

65 La fusión vertebral es el tratamiento más eficaz para el dolor lumbar. Es un procedimiento quirúrgico en el cual se elimina un disco entero y las dos vértebras adyacentes se unen entre sí ("fusionan") con la interposición de un injerto (jaulas, injertos óseos y/o dispositivos de fijación, por ejemplo). Está indicado para pacientes con degeneración

avanzada del disco. Solo en los Estados Unidos se realizan cada año más de 200.000 fusiones vertebrales, pero al eliminar el movimiento, la fusión vertebral altera las propiedades biomecánicas del disco intervertebral y aumenta el estrés y la tensión en los discos que están adyacentes al disco fusionado. De hecho, tanto la discectomía como la fusión empeoran la condición del disco afectado, los discos adyacentes y los tejidos circundantes (tales como articulaciones de la faceta), lo que conduce a una mayor degeneración.

El fracaso de estos procedimientos ha dado lugar a una búsqueda del desarrollo de tecnologías de no fusión, tales como prótesis de disco o núcleo de disco, por ejemplo. La artroplastia de disco con un disco artificial es un tratamiento emergente para los pacientes con degeneración del disco. Sus ventajas son que mantiene el movimiento, disminuye la incidencia de la degeneración del segmento adyacente, evita las complicaciones relacionadas con la fusión y permite el retorno temprano a la función. En la actualidad, se comercializan dos tipos de dispositivos: el reemplazo total de disco y la sustitución nuclear, pero ambos tienen grandes inconvenientes. El reemplazo de disco total es una prótesis metálica voluminosa diseñada para reemplazar la totalidad del disco: anillo, núcleo y placas terminales. Estas prótesis utilizan un abordaje anterior invasivo (trans- o retro-peritoneal) que requiere la presencia de un cirujano vascular. Se han descrito desplazamientos, presencia de partículas residuales por desgaste, degeneración de los discos intervertebrales adyacentes, artrosis articular facetaria y hundimiento de este tipo de prótesis. El sustituto del núcleo artificial conserva los tejidos restantes de disco y sus funciones. Su diseño permite su implantación mediante abordaje posterior, pero la principal limitación de tales prótesis de núcleo es que solo se pueden usar en pacientes en los que la degeneración del disco está en una fase inicial o intermedia, ya que requiere la presencia de un anillo natural competente. La extrusión del implante sigue siendo una preocupación primordial. Al ser un dispositivo a base de hidrogel, es frágil, por lo que no resiste las limitaciones biomecánicas extraordinarias de la columna lumbar (fuerzas de cizallamiento). Al ser materiales inertes, pueden perder sus propiedades mecánicas a lo largo del tiempo y se han descrito desgarres y roturas. Sustituir solamente el núcleo y dejar en su lugar un anillo dañado genera las condiciones para la extrusión del implante o la reincidencia de la hernia discal.

La ingeniería de tejidos y medicina regenerativa representan una nueva opción para el tratamiento de la DDD. Se utilizan diversos enfoques para regenerar los tejidos. Estos enfoques se pueden clasificar en tres grupos: 1) biomateriales, sin células adicionales, que se utilizan para enviar señales para atraer a las células y promover la regeneración; 2) se pueden usar solo células para formar un tejido y 3) se pueden usar células con un armazón de biomaterial que actúa como un marco para el desarrollo de tejidos. Mientras que el trasplante de condrocitos autólogos (ACT) ha sido utilizado durante algunos años para reparar el cartílago articular, la ingeniería de tejidos para la reparación del disco sigue en su infancia. Actualmente se están realizando numerosas investigaciones y los estudios en animales han demostrado la viabilidad de disco intervertebral mediante ingeniería tisular. Más interesante aún, recientes estudios clínicos piloto han demostrado que el ACT es un tratamiento eficaz de la hernia de disco. La principal desventaja del ACT para la reparación del disco es que requiere una biopsia de disco. Por lo tanto, hay una necesidad de un método mejorado para restaurar la anatomía del disco y mejorar su funcionamiento y por lo tanto sigue habiendo una necesidad de un método mejorado de reparación del cartílago. La presente invención busca satisfacer estos y otros objetos y proporciona una solución a una necesidad existente desde hace mucho tiempo en la técnica.

La invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para la reparación biológica de cualquier tipo de cartílago, incluyendo el cartílago intervertebral y articular, por ejemplo. Más específicamente, pero no exclusivamente, la presente invención se refiere a métodos y composiciones para la reparación biológica del cartílago utilizando un dispositivo implantable que es una combinación de una estructura inerte que actúa como biorreactor *in vivo* y una estructura viva comprendida por condrocitos o células de tipo condrocito, por ejemplo, tales como células derivadas de la ejemplar fibroblastos dérmicos humanos (HDF), en realizaciones específicas. Más particularmente, pero no exclusivamente, la presente invención se refiere a una construcción híbrida que combina tanto una estructura inerte como un núcleo viviente. La estructura inerte actúa no solo como un sistema de suministro para alimentar y hacer crecer un componente básico vivo, sino que también actúa como un inductor de la diferenciación celular, en ciertos aspectos. En realizaciones de la invención, esta estructura inerte comprende dos biopolímeros de globo expandibles, concretamente, una membrana interna (como un globo) que está encerrada dentro de una membrana externa (también denominada globo). Por lo tanto, la estructura inerte comprende dos membranas inflables generalmente concéntricas. Las dos membranas pueden definirse además como una primera membrana cerrada que está estructuralmente dentro de una segunda membrana adjunta. En realizaciones específicas, las formas pueden ser considerados generalmente esféricas, generalmente elípticas, generalmente redondeadas, generalmente globosas, por lo general discoides, generalmente esferoideas, generalmente globulares, de tipo globo, etcétera. En realizaciones específicas adicionales, la forma es específica del individuo y se ajusta a la forma y tamaño de la cavidad que queda en la región de la articulación o del disco intervertebral.

En ciertos aspectos, la invención genera tejido natural *in vitro*, tal como de células madre, condrocitos, etcétera. Más particularmente, pero no exclusivamente, la presente invención se refiere a un método para el cultivo y la diferenciación de fibroblastos humanos en células de tipo condrocito, por ejemplo. Las células, que son autólogas en ciertas realizaciones, se ponen en una matriz de armazón hecha de uno o más biopolímeros, de tal manera que

imitan una matriz natural. El armazón puede ser sembrado *in vitro* y en ciertos aspectos se proporcionan factores de crecimiento a las células, la matriz, o ambos. El armazón se pone en un biorreactor, que es un sistema para la perfusión de medio y permite la aplicación de la fuerza mecánica al armazón. Tras la aplicación de la fuerza, las células son asistidas en la diferenciación, especialmente para la generación de cartílago.

5 En realizaciones específicas, la invención emplea la diferenciación de ciertas células en células de tipo condrocito. En realizaciones específicas, los HDF, por ejemplo, se diferencian en células de tipo condrocito en condiciones de cultivo particulares, tales como la hipoxia (Nicoll et al., 2001), el cultivo de micromasa de alta densidad y el cultivo en una matriz específica, tales como agregado (Francés et al., 2004). En realizaciones específicas, los factores que imitan el entorno *in vivo* de condrocitos intervertebrales son potentes estímulos para la diferenciación condrogénica de los HDF, por ejemplo; dichos factores incluyen los siguientes: 1) tridimensionalidad; 2) baja tensión de oxígeno (<5 %); 3) tensión mecánica y 4) la presión hidrostática intermitente. En realizaciones específicas se determina la viabilidad celular y la diferenciación condrogénica de HDF sembrados en cultivos tridimensionales de perlas de alginato. En otra realización, se caracterizan los efectos de la tensión de oxígeno sobre la diferenciación de HDF cultivados en perlas de alginato. En una realización específica adicional, se caracterizan los efectos de la compresión hidrostática sobre la diferenciación de HDF cultivados en perlas de alginato.

La diferenciación de las células en condrocitos o células de tipo condrocito se puede producir de cualquier manera adecuada, incluyendo la diferenciación *in vitro* antes de la implantación del dispositivo en un individuo o la diferenciación *in vitro* antes de la implantación del dispositivo en un individuo y también *in vivo* después de la implantación.

En realizaciones específicas, el dispositivo de la invención proporciona un método para la regeneración *in vivo* de una articulación, como por ejemplo un disco intervertebral, codo, rodilla, hombro, cadera, articulación temporomandibular, etcétera. En ciertos aspectos de la invención, un compartimiento vivo comprende la construcción de matriz celular de las células de tipo condrocito, tal como la derivada de HDF, sembrados en un biomaterial. El cultivo y la diferenciación del compartimiento vivo puede ser iniciado *in vitro*, en ciertas realizaciones. El núcleo vivo se siembra en el biomaterial inerte y se implanta y las células continúan proliferando y diferenciándose *in vivo*.

En ciertas realizaciones, el cartílago que es el foco de aplicación de la invención es el cartílago del disco intervertebral. En aspectos particulares de la invención, las células utilizadas en la invención son sometidas a tensión mecánica para la diferenciación condrogénica. Por lo tanto, las realizaciones de la invención proporcionan una estructura inerte inter-vertebral que actúa como un biorreactor *in vivo* para inducir el crecimiento y la diferenciación de un núcleo vivo. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una construcción híbrida que combina tanto una estructura inerte como el núcleo vivo para la implantación en el espacio inter-somático utilizando una cirugía mínimamente invasiva.

Es un objeto ilustrativo de la presente invención proporcionar un método destinado a reparar un disco intervertebral degenerado, por ejemplo, restablecer la anatomía del disco intervertebral y mejorar su funcionamiento. En aspectos particulares de la invención, se proporciona un método para reparar el disco dañado utilizando una estructura híbrida compuesta de un dispositivo inerte destinado a alimentar y diferenciar un núcleo vivo interno. Por consiguiente, la estructura inerte actúa como un sistema de administración de nutrientes y factores de crecimiento y como un biorreactor capaz de diferenciar los fibroblastos dérmicos autólogos en células de tipo condrocito. Bajo estrés mecánico (como la presión hidrostática intermitente y/o la tensión de cizallamiento de fluido), las células adquirirán las características de las células del núcleo en la parte central y de las células del anillo en la periferia. Como ejemplo de células de tipo condrocito derivadas de fibroblastos pueden ser las cosechadas de la piel, tal como mediante una biopsia y después sembradas en un armazón de polímero tridimensional para el uso de la reparación del disco. Esto eliminaría la necesidad de una técnica invasiva para la cosecha de condrocitos autólogos, en aspectos particulares. Una ventaja de algunos aspectos de la construcción híbrida de la invención que combina a la vez un biomaterial inerte que actúa como un sistema de administración de nutrientes y células vivas fácilmente cosechadas de la piel, por ejemplo, es que es capaz de automantenerse o remodelarse y puede restaurar la función del disco utilizando, por ejemplo, un enfoque quirúrgico posterior mínimamente invasivo.

En ciertos aspectos de la invención, el cartílago dañado del espacio de la articulación o del espacio intervertebral se elimina y la estructura híbrida se instala dentro del espacio proporcionado por la eliminación anterior. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo se implanta utilizando un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo. En realizaciones específicas, se emplea una técnica quirúrgica ilustrativa. En realizaciones generales de los discos intervertebrales, cuando un disco intervertebral se debe quitar de entre dos vértebras adyacentes, p.ej. en la columna lumbar, es menos invasivo un abordaje quirúrgico posterior del paciente. Este procedimiento mínimamente invasivo permite continuar con el legrado del espacio inter-somático a través de una pequeña abertura dentro del anillo (anulotomía) para retirar los fragmentos degenerados del núcleo del disco. Usando esta pequeña abertura anular, la presente invención emplea un novedoso paquete de reparación intervertebral que se puede deslizar a través de la incisión antes mencionada y después expandirse en el área generada por la extracción del núcleo dentro del espacio inter-somática, por ejemplo. En realizaciones específicas, la eliminación del disco dañado y la instalación de la construcción del tejido de ingeniería se llevan a cabo en la misma operación posterior, reduciendo así al mínimo los riesgos, las posibilidades de complicaciones quirúrgicas y reintervenciones, así como el

tiempo de cirugía.

En una realización de la invención, hay un dispositivo implantable que comprende una composición de células/armazón y un dispositivo de encapsulación, en el que el dispositivo de encapsulación comprende una primera membrana generalmente concéntrica; una segunda membrana generalmente concéntrica que es concéntricamente externa a la primera membrana generalmente concéntrica; un primer volumen dentro de la primera membrana generalmente concéntrica; un segundo volumen que es externo a la primera membrana generalmente concéntrica y que es interno a la segunda membrana generalmente concéntrica y una estructura para la extracción de material desde el segundo volumen, en el que la primera membrana generalmente concéntrica es semipermeable y alberga la composición de células/armazón. Una membrana puede ser considerada generalmente concéntrica en comparación con otra si los centros de cada una de las membranas están sustancialmente cerca.

En ciertos aspectos de la invención, se proporciona a un individuo otro tratamiento, además del dispositivo implantable de la invención. Por ejemplo, antes, durante y/o después de la implantación del dispositivo, el individuo puede recibir uno o más antibióticos. Ejemplos de terapias postoperatorias incluyen antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos simples y/o relajantes musculares según sea necesario y que pueden ser seguidos por una rehabilitación funcional después de la operación, como por ejemplo después de la primera, segunda, tercera o más semanas después de la operación.

En algunas realizaciones, existe una estructura híbrida para la reparación del cartílago que comprende un dispositivo de encapsulación comprendido por material inerte y un núcleo vivo comprendido por células de tipo condrocito. Este dispositivo de encapsulación actúa como un biorreactor *in vivo* para la ingeniería de cartílago. Permite *in vivo* el crecimiento y la diferenciación de las células del cartílago, proporcionando factores de crecimiento y nutrientes y la transmisión de un régimen de carga fisiológica.

En una realización de la invención, existe un dispositivo implantable, que comprende una composición de células/armazón y un dispositivo de encapsulación que comprende: una primera membrana que tiene un interior y un exterior; una segunda membrana que tiene un interior y un exterior, en la que la primera membrana está encapsulada dentro de la segunda membrana; un primer volumen dispuesto dentro de la primera membrana; un segundo volumen que está dispuesto fuera de la primera membrana y que está dispuesto dentro de la segunda membrana; y una estructura para la adición de fluido al segundo volumen, que extrae líquido del segundo volumen, o ambos, en el que la composición de células/armazón está dispuesta dentro de la primera membrana y la primera membrana tiene una o más de las siguientes características: semipermeable, biocompatible, biodegradable y reabsorbible, en el que la segunda membrana tiene una o más de las siguientes características: biocompatible, hermética a los líquidos, permeable al oxígeno, reabsorbible, biodegradable y ampliable.

En una realización específica, el armazón está compuesto de un polímero sintético, un hidrogel natural o un hidrogel sintético. En una realización específica adicional, el polímero sintético es ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, poli-ε-caprolactona o poli(glicerol-sebacato) (PGS). En otra realización específica, el polímero sintético es un polifosfaceno, un polianhídrido o un poli(ortoéster). En realizaciones particulares, el hidrogel natural comprende colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa, quitosano, fibrina, gelatina o un copolímero del mismo. En una realización adicional, el hidrogel sintético comprende poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(propileno fumarato-co-etilenglicol) o un copolímero del mismo.

En ciertos aspectos de la invención, las células en el dispositivo son células condrocitos o células de tipo condrocito, tales como en las que las células condrocitos o las células de tipo condrocito secretan una molécula seleccionada del grupo que consiste en agregano, colágeno tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión al cartílago y perlecán. En casos particulares, las células se diferencian a partir de células fibroblastos y/o células madre. Ejemplos de células fibroblastos son fibroblastos dérmicos, fibroblastos de los tendones, fibroblastos de ligamentos, fibroblastos sinoviales, fibroblastos de prepucio o una mezcla de los mismos.

En aspectos particulares, la primera membrana está comprendida por un polímero biodegradable, biocompatible y reabsorbible. En aspectos adicionales, la primera membrana está comprendida por un poliacrilato, un polivinilideno, un copolímero de poli(cloruro de vinilo), un poliuretano, un poliestireno, una poliamida, un acetato de celulosa, un nitrato de celulosa, una polisulfona, un polifosfaceno, un poliacrilonitrilo, un poli(cloruro de acrilonitrilo/covinilo) o un derivado, copolímero o mezcla de los mismos. En aspectos específicos, la primera membrana es generada por la formación de complejos de polielectrolito. En aspectos específicos, la segunda membrana está comprendida por ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli-ε-caprolactona (PCL), poliuretano (PU), polidioxanona (PDO), un polietileno, poli(sebacato de glicerol) (PGS) o un derivado, copolímero, o mezcla de los mismos. En realizaciones adicionales, la tasa de reabsorción de la segunda membrana es más lenta que la tasa de reabsorción de la primera membrana.

En realizaciones particulares, el dispositivo implantable comprende uno o más nutrientes, factores de crecimiento y/o medicamentos. En algunos casos, el dispositivo implantable se puede definir además como aquel que comprende un medio de cultivo de células basales que comprende el uno o más nutrientes, factores de crecimiento y/o medicamentos. En realizaciones específicas, el medio se complementa con suero bovino fetal (FBS), ácido

- ascórbico, y/o dexametasona. Los nutrientes, factores de crecimiento y/o medicamentos pueden estar presentes en el almacén, el primer volumen, el segundo volumen, o una combinación de los mismos, en ciertos casos. El factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), BMP-4, BMP-6, BMP-7, proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de insulina uno (IGF-I), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), FGF-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y una mezcla de los mismos, en realizaciones específicas y el medicamento puede definirse adicionalmente como uno o más de un antibiótico, agente antifúngico o un agente antiviral.
- En ciertos aspectos de la invención, la estructura comprende uno o más tubos y/o comprende uno o más catéteres y/o uno o más depósitos. En casos particulares, la estructura se define además como que comprende uno o más de un primer tubo; un segundo tubo; opcionalmente, un primer depósito; y, opcionalmente, un segundo depósito. En una realización específica, el primer y segundo tubos comprenden respectivamente primeros extremos posicionados dentro del segundo volumen, en el que los tubos primero y segundo comprenden, respectivamente, segundos extremos conectados al primer y segundo depósitos, o ambos. El primer y/o segundo tubos están comprendidos, en un caso a modo de ejemplo, por el mismo material que la segunda membrana y el primero y/o segundo tubos están comprendidos, en un caso a modo de ejemplo, por caucho de silicona.
- En una realización de la invención, existe un método de reparación del cartílago dañado en una articulación (tal como un disco intervertebral) de un individuo, que comprende la administración de un dispositivo de acuerdo con la invención a la respectiva articulación (como disco intervertebral) del individuo. En un aspecto específico, el método comprende además la preparación de la composición de células/armazón en condiciones *ex vivo* adecuadas. En otra realización específica, la preparación de la composición de células/armazón se define como someter una o más células a un almacén en condiciones adecuadas. La preparación de la composición de células/armazón puede ocurrir durante no menos de aproximadamente dos a tres días, en ciertos aspectos de la invención. En una realización específica, las condiciones adecuadas permiten la proliferación de las células, tales como, por ejemplo, permitir la estimulación de la diferenciación condrogénica. Las condiciones adecuadas pueden definirse además en ejemplos de realización por ser en cultivo en micromasa de alta densidad, presencia de baja tensión de oxígeno (entre aproximadamente 1,0 % -7,5 %), presencia de tensión mecánica y/o alimentación por un medio suplementado con factores de crecimiento, ácido ascórbico y/o dexametasona.
- En realizaciones particulares, la composición de células/armazón se somete a tensión mecánica, la cual puede ser presión hidrostática, tensión de cizallamiento de fluido o una combinación de las mismas, por ejemplo. En una realización específica, la tensión mecánica es intermitente. En casos particulares, la tensión mecánica es la tensión de cizallamiento del fluido y el almacén es un almacén microfluídico.
- En otras realizaciones particulares, la etapa de administración se define como la implantación del dispositivo usando cirugía mínimamente invasiva. En un caso ilustrativo, después de la implantación del dispositivo en el individuo, la segunda membrana se infla para llenar un vacío en la articulación, tal como un disco intervertebral. En otro caso ilustrativo, antes de la implantación del dispositivo en un disco intervertebral del individuo, al menos parte de un disco intervertebral endógeno se elimina del individuo. En realizaciones específicas, la articulación relacionada con la invención puede ser un disco intervertebral, una rodilla, un hombro, un codo, una cadera, o una articulación temporomandibular.
- En ciertos aspectos de la invención, la estructura del dispositivo comprende: un primer tubo que tiene un primer y segundo extremos, estando dicho primer extremo del primer tubo dispuesto dentro del segundo volumen; un segundo tubo que tiene un primer y segundo extremos, estando dicho primer extremo del segundo tubo dispuesto dentro del segundo volumen; un primer depósito; y un segundo depósito, en el que después de la implantación del dispositivo en un disco intervertebral en el individuo y después del inflado de la segunda membrana, los segundos extremos del primer y segundo tubo están conectados respectivamente al primer y segundo depósitos. En una realización específica, el primer y segundo depósitos están colocados subcutáneamente en el individuo. Los métodos de la invención pueden comprender además el sellado de la primera membrana, el sellado de la segunda membrana, o ambos. En un aspecto específico, al menos parte del segundo volumen se intercambia. En una realización ilustrativa, el método de la invención comprende además retirar al menos parte del segundo volumen a través del primer depósito. En otro aspecto específico, el método comprende la eliminación de fluido del primer o segundo depósito, suministrando un fluido al respectivo segundo o primer depósito, o de forma concomitante eliminando el fluido del primer o segundo depósito y suministrando un fluido al respectivo segundo o primer depósito.
- En ciertos casos, la composición de células/armazón se inserta en la primera membrana antes de la implantación del dispositivo en el individuo o la composición de células/armazón se inserta en la primera membrana posterior después de la implantación del dispositivo en el individuo. En una realización específica, la primera membrana se inserta en la segunda membrana antes de la implantación del dispositivo en el individuo o la primera membrana se inserta en la segunda membrana después de la implantación del dispositivo en el individuo.
- En una realización de la invención, se proporciona un método de preparación de una composición de células/armazón, en el que las células son condrocitos o células de tipo condrocito, que comprende: someter las

células capaces de diferenciarse en una célula de tipo condrocito al armazón; someter las células a tensión mecánica y, opcionalmente, someter las células a uno o más factores de crecimiento adecuados para la diferenciación en un condrocito o en una célula de tipo condrocito. En una realización específica, la tensión mecánica es intermitente.

5 En una realización adicional, se proporciona un kit que comprende el dispositivo de la invención, en el que el dispositivo se encuentra en uno o más recipientes adecuados. En realizaciones específicas, el kit comprende además células que son células condrocitos, células de tipo condrocito o células que son capaces de diferenciarse en células condrocitos o células de tipo condrocito.

10 En una realización adicional, se proporciona un dispositivo implantable, que comprende: una composición de células/armazón encapsulada dentro de una membrana, teniendo dicha membrana un interior y un exterior; y una estructura para el intercambio de al menos parte del fluido que está dentro de la membrana, en el que la membrana tiene una o más de las siguientes características: semipermeable, biocompatible, biodegradable; y reabsorbible.

15 En otra realización, se proporciona una estructura híbrida para la reparación del cartílago, que comprende: un dispositivo de encapsulación que comprende un material inerte y un núcleo vivo que comprende células de tipo condrocito, en el que dicho dispositivo de encapsulación encapsula el núcleo vivo.

20 En una realización adicional, se proporciona un biorreactor *in vivo* para la ingeniería del cartílago, que comprende una membrana biodegradable que encapsula las células, en el que dichas células son capaces de diferenciarse a condrocitos o células de tipo condrocito, en el que la encapsulación de dichas células proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento y diferenciación *in vivo* de dichas células, en el que dichas condiciones comprenden proporcionar un régimen de carga fisiológica en dichas células. En una realización específica, el régimen de carga fisiológica comprende forzar la columna vertebral de un individuo.

25 Lo anterior resume en líneas generales y no detalladamente las características y ventajas técnicas de la presente invención con el fin de que la descripción detallada de la invención que sigue pueda entenderse mejor. Las características y ventajas adicionales de la invención se describirán a continuación y forman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que la concepción y la realización específica divulgadas pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. También debe tenerse en cuenta por los expertos en la técnica que tales construcciones equivalentes no se apartan del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las nuevas características que se cree que son características de la invención, tanto en cuanto a su organización como método de funcionamiento, junto con otros objetos y ventajas se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción si se consideran en conexión con las figuras adjuntas. Se ha de entender expresamente, sin embargo, que cada una de las figuras se proporciona con el propósito de ilustración y descripción solamente y no pretende ser una definición de los límites de la presente invención.

40 Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones tomadas conjuntamente con los dibujos adjuntos.

La FIG. 1 ilustra un ejemplo de una sección transversal del espacio intervertebral L4-L5.

45 La FIG. 2 muestra un abordaje posterior a un espacio intervertebral, incluyendo un ejemplo de tejido herniado y tejido discal degenerado.

La FIG. 3 ilustra un ejemplo de realización de la ubicación del defecto del anillo para la eliminación del disco.

50 La FIG. 4 muestra la sección transversal abdominal y el sistema de drenaje en las realizaciones de la invención, incluyendo un ejemplo de incisión en la línea media y un ejemplo de depósitos de Holter-Rickham (Codman Shurtleff y, Inc.; Raynham, MA)

55 Tal como se usa en la presente memoria, la especificación, "un" o "una" puede significar uno o más. Tal como se usa en la presente memoria en la(s) reivindicación(es), cuando se utiliza junto con la palabra "comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Tal como se usa en la presente memoria "otro" puede significar al menos un segundo o más. En realizaciones específicas, los aspectos de la invención pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" una o más secuencias de la invención, por ejemplo. Algunas realizaciones de la invención pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas de un método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descritos en la presente memoria se pueda implementar en relación con cualquier otro método o composición descritos en la presente memoria.

## 60 I. Definiciones

65 El término "biorreactor" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sistema en el que se efectúa una conversión biológica. Las células se cultivan de una manera controlada y se convierten por medio de reacciones específicas, en realizaciones específicas. En algunos aspectos de la invención, un biorreactor es capaz de regular uno o más de los siguientes parámetros: temperatura, pH del medio, intercambio de gases, estímulos mecánicos, pO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> y humedad. Un sistema de perfusión está presente en el biorreactor (perfusión-biorreactor), en



realizaciones específicas, para proporcionar un suministro constante de nutrientes y para eliminar de manera eficiente los productos de desecho. Las tensiones mecánicas son un factor importante de la función de los condrocitos. Las combinaciones de las tensiones mecánicas se desarrollan simultáneamente durante el movimiento de la articulación de forma intermitente, lo que incluye la deformación de células y tejidos, las fuerzas de compresión y de cizallamiento, el flujo de fluido y los cambios en la presión hidrostática, por ejemplo. Estas condiciones se reproducen con el biorreactor, en ciertos aspectos.

El término “catéter” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tubo hueco, que puede ser flexible o rígido, que se emplea para drenar el líquido desde una zona en el cuerpo.

La expresión “células de tipo condrocito” como se utiliza en la presente memoria se refiere a células que no son condrocitos primarios pero se derivan de las células madre (tales como células madre mesenquimales) o células de otros linajes (tales como los fibroblastos). Estas células de tipo condrocito tienen un fenotipo de condrocitos (células del cartílago). Esto significa que no sólo tienen una forma de condrocitos (células poligonales y/o romboidales, por ejemplo), sino que también son capaces de agregar y producir componentes de la matriz del cartílago, como proteoglicano sulfatado y colágeno tipo II, por ejemplo. Por lo tanto, los ejemplos de marcadores de células de tipo condrocito incluyen, por ejemplo, uno o más de agregano, que es un condroitín sulfato y proteoglicano queratán sulfato, colágeno de tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión al cartílago y perlecán, que es un proteoglicano de heparán sulfato.

El término “copolímero”, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polímero que comprende dos o más monómeros diferentes (polímero: un compuesto de origen natural o sintético que comprende moléculas grandes compuestas por una serie conectada de monómeros simples repetidos).

El término “desdiferenciación” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la regresión de una célula o tejido especializado a una forma más simple, más embrionaria, no especializada. Cuando se cultivan condrocitos *ex vivo* en monocapas, estos carecen de su entorno *in vivo* (y sobre todo de la tridimensionalidad y el estrés mecánico) y se someten a cambios morfológicos y moleculares llamados desdiferenciación. Este proceso implica un cambio en la morfología y un cambio de la expresión de genes específicos de condrocitos a la de genes que normalmente se expresan en fibroblastos.

El término “discectomía” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento para eliminar parte o la totalidad de un núcleo degenerado a través de una fenestración dentro del anillo. Se realiza a través de un método mínimamente invasivo utilizando un microscopio operatorio. El procedimiento libera las raíces mediante la eliminación del núcleo de compresión herniado (extruido). Permite la eliminación de los restantes núcleos degenerados a través de una tenotomía (apertura) dentro del anillo. En particular, una discectomía es en realidad un herniectomía con la eliminación de los fragmentos de núcleo degenerado.

El término “encapsulado” o “encapsulación” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que está encerrado dentro de un límite, tal como en un saco membranoso.

La expresión “tensión de cizallamiento del fluido” se refiere al movimiento de los fluidos sobre una superficie, lo que tiene como resultado la generación de la tensión de cizallamiento. La tensión de cizallamiento es un estado de estrés en el que el estrés es paralelo a una superficie. El armazón microfluídico permite el flujo de fluido en los microcanales. Este flujo de fluido induce tensión de cizallamiento del fluido en las células sembradas en el armazón.

El término “hermético” tal como se usa en la presente memoria se refiere a que es estanco a los líquidos, tal como mediante fusión o sellado, por ejemplo. En particular, una membrana hermética no permite que el líquido en su interior salga de la membrana, aunque se permite que el oxígeno y el dióxido de carbono atraviesen la membrana (como la entrada de oxígeno a través de la membrana y la salida de dióxido de carbono de la membrana).

La expresión “presión hidrostática” se refiere a la presión ejercida o transmitida (por ejemplo, agua) en reposo. El disco intervertebral está expuesto a amplias gamas de presión hidrostática intradiscal durante diferentes ejercicios de carga y están en su mínimo (aproximadamente 0,25 Mpa) durante la posición de acostado o relajado y en su máximo (aproximadamente 2,5 a 5 MPa) durante el levantamiento de pesos con una vuelta en círculo. Estas diferentes magnitudes de carga influyen en el disco intervertebral por la alteración de recambio de la matriz del disco, dependiendo de sus magnitudes. Se han realizado numerosos estudios para determinar el mejor régimen para aplicar la presión hidrostática intermitente (IHP) *in vitro* a las células para inducir la diferenciación condrogénica de las células *in vitro*. Se han probado diferentes regímenes. En estos estudios, la IHP aplicada está dentro de los rangos de amplitud desde 0,5 MPa hasta aproximadamente 5 MPa y un intervalo de frecuencia de 0,01 Hz a 1 Hz. En realizaciones específicas, el dispositivo de encapsulación está diseñado para transmitir presión hidrostática *in vivo* a la construcción de célula-matriz. La envoltura externa llena de líquido (medio) se comprime durante diferentes ejercicios de carga; bajo esta compresión parte del medio líquido se difunde a través de la membrana interna semipermeable, lo que permite la perfusión de la construcción de célula-matriz y genera la presión hidrostática dentro de la construcción célula-matriz. En este sistema, se aplica la presión hidrostática fisiológica apropiada a la construcción de célula-matriz, lo que es útil para la diferenciación condrogénica de las células.

El término "hipoxia" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una deficiencia en oxígeno. En aspectos específicos, se refiere a la tensión de oxígeno que es menor que aproximadamente 20 %.

5 El término "articulación", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una región en el cuerpo en la que se unen dos huesos de un esqueleto.

10 El término "membrana" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una capa flexible de material que separa los diferentes tipos y/o áreas de material biológico. Puede estar comprendida por material natural y/o sintético y puede ser permeable, por ejemplo, a las sustancias en solución.

15 La expresión "armazón microfluídico" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un material que comprende un sistema de microcanales.

20 La expresión "cirugía mínimamente invasiva", tal como se usa en la presente memoria se refiere a los procedimientos realizados a través de una o más incisiones pequeñas en un individuo. Por ejemplo, en ciertos aspectos, la cirugía mínimamente invasiva utiliza técnicas especializadas, cámaras en miniatura con microscopios, linternas diminutas de fibra óptica y/o monitores de alta definición. Para el individuo, la cirugía mínimamente invasiva significa menos traumatismo en el cuerpo, menos pérdida de sangre, cicatriz o cicatrices quirúrgicas más pequeñas y menor necesidad de medicación para el dolor, en comparación con la cirugía abierta convencional. Los individuos pueden abandonar el centro médico más pronto después de la cirugía mínimamente invasiva y volver a sus actividades normales más rápidamente que con la cirugía abierta convencional.

25 El término "depósito" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un dispositivo que actúa como una cámara de inyección. En realizaciones específicas, el tipo de depósito puede ser uno que se utiliza rutinariamente en la técnica para administrar fármacos (antibióticos, por ejemplo, en caso de meningitis o ventriculitis), en el sistema ventricular cerebral (de ahí el término de "ventriculostomía"), en una vena (quimioterapia oncológica), o en el espacio subaracnoideo medular ( morfina para el alivio del dolor), por ejemplo. En aspectos particulares, puede ser considerado como un tipo de sistema de administración de fármacos. Se compone de varias partes: 1) una parte superior de material (denominado "silástico") a base de silicona que permite pinchazos repetidos sin perder sus características de impermeabilidad; 2) una base de acero inoxidable que evita las lesiones de los tejidos subyacentes por la aguja y 3) un extremo silástico que se conecta a un catéter. El catéter también puede estar hecho de silástico. Su extremo distal puede ser llevado al sitio y cortarse al tamaño adecuado, mientras que su extremo proximal está conectado al extremo del depósito. El sistema del ejemplo define una cámara de 1 a 2 cm<sup>3</sup>, de ahí su nombre de "depósito" (tanque).

30 El término "armazón" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una construcción de polímero biodegradable poroso que soporta, por ejemplo, el crecimiento celular y/o la migración.

35 El término "siembra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la implantación de células en un armazón. Las células se adherirán al armazón y luego crecerán y se diferenciarán en el armazón.

## II. Realizaciones generales de la invención

40 En realizaciones generales de la invención, se proporciona un dispositivo y métodos de su uso, en el que el dispositivo comprende una construcción de células-matriz de células de tipo condrocito encapsuladas en una membrana de varias capas. Aunque se puede reparar cualquier tejido al menos en parte mediante los métodos de la invención, incluyendo cualquier tejido de cartílago, en un ejemplo de realización concreto, se repara el cartílago del disco intervertebral o el cartílago de la articulación. Los métodos de ejemplo de la invención utilizan una combinación de un núcleo vivo y un núcleo inerte o estructura, proporcionando así una estructura híbrida. En aspectos particulares de la invención, el núcleo vivo comprende una construcción de célula-matriz de las células de tipo condrocito, como se derivan de los HDF y la estructura inerte comprende el núcleo vivo y se implanta en un paciente utilizando, por ejemplo, un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo.

45 La presente invención proporciona un método para la reparación biológica del cartílago utilizando fibroblastos dérmicos humanos (HDF) autólogos como fuente de células. La presente invención también proporciona un dispositivo que comprende una construcción de células-matriz de células, tales como células de tipo condrocito, que están encapsuladas en una membrana de varias capas. En una realización particular, la invención se refiere al crecimiento y diferenciación de las células *in vivo* utilizando un dispositivo especial. La diferenciación condrogénica es inducida por estrés mecánico, y en aspectos particulares, por ejemplo, por presión hidrostática intermitente (IHP) y/o la tensión de cizallamiento de fluido.

50 Una realización general de la invención es el uso de HDF como fuente de células para la ingeniería de nuevo cartílago para el disco intervertebral, ya que estas células son fáciles de cosechar y de cultivar. La idea es inducir la diferenciación de estas células en células de tipo condrocito. Ya existe alguna evidencia de la diferenciación condrogénica de HDF en células de tipo condrocito. Sin embargo, estos estudios son solamente *in vitro* y la técnica para diferenciar las células se basa en el uso de factores de crecimiento específicos, hipoxia o matriz específica

tales como agrecano.

Debido a su diseño, este dispositivo permite, por ejemplo, uno o ambos de los siguientes: 1) la difusión de nutrientes y oxígeno a las células vivas y/o 2) la transferencia de la carga a las células. Esta fuerza mecánica y sobre todo la IHP es crítica para la diferenciación condrogénica de fibroblastos. Se sabe que la IHP es el estímulo más potente para la inducción y mantenimiento del fenotipo de los condrocitos. Cuando los condrocitos se cosechan a partir de cartílago para ser utilizado para diseñar *in vitro* nuevo cartílago, estas células necesitan ser expandidas, pero esto hace que los condrocitos se diferencien. Se ha demostrado que la IHP pueda rediferenciar las células en condrocitos. Las personas que utilizan condrocitos del cartílago para diseñar *in vitro* cartílago a menudo utilizan tensiones mecánicas y especialmente IHP como inductor de la diferenciación. Sin embargo, no hay nada en la literatura sobre los efectos de la IHP sobre la diferenciación condrogénica de HDF.

En realizaciones de la invención, hay al menos dos componentes en el dispositivo: 1) construcción célula-matriz, en la que las células (HDF, por ejemplo) se siembran en un almacén (y las células que no se unen al almacén se pueden lavar); 2) dispositivo de encapsulación. En realizaciones específicas, el dispositivo de encapsulación *in vivo* está comprendido por dos membranas concéntricas, en realizaciones específicas: 1) una membrana interna es una membrana semipermeable que envuelve la construcción de células-andamiaje (esta membrana semipermeable es permeable a moléculas pequeñas y por lo tanto permite la difusión de nutrientes y oxígeno y la eliminación de los desechos, pero es impermeable a las macromoléculas tales como colágeno y glicosaminoglicanos, por ejemplo; estas macromoléculas que forman la matriz extracelular natural se retienen a continuación en el almacén); y 2) una membrana externa es hermético a los fluidos pero permeable al oxígeno, y es expandible e inflable con el fin de ser implantada mediante un procedimiento quirúrgico posterior mínimamente invasivo (en realizaciones específicas, cuando se expande se ajustará a la cavidad de la discectomía, por ejemplo, se ajustará exactamente a la cavidad). La membrana externa se llena con un medio que nutre las células. El fluido encerrado dentro de la envoltura forma un entorno de fluido que transfiere IHP a las células vivas. Aproximadamente el día después de la cirugía, cuando el individuo puede levantarse y empezar a caminar de nuevo, este aplica alguna carga sobre la columna vertebral y en especial en el nivel instrumentado. Por lo tanto, el núcleo vivo recibe el régimen de presión hidrostática cíclica adecuada bajo carga fisiológica a través de la envoltura que se llena con medio, lo que es útil para el crecimiento y la conversión de HDF. Por lo tanto, en ciertos aspectos el individuo camina aproximadamente un día después de la implantación del dispositivo, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días o aproximadamente cinco o más días después de la implantación del dispositivo.

En realizaciones específicas, la membrana externa llena de medio está conectada a un sistema de drenaje para cambiar regularmente el medio. La diferenciación condrogénica de los HDF es inducida por la tensión mecánica y especialmente por la presión hidrostática (IHP) y/o la tensión de cizallamiento del fluido *in vitro* y después *in vivo*. Ejemplos de condiciones de co-cultivo son las siguientes: cultivo de micromasa de alta densidad, suplementación con BMP-2, ácido ascórbico e hipoxia, por ejemplo.

Esta invención resuelve muchos de los problemas del campo. Los nutrientes y factores de crecimiento se proporcionan a la construcción de célula-matriz a través del medio *in situ*. Se evita el problema de la difusión de nutrientes a partir del tejido natural que lo rodea (placas terminales) que suele ser deficiente debido a la degeneración de estas estructuras. Al medio se añaden factores de crecimiento importantes para la diferenciación condrogénica de los HDF. En aspectos específicos, se emplean HDF, lo que evita el uso de técnica invasiva para cosechar los condrocitos. Los HDF, o cualquier otras células, se pre-diferencian *in vitro* durante un corto período de tiempo y continúan creciendo y diferenciándose *in vivo*. El dispositivo de encapsulación con su envoltura externa que contiene fluidos proporcionará la carga fisiológica y las fuerzas de compresión ideal para la diferenciación condrogénica de los HDF.

### III. La construcción híbrida

La invención emplea una construcción híbrida para la reparación de cartílago en una articulación, tal como un disco intervertebral. Ejemplos de realización de la construcción híbrida se describen en la presente memoria y en ciertos aspectos la construcción híbrida es un dispositivo implantable, para la implantación en un mamífero, tal como un ser humano, perro, gato, caballo, cerdo, oveja, cabra, etcétera. En aspectos particulares, una construcción híbrida está comprendida por al menos un núcleo vivo, que comprende células y un almacén y una estructura inerte.

#### A. Composición de células/armazón

El núcleo vivo, al que puede referirse como la composición de células/armazón, es una construcción de célula-matriz y comprende células sembradas en un almacén (al que puede referirse como una matriz). En una realización específica, el almacén comprende perlas de alginato; un almacén microfluídico (el almacén microfluídico podría estar hecho de cualquier biopolímero biodegradable [polímeros biodegradables orgánicos: (ácido poli-L-láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), hidrogeles naturales (colágeno, HA, alginato, agarosa, quitosano, combinación colágeno/HA, quitosano/GAG, colágeno/GAG) y/o hidrogeles sintéticos (poli (óxido de etileno), (PEO), poli (alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(propileno-co-fumarato co-etilenglicol) (P(PF-co-EG))], por ejemplo. En realizaciones específicas, se emplean ligandos de adhesión celular

tales como péptidos o polisacáridos. Las secuencias peptídicas pueden ser capaces de unirse a los receptores celulares. Estos péptidos pueden comprender las secuencias de aminoácidos de ejemplo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), arginina-ácido glutámico-ácido aspártico-valina (REDV), tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina (YIGSR) o isoleucina-lisina-valina-alanina-valina (IKVAV) y pueden estar unidos al armazón, en el que los ligandos y/o factores de crecimiento se pueden incorporar para regular el destino celular. De hecho, los factores de crecimiento se pueden incorporar en el armazón o incluirse en el medio en la membrana externa, por ejemplo. Los materiales de andamiaje pueden ser biodegradables y la velocidad de biodegradación puede ser manipulada.

De acuerdo con la invención y como se explicó anteriormente, los HDF se diferencian en células de tipo condrocito bajo tensión mecánica, ya sea *in vitro* o *in vivo* o ambos, *in vitro* seguido de *in vivo*, por ejemplo. Como se explicó anteriormente, condiciones de co-cultivo importantes incluyen el cultivo de alta densidad celular; factores de crecimiento (BMP-2) y/o ácido ascórbico, por ejemplo. Los HDF también se pueden diferenciar en células de tipo condrocito en condiciones de baja tensión de oxígeno y cultivo en agregados con el factor de crecimiento insulínico uno (IGF-I). Como se ha mencionado, se utilizan biorreactores para inducir la proliferación y diferenciación *in vitro* de HDF. En aspectos particulares de la invención, la estructura inerte de la presente invención se utiliza para inducir la diferenciación *in vivo*. En realizaciones específicas de la invención, los HDF en perlas de alginato o HDF sembrados en un armazón microfluídico o los HDF sembrados en cualquier otro armazón polimérico están encapsuladas en una membrana semipermeable que es parte de una estructura inerte. Una función de la membrana semipermeable es encapsular la construcción de condrocitos-matriz para concentrar la producción de proteínas de la MEC. Esta membrana permite, por ejemplo, el paso de O<sub>2</sub>, nutrientes/desechos y CO<sub>2</sub>.

En realizaciones específicas, el armazón se refiere a una construcción de polímero biodegradable poroso para soportar el crecimiento celular y/o la migración. En realizaciones específicas, este material es no tóxico, biocompatible y biodegradable.

En ejemplos de realizaciones, se emplea alginato para el armazón. El alginato es un polisacárido natural aislado de algas marinas. Se trata de un polisacárido compuesto de monómeros de D-manuronato y L-guluronato. Cuando se reticula con iones de calcio, se forma un gel que es biocompatible, biodegradable. El alginato está bien establecido como material de matriz para el tejido dentro de la medicina regenerativa. Se ha utilizado más ampliamente que otros hidrogeles para evaluar el potencial *in vivo* de los armazones de hidrogel para la ingeniería de cartílago. En esta invención se pueden usar macroperlas de alginato (de 1-3 mm de tamaño) o microperlas de alginato (250-500 μm). Se prefieren las microperlas de alginato. Estas perlas más pequeñas tienen la ventaja de tener una relación superficie-volumen mayor, lo que permite no solo un buen transporte de nutrientes esenciales, sino que también son menos frágiles. El alginato es biocompatible y está aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. para el uso humano.

Los HDF se pueden sembrar en macroperlas de alginato (como se describe a continuación) o preferentemente en microperlas de alginato. Existen diferentes técnicas conocidas en la técnica para generar microperlas de alginato. Se producen generalmente mediante generación electrostática de gotas. Por ejemplo, se pueden sembrar HDF en microperlas de alginato como sigue. Se disuelve polvo de alginato (Sigma, St Louis, MO) en agua WFI a una concentración de 2,2 % p/p y luego se mezcla con una suspensión de HDF en medio de cultivo para obtener concentraciones finales de 1,5 % p/p de alginato y 10<sup>7</sup> células/ml. A continuación se producen microperlas de alginato mediante la generación electrostática de gotitas. En resumen, la suspensión de células/alginato se extruye a través de una aguja de acero inoxidable roma cargada positivamente a un caudal constante de 14,0 ml/h mediante una bomba de jeringa y las gotas resultantes se recogen en un baño de gelificación (1,5 p/v CaCl<sub>2</sub>). A medida que los iones de Na<sup>+</sup> se intercambian con los iones de Ca<sup>2+</sup>, las gotitas de alginato se endurecen y forman microperlas insolubles con células atrapadas. Las microperlas se dejan durante 30 min en el baño de gelificación con el fin de completar la gelificación.

En realizaciones particulares también se emplean armazones microfluídicos. Son los armazones complejos con resolución a escala micrométrica. Estos armazones presentan una red de micro-canales que permiten el flujo de fluido dentro del armazón. Esta red de microcanales ayuda a proporcionar nutrientes y factores solubles a las distintas secciones del armazón. Estos armazones pueden estar hechos de diferentes biopolímeros. Pueden estar hechos de polímeros sintéticos tales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA); hidrogeles sintéticos tales como poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(propilenglicol fumarato-co-etilenglicol) (P(PF-co-EG) o de poli(glicerol-sebacato) (PGS), que es un elastómero biodegradable. En la invención, este armazón microfluídico se encapsula con una membrana semipermeable. Esta membrana semipermeable permite la perfusión de medio que contiene nutrientes y factores de crecimiento dentro del armazón. Al circular dentro de la red de microcanales, el medio aplicará tensión de cizallamiento del fluido en las células sembradas en este armazón. Esta fuerza mecánica es crítica para la diferenciación condrogénica de los HDF.

## B. La estructura inerte

En la invención, la construcción híbrida emplea una estructura inerte, como parte de su composición. Las funciones de la estructura inerte pueden ser biológicas (suministro de nutrientes y/o factores de crecimiento) y/o mecánicas

(para transferir las fuerzas mecánicas, tales como en la composición de células/armazón; tales fuerzas pueden incluir IHP y/o tensión de cizallamiento del fluido), por ejemplo. La estructura inerte puede funcionar como un "biorreactor *in vivo*" mediante la transferencia de la tensión mecánica y proporcionando medio (por perfusión a través de la membrana semipermeable) a la composición de células/armazón.

5 En ciertas realizaciones, las funciones de la estructura inerte incluyen una o más de los siguientes: 1) encerrar herméticamente el núcleo vivo; 2) actuar como una membrana semipermeable, permitiendo que ciertas moléculas (por ejemplo, nutrientes, factor de crecimiento, etc.) pasen a través de ella por difusión (y ocasionalmente "difusión facilitada" especializada) en ciertas condiciones físico-químicas (por ejemplo, presión hidrostática, concentración osmótica, temperatura, etc.); 3) transferir la carga y compartir el estrés mecánico dinámico (presión hidrostática) al compartimiento vivo actuando como un inductor de la diferenciación celular y/o 4) actuar como un biorreactor *in vivo*.

15 En realizaciones específicas, la estructura inerte puede ser considerada como un dispositivo de encapsulación. Para ciertas realizaciones, está diseñada para aplicar una tensión mecánica sobre las células sembradas en la composición armazón tridimensional. La membrana externa del dispositivo de encapsulación está llena de líquido (medio). El fluido encerrado dentro de la envoltura forma un entorno de fluido que transfiere la presión hidrostática cíclica a las células vivas. Cuando el paciente se pone de pie, por ejemplo, se aplica cierta carga en la columna vertebral que se transfiere a las células vivas a través de la envoltura externa que se llena con fluido. Esta membrana proporciona la carga fisiológica y las fuerzas de compresión adecuadas para la diferenciación condrogénica de las células, tales como HDF. En el caso de las células incrustadas en un armazón microfluídico, el medio que circula dentro de los micro-canales también aplica tensión de cizallamiento de fluido a las células. Este esfuerzo de cizallamiento de fluido es otra fuerza que induce la diferenciación condrogénica de las células.

25 En realizaciones específicas, la membrana está generalmente en forma de globo y en realizaciones adicionales las membranas son generalmente concéntricas entre sí. En otras realizaciones específicas, la estructura inerte comprende dos biopolímeros en forma de globo expandible, concretamente, globo interno "I", que está encerrado dentro de un globo externo "E". Por lo tanto, la estructura inerte comprende dos envolturas concéntricas capaces de ser sucesivamente infladas y que tienen actividad de inflado. En ciertos aspectos, se puede utilizar un número X de membranas en el dispositivo, en el que X es cualquier número entero mayor que uno. Es decir, se pueden instalar X globos de forma concéntrica a modo de capas de una cebolla, definiendo cada uno de ellas un espacio con una función específica (por ejemplo, para los residuos, medios, oxígeno y/o para la conexión del injerto al tejido natural).

35 En una realización, el globo, capa o envoltura exteriores "E" comprende un material biocompatible flexible, inflable, hermético, expansible, y/o reabsorbible (tiempo  $T_1$ , en el que  $T_1$  es el tiempo de resorción completa de "E") que es capaz de ser sellado una vez instalado en la cavidad. En realizaciones específicas, el globo externo "E" es capaz de tener o tiene una o más de las siguientes actividades: 1) recibir un segundo globo o capa o envoltura internos "I" que encierra las células (en forma de construcción de matriz celular o solución de células o injerto); 2) ser inflado con un medio (por ejemplo, líquido) o para expandir su pared (por ejemplo, por hinchamiento) con el fin de llenar la cavidad resultante de la disectomía y 3) cerrar el defecto del anillo para evitar que se "hernie" o que salga del espacio inter-somático través de la incisión de tenotomía una vez que la construcción está sometida a una carga.

45 En una realización, el globo o capa internos "I" comprende un material biocompatible, elástico, inflable, semipermeable y/o reabsorbible (tiempo  $T_2 < T_1$ , en el que  $T_2$  es el tiempo de reabsorción completa de "I") que es capaz de sellar el núcleo vivo una vez instalado en la capa externa. El globo interno (envoltura, membrana o capa) "I" es capaz de tener o tiene las siguientes actividades: 1) envolver herméticamente el núcleo vivo; 2) actuar como una membrana semipermeable permitiendo que ciertas moléculas (por ejemplo, nutrientes, factores de crecimiento, etc.) pasen a través de ella por difusión (y ocasionalmente "difusión facilitada" especializada) en ciertas condiciones físico-químicas (por ejemplo, presión hidrostática, concentración osmótica, temperatura, etc.); y 3) transferir la carga al núcleo vivo de modo que comparta la tensión mecánica con el mismo, actuando así como un inductor de la diferenciación celular.

55 De acuerdo con un aspecto de la invención, la combinación de un medio de compartimiento externo (tal como un líquido, por ejemplo) o pared hinchada (tal como un hidrogel hidratado, por ejemplo) "E" y la envoltura semipermeable interna proporcionan un sistema de suministro de nutrientes y factores de crecimiento capaces de alimentar un núcleo vivo interior. Estas envolturas también transfieren las fuerzas mecánicas, incluyendo la presión hidrostática al núcleo vivo.

60 La estructura inerte es un dispositivo de encapsulación destinado a envolver, alimentar y diferenciar un núcleo vivo hecho de células, tales como HDF.

65 En una realización preferida, la estructura inerte comprende dos membranas biopoliméricas en forma de globo expandible, concretamente, la membrana interna "I", que está encerrada dentro de una membrana externa "E". Por lo tanto, la estructura inerte comprende dos envolturas concéntricas destinadas a ser infladas sucesivamente. En la posición de reposo, las dos envolturas "I" y "E" son planas, deformables, con forma y encajan entre sí. En realizaciones específicas, ambas pueden ser selladas una vez implantadas. La composición de estructura inerte puede ser determinada por la elección del sistema de ingeniería de tejidos.

La envoltura exterior "E" comprende un material que es inflable (con el fin de ser implantado plano a través de un abordaje posterior mínimamente invasivo, ser cargado después con el núcleo vivo y después inflarse con la solución de medios); elástico (para transferir el reparto de carga sobre el núcleo vivo); expandible (para permitir su expansión y llenar la cavidad resultante de la discectomía); permeable al  $O_2$  pero hermético a los fluidos: la hipoxia relativa es un parámetro útil de conversión de los HDF, pero la tensión de  $O_2$  dentro del disco natural es apropiadamente baja; biodegradable (para permitir que el injerto vuelva a conectar con el disco natural); biocompatible (para minimizar la reacción inflamatoria); reabsorbible (tiempo  $T_1$ ) o una combinación de los mismos.

En realizaciones específicas, "E" se puede colocar en una articulación, por ejemplo, en la cavidad resultante del curetaje de un espacio inter-somático. También puede ser mecánicamente capaz de mantener la altura del disco bajo carga. En realizaciones adicionales, "E" recibe un segundo globo interno "I" que encierra el núcleo vivo. "E" puede ser inflado con una solución de fluido (por ejemplo, los medios) para extenderse en la cámara (cavidad resultante de la discectomía) periféricamente hasta el tejido discal restante y llenar la cavidad. "E" está configurado de tal manera que permite cambiar los medios (eliminación de residuos metabólicos y/o reposición de nutrientes y/o factores de crecimiento, por ejemplo), tal como por ejemplo bajo un régimen isobárico. En ciertos aspectos, "E" actúa como un biorreactor *in vivo* mediante la transferencia de la compartición de carga en el núcleo vivo, por ejemplo, con la presión hidrostática cíclica (que es útil para diferenciar células en células de tipo condrocito). En realizaciones particulares, la configuración de "E" produce hipoxia relativa debido a sus características (la hipoxia o agente que imita la hipoxia, como lactato, induce la conversión de los HDF en células de tipo condrocito). "E" también puede cerrar el defecto del anillo (apertura de tenotomía) para evitar que se "hernie" o que salga del espacio inter-somático través de la incisión de tenotomía una vez que la construcción está sometida a una carga.

En ciertos aspectos de la invención, la membrana interna "I" comprende una membrana que es biocompatible; elástica; inflable (a medida que se consume el medio, el núcleo vive crece y se expande a la pared interna de la membrana externa); semipermeable sistema de liberación controlada para nutrientes, factores de crecimiento, etc.); biodegradable (de manera que no interfiere con las propiedades a largo plazo del tejido reparado) y reabsorbible (tiempo  $T_2 < T_1$ ). "E" debe reabsorberse después de "I" no solo para evitar las fugas y la pérdida de los medios mientras que el núcleo vivo todavía no está maduro, sino también para mantener la "I" alejada de cualquier tensión mecánica directa). En otros ciertos aspectos, "I" envuelve herméticamente el núcleo vivo; actúa como un sistema de administración de nutrientes y factores de crecimiento capaces de alimentar un núcleo vivo interno a través de una membrana semipermeable, permitiendo que ciertas moléculas (por ejemplo, nutrientes, factor de crecimiento etc.) pasen a través de ella por difusión (y ocasionalmente "difusión facilitada" especializada) en ciertas condiciones físico-químicas (por ejemplo, presión hidrostática, concentración osmótica, temperatura, etc.)

Estas dos membranas ("E" e "I") definen 2 volúmenes  $V_E$  y  $V_I$ . Estos dos volúmenes distintos pueden tener diferentes formas (esférica, cilíndrica, cónica, etc.) en función del contorno de la cavidad intervertebral y el reparto de la carga. En realizaciones específicas, el dispositivo se ajusta a la forma de la cavidad.

En realizaciones específicas, el volumen  $V_E$  se define como el espacio que separa la membrana "E" de la membrana "I". Se compone de nutrientes y factores de crecimiento (medios) que son suministrados a las células, tales como a través de la membrana semipermeable "I". También actúa como una estructura de soporte de carga capaz de transferir la tensión mecánica, por ejemplo, el régimen de presión hidrostática cíclica o la elevada tensión de cizallamiento del fluido (debido a su alto contenido de agua) al núcleo vivo (lo que induce la diferenciación condrogénica de las células, tales como los HDF).

El volumen  $V_I$  se define como el espacio que está exteriormente limitado por la membrana semipermeable interna "I" y comprende el núcleo vivo hecho de células de tipo condrocito, tales como células derivadas de HDF.

Hasta que el núcleo vivo no se ha convertido en viable (p.ej. capaz de mantenerse por sí mismo), los medios encerrados en  $V_E$  se pueden cambiar regularmente a fin de eliminar cualesquiera residuos tóxicos acumulados debido al metabolismo (radicales libres y/o ácido láctico, por ejemplo), así como cualquier otro recorte o desecho celular como resultado del crecimiento celular. Un cambio de este tipo permite la reposición de su contenido con nutrientes y/o factores de crecimiento. En realizaciones específicas, este procedimiento se realiza periódicamente, tal como una o más veces por semana o mes, por ejemplo, al menos una vez a la semana, tal como dos veces a la semana. En realizaciones específicas adicionales, se requiere dotar a "E" con una característica adicional para drenar  $V_E$ . Este sistema de drenaje puede estar hecho de uno o más tubos y uno o más depósitos, en ciertos aspectos, y en realizaciones particulares comprende dos tubos y dos depósitos. El primer tubo se puede emplear para eliminar los medios utilizados y el segundo tubo se puede emplear para inyectar los nuevos medios. Cada uno de estos tubos (o catéteres) comprende un extremo proximal que se conecta herméticamente a  $V_E$  y un extremo distal que se conecta a un depósito. Estos catéteres podrían estar hechos del mismo material que "E" o de caucho de silicona, por ejemplo. Su longitud puede ser cualquier longitud adecuada con tal de que puedan extenderse desde el depósito hasta el dispositivo. También pueden estar comprendidos entre aproximadamente 10 y 15 centímetros y ser configurados antes de la operación mediante la reducción de su extremo distal a la longitud adecuada en función de la profundidad del lugar de la operación y los datos anatómicos (morfología del paciente). Su diámetro externo puede ser de cualquier longitud adecuada, pero en realizaciones específicas son de aproximadamente 2,5 milímetros de longitud, con el fin de ser lo suficientemente pequeños para salir por la abertura

de tenotomía, no comprimir o lesionar la raíz adyacente y permitir un diámetro interno de 1,2 milímetros.

Los tubos pueden implantarse en el extremo de un procedimiento de discectomía, después de la implantación, inflado y sellado del biorreactor y antes del cierre de la piel. Pueden estar conectados al extremo distal de cada tubo (catéter). A continuación, cada depósito puede estar colocado subcutáneamente de forma que pueda ser accesible por una aguja de la piel (punción percutánea).

En una realización, el núcleo vivo diseñado está pre-encapsulado con "I" y luego se desliza en "E". A medida que se van consumiendo los medios, el núcleo vivo se expande hasta la pared interior de la envoltura "E". La envoltura "E" se reabsorbe y el injerto se vuelve a conectar con el disco restante natural.

### 1. La membrana semipermeable interna

La envoltura interna comprende el núcleo vivo, incluye, por ejemplo, un sistema de liberación controlada (con el fin de permitir la alimentación del núcleo vivo con los medios a través de sus características de semipermeabilidad), es expansible (a medida que los medios se consumen, el núcleo vivo se expande hasta la pared interna de la membrana externa) y/o es biodegradable (con el fin de no interferir con las propiedades a largo plazo del tejido reparado).

En realizaciones específicas, la membrana interna es una membrana semipermeable que envuelve la composición de células-andamiaje. Esta membrana semipermeable es permeable a moléculas pequeñas y por lo tanto permite la difusión de nutrientes y oxígeno y la eliminación de los desechos; pero esta membrana es impermeable a las macromoléculas tales como colágeno y glicosaminoglicanos. Estas macromoléculas que forman la matriz extracelular natural son entonces retenidas dentro de la armazón. Esta membrana también aísla la construcción de células-matriz del entorno del hospedador y la protege de la respuesta inflamatoria e inmunológica del hospedador contra el armazón biopolimérico.

Se pueden usar varios polímeros y mezclas de polímeros para la fabricación de esta membrana, incluyendo pero sin limitarse a, poliacrilatos (incluyendo copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de poli(cloruro de vinilo), poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas (incluyendo poliéter sulfonas), polifosfacenos, poliacrilonitrilos, poli(acrilonitrilo/co-cloruro de vinilo), PTFE, así como derivados, copolímeros y mezclas de los anteriores.

En una realización, la membrana semipermeable se genera por la formación de complejos de polielectrolito: polianión (PA) y policación (PC) a través de las interacciones entre los polímeros de carga opuesta que forman el complejo polielectrolito (PEC). El componente aniónico puede ser, por ejemplo, un polímero biocompatible, tal como, pero sin limitarse a, alginato de sodio, sulfato de celulosa, carboximetilcelulosa o ácido hialurónico y el componente catiónico puede estar hecho de un polímero, tal como, pero sin limitarse a, quitosano, poli(L-lisina, poli(L-ornitina), poli(metilen-co-guanidina), poli(vinilamina), poli(etilenimina), poli(DADMAC) o poli(N-vinilpirrolidona).

Para llevar a cabo la encapsulación de la construcción de células-matriz con una membrana semipermeable PEC, construcción de células-matriz se sumerge primero en la solución aniónica y luego en la solución catiónica. Después de un tiempo de reacción que varía en función de la naturaleza de los componentes aniónicos y catiónicos, se forma una membrana semipermeable mecánicamente estable. Dependiendo de las condiciones de reacción (concentración de polímero, tiempo de reacción), el armazón está herméticamente envuelto dentro de la membrana o separado por un espacio.

El volumen  $V_1$ , se define como el espacio que está exteriormente limitado por la membrana semipermeable interna "I" y comprende el núcleo vivo hecho de, por ejemplo, células de tipo condrocito derivadas de HDF.

### 2. La membrana externa

La membrana externa puede ser expandible, elástica y/o hinchable con el fin de ser implantada a través de un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo posterior y cuando se expande para ajustarse exactamente a la cavidad de la discectomía. Esta membrana es hermética a los fluidos pero permeable al oxígeno y se llena con medio que proporciona nutrientes y factores de crecimiento a las células. El fluido encerrado dentro de la envoltura forma un entorno fluido que transfiere IHP a las células vivas. Cuando el paciente se pone de pie, se aplica cierta carga en la columna vertebral que se transfiere a las células vivas a través de la membrana que está llena de fluido. Esta membrana es mecánicamente resistente para soportar la carga.

La membrana externa puede estar hecha de un polímero biocompatible, biodegradable. Para la fabricación de esta membrana se pueden usar varios polímeros, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli-ε-caprolactona (PCL), poliuretano (PU), polidioxanona (PDO), polietilenos, poli(sebacato de glicerol) (PGS), así como derivados, copolímeros y mezclas de los anteriores. En una realización la membrana está comprendida por un poliuretano expansible, biocompatible y biodegradable.

Esta membrana está en contacto directo con el tejido circundante del hospedador y es biocompatible para evitar la reacción inflamatoria del hospedador. Se pueden utilizar diferentes técnicas para mejorar la biocompatibilidad de la membrana, pero sin limitarse a, el recubrimiento de la membrana con ácido hialurónico.

#### 5 IV. Células utilizadas en la invención

En ciertas realizaciones de la invención, se puede emplear cualquier célula siempre que la célula es capaz de diferenciarse en una célula condrocito o en una célula de tipo condrocito. En realizaciones específicas, la célula es de hecho un condrocito, aunque puede ser derivada de una célula madre (por ejemplo, célula madre mesenquimal) o una célula fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, fibroblasto del tendón, fibroblasto de ligamento o fibroblasto sinovial. Las células autólogas pueden utilizarse, aunque en realizaciones alternativas se emplean células alogénicas; en realizaciones específicas, se han ensayado células alogénicas en relación a una enfermedad y se consideran adecuadas para la transmisión humana. En ciertos aspectos de la invención, la célula o células son autólogas, aunque en realizaciones alternativas, las células son alogénicas. En los casos en los que las células no son autólogas, antes del uso en la invención, las células pueden ser procesadas por medios convencionales en la técnica para eliminar los materiales potencialmente peligrosos, patógenos, etc. En aspectos particulares, las células pueden ser transfectadas con uno o más ácidos nucleicos, tales como transfectadas con un factor de crecimiento, incluyendo por ejemplo, BMP-2 BMP-4, BMP-6 y/o BMP-7.

En aspectos particulares, la diferenciación de tipo condrocitos como de fibroblastos dérmicos humanos se puede facilitar mediante el empleo de uno o más de los siguientes: siembra de células en alginato; siembra de células en proteínas de la matriz extracelular tales como, agregano o perlecán, condiciones de hipoxia (tales como hipoxia o uno o más agentes que imitan hipoxia, por ejemplo lactato, deferoxamina mesilato (DFX), cloruro de cobalto (COCl<sub>2</sub>) o níquel, por ejemplo); cultivo de micromasa de alta densidad; presencia de uno o más factores de crecimiento (incluyendo, por ejemplo, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), incluyendo al menos BMP-2; factor de crecimiento transformante beta (TGF-β); factor de crecimiento de insulina uno (IGF-I) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y particularmente el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y FGF-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP)]; presencia de ácido ascórbico, dexametasona, proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), proteínas hedgehog: Sonic hedgehog (Shh) e Indian hedgehog (IHH)). Se puede emplear el cultivo bajo tensión mecánica. El cultivo de micromasa de alta densidad es una técnica de cultivo que imita la etapa de condensación celular que se produce durante la aparición de la formación de cartílago en la extremidad en desarrollo.

En aspectos particulares de la invención, se emplean fibroblastos dérmicos humanos, al menos porque pueden ser cosechados de forma no invasiva, tal como de una biopsia en sacabocados de tan solo 3 mm diámetro (en realizaciones específicas) de piel, por ejemplo, una muestra de piel de biopsia circular. Además, los fibroblastos dérmicos humanos se pueden expandir fácilmente en cultivo y pueden diferenciarse en células de tipo condrocito en condiciones de cultivo particulares.

De acuerdo con la invención, los HDF autólogos se cosechan de la biopsia en sacabocados de tejido de la piel (6 mm) del paciente. En el laboratorio, se diseccionan con tijeras la grasa subcutánea y la dermis profunda. El tejido restante se trocea y se incuba durante la noche en tripsina 0,25 % a 4 °C. A continuación, los fragmentos dérmicos y epidérmicos se separan mecánicamente. Los fragmentos dérmicos de la biopsia se trocean y los trozos se utilizan para iniciar cultivos de explantes. Los fibroblastos cosechados de los explantes se cultivan en MEM de Dulbecco (DMEM) con suero de ternera 10 % a 37 °C en CO<sub>2</sub> 8 %. En aspectos particulares, estas células se expanden antes de ser diferenciadas en condrocitos.

Algunos aspectos pueden emplear HDF adquiridos comercialmente, tales como de los laboratorios (tales como Cascade Biologics). Las células pueden ser HDF adultos o HDF neonatales. Por ejemplo, los fibroblastos de prepucio neonatal son una fuente muy conveniente de células. Estas células se utilizan comercialmente y son de fácil acceso y fáciles de cultivar.

#### V. Crecimiento y diferenciación de las células en condrocitos o células de tipo condrocito

El estrés/tensión mecánica son factores importantes para la condrogénesis. El presente método utiliza una o más cepas mecánicas y, en realizaciones particulares, utiliza la presión hidrostática intermitente (IHP) como inductor de la diferenciación condrogénica de HDF. Se sabe que la IHP es un potente estímulo para la inducción y mantenimiento del fenotipo de los condrocitos. Estudios recientes han demostrado que la IHP estimula la condroinducción de fibroblastos de embriones murinos cultivados con BMP-2. La IHP también puede inducir la diferenciación condrogénica de los HDF. Se sabe que los HDF pueden diferenciarse en células de tipo condrocito en condiciones de baja tensión de oxígeno. Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención, la tensión mecánica, especialmente la IHP y la tensión de cizallamiento del fluido, inducen la diferenciación condrogénica de fibroblastos cultivados, por ejemplo, en una matriz tridimensional y con bajo nivel de oxígeno.

La tensión mecánica se puede realizar *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* seguido por *in vivo*, o una combinación de los mismos. En una realización, se iniciará la diferenciación *in vitro* y las células de tipo condrocito sembradas en la



matriz se implantarán a continuación *in vivo* y seguirán creciendo y diferenciándose. En aspectos específicos de la invención, la estructura inerte está destinada a proporcionar un régimen de carga fisiológico para inducir la diferenciación *in vivo* de los HDF.

5 En aspectos específicos de la invención, las células se inducen para someterse a la diferenciación en condrocitos o células de tipo condrocito. Esta diferenciación se puede producir antes del suministro *in vivo*, tal como en un  
 10 armazón o para el posterior suministro *in vivo*. En realizaciones específicas, la célula se somete a condiciones para facilitar la diferenciación en condrocitos. En una realización específica adicional, una condición comprende la tensión mecánica. La regulación de genes por fuerzas mecánicas se ha estudiado ampliamente para las células endoteliales  
 15 vasculares y condrocitos que están obviamente sometidos a cizallamiento del fluido o carga de presión elevados. En realizaciones específicas de la invención, la tensión mecánica estimula la diferenciación condrogénica de los HDF. Tal tensión mecánica puede ser de cualquier tipo, aunque en realizaciones específicas comprende presión hidrostática y/o la tensión de cizallamiento del fluido. En realizaciones específicas adicionales, la tensión es constante o intermitente.

15 En la presente invención, la tensión mecánica, especialmente la presión hidrostática cíclica y la tensión de cizalladura del fluido inducen la diferenciación condrogénica de los fibroblastos sembrados en una matriz tridimensional. La elección de las condiciones de co-cultivo para estimular la diferenciación condrogénica de los HDF se basa en los datos conocidos en la técnica. Se conocen diferentes ejemplos de factores tales como el cultivo  
 20 celular de alta densidad, el cultivo con BMP-2 y ácido ascórbico, el cultivo en baja tensión de oxígeno, para estimular la condrogénesis y se utilizan únicamente como ejemplos en la invención como cofactores, además de la tensión mecánica.

25 Los condrocitos de los discos intervertebrales son difíciles de cosechar. Las células autólogas se obtienen a partir del disco del paciente y por lo tanto requiere un procedimiento invasivo (cirugía de la espalda) para realizar una biopsia. Si las células se cosechan a partir de un disco sano, se pone en peligro el funcionamiento de un disco normal. Si las células son cosechadas a partir de un disco dañado durante la discectomía, se obtienen células anormales de un tejido degenerado. Por otra parte, los condrocitos son difíciles de expandir en cultivo, ya que sufren  
 30 desdiferenciación. Los condrocitos de otros cartílagos tales como el cartílago elástico de la oreja son fáciles de cosechar pero solo produce cartílago hialino y no fibro-cartílago como en el disco. Las células madre que se utilizan generalmente para la ingeniería de tejidos también tienen algunas desventajas, ya que requieren una biopsia de médula ósea. Se necesita una gran cantidad de células para la ingeniería de tejidos y es difícil obtener una cantidad suficiente de células madre adultas.

35 La justificación del uso de HDF autólogas como medio de fuente de células es la siguiente: 1) los HDF se pueden cosechar de forma no invasiva a partir de una biopsia en sacabocados de una muestra de piel circular de tan solo 3,0 mm, por ejemplo; 2) no existe el riesgo de contaminación de otro donante (por ejemplo, virus de la hepatitis B, virus de inmunodeficiencia humana, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, etc.) y 3) los HDF pueden expandir  
 40 fácilmente en cultivo y diferenciarse en células de tipo condrocito en condiciones de cultivo particulares. Podrían utilizarse otras poblaciones de fibroblastos, tales como, por ejemplo, de tendón o de ligamento. En una realización, se prefieren fibroblastos autólogos.

45 La elección de las condiciones de cultivo para estimular la diferenciación condrogénica de los HDF se basa en los datos conocidos en la técnica. Diferentes factores apoyan la condrogénesis, tales como, por ejemplo, el cultivo celular de alta densidad, el cultivo con BMP-2 y ácido ascórbico, y la siembra de las células en la matriz de alginato. El crecimiento y/o diferenciación *in vitro* de las células en la composición de células/armazón puede comprender al menos dos o más días antes de su uso *in vivo*. En ciertos casos, las células pueden ser comprobadas o supervisadas para asegurar que al menos algunas de las células se multiplican. Las células que no se están  
 50 dividiendo y/o que no se fijan directa o indirectamente con el armazón pueden ser eliminadas.

55 En otras realizaciones, los HDF están incrustados en hidrogel que en realizaciones específicas es un hidrogel natural, tal como colágeno, ácido hialurónico (HA), una combinación de colágeno/HA, alginato, quitosano; un hidrogel sintético, tal como poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(propileno fumarato-co-etilenglicol) (P(PF-co-EG) y polipéptidos, u otros polímeros biodegradables tales como poli(ácido L-láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) o una combinación de cualquiera de éstos polímeros antes mencionados. Una compresión hidrostática cíclica se aplica a continuación usando cualquier biorreactor *in vitro* de la técnica adecuado.

## 60 VI. Métodos de reparar el cartílago dañado

60 En ciertas realizaciones, la invención incluye métodos de reparación de cualquier cartílago dañado, aunque en aspectos particulares el cartílago está en un disco intervertebral o en cualquier articulación. En general, para las realizaciones de disco cuando un disco intervertebral se debe quitar de entre dos vértebras adyacentes, por ejemplo, en la columna lumbar, es menos invasivo que la cirugía proceda posteriormente desde la parte posterior del  
 65 paciente. Este procedimiento mínimamente invasivo permite proceder con el curetaje del espacio intersomático a través de una pequeña abertura dentro del espacio del anillo (tenotomía) para retirar los fragmentos degenerados

del núcleo del disco. Dado que la fenestración del anillo es pequeña, la presente invención proporciona una construcción intervertebral que se desliza a través de la incisión antes mencionada y después se expande en el espacio generado por la extracción del núcleo dentro del espacio intersomático. La eliminación del disco dañado y la instalación de la construcción se realizan en el mismo abordaje posterior.

5 Como se ha mencionado anteriormente, la estructura inerte está hecha de dos globos expandibles "I" y "E". En la posición de reposo, los dos globos "I" y "E" son planos, deformables, tienen forma y encajan entre sí. Una vez que el globo "I" está el interior del globo "E", ambos están instalados tanto en el espacio intervertebral como a través de la  
10 abertura del anillo y después son sucesivamente inflados de modo que definen dos volúmenes distintos ( $V_E > V_I$ ) con formas (esférica, cilíndrica, cónica, etc.,) dependiendo, por ejemplo, del contorno de la cavidad intervertebral y el reparto de carga.

En aspectos particulares, el primer globo que se ha de llenar es el globo interno "I" con independencia del volumen de la cavidad restante. El volumen  $V_I$  representa el núcleo de la construcción que recibe y alberga el núcleo vivo.  
15 Una vez llenado con el núcleo vivo, el globo "I" se sella herméticamente. Es decir, una vez que la envoltura "I" se coloca en la envoltura "E", ambas se sitúan en el espacio intervertebral a través de la abertura anular y después son infladas sucesivamente. "I" es el primero en ser equipado con la implantación del núcleo vivo y luego se sella. Entonces, el globo externo "E" se infla con la solución de los medios hasta que su volumen  $V_E$  consigue un contorno que se acopla con, o sigue, la superficie interior de la parte restante del disco natural después del legrado del  
20 mismo. Esta superficie interior del disco restante puede ser o bien el resto del tejido de núcleo o la pared interna del anillo natural, dependiendo de la extensión del legrado que se ha realizado.

En una segunda realización para instalar la construcción intervertebral, "E" se posiciona en el espacio intervertebral, a continuación, "I" se coloca en "E" y ambos se llenan sucesivamente como se mencionó anteriormente. En una  
25 tercera realización, "E" se posiciona en la cavidad de la discectomía, a continuación, el núcleo vivo pre-encapsulado se coloca en "E", y luego "E" se llena con los medios.

El volumen de la cavidad resultante de la discectomía se puede evaluar antes de la instalación del globo externo "E" de tal manera que el volumen de líquido adecuado puede seleccionarse e inyectarse. El volumen de la cavidad  
30 puede ser, por ejemplo, medido introduciendo un fluido (por ejemplo, agua) en su interior, hasta que la cavidad se llena con el mismo y después extrayendo el líquido de la cavidad por medio de una jeringa, de modo que se mide sustancialmente exactamente el volumen de la cavidad.

En ciertos aspectos, la composición de la estructura inerte depende de la elección del sistema de ingeniería de tejidos que se basa en el material de fabricación, las características de los poros, capacidad de absorción y las  
35 propiedades mecánicas, por ejemplo, tales como polímeros no degradables, polímeros degradables o hidrogeles de origen natural (por ejemplo colágeno, fibrina, agarosa, alginato, etc).

El núcleo vivo o compartimento ( $V_I$ ) está hecho de células de tipo condrocito derivados de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) autólogos, por ejemplo, como los cosechados de la piel del paciente y sembrados en un armazón  
40 (como por ejemplo perlas de alginato o armazón microfluídico o cualquier otro armazón polimérico) y alimentados desde el compartimento de apoyo ( $V_E$ ). La ventaja de esta construcción híbrida que combina tanto un biomaterial inerte que actúa como un sistema de suministro de nutrientes y células vivas fácilmente cosechadas de la piel es que es capaz de automantenimiento o remodelación y puede restaurar la función del disco usando un abordaje quirúrgico posterior mínimamente invasivo. El volumen  $V_E$ , se define como el espacio que separa la capa "E" de la  
45 capa "I" que comprende nutrientes y factores de crecimiento (medios) que se suministrarán a las células (sistema de administración). Este volumen puede ser el resultado de su llenado por los medios líquidos o del hinchamiento de su pared (biomaterial hidrófilo expandible como hidrogel, por ejemplo) después de haber sido hidratado (los medios están compuestos por una alta proporción de agua).

Los factores de crecimiento pueden ser administrados a través de la membrana semipermeable interna "I". Ejemplos de factores de crecimiento incluyen, por ejemplo, la proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ), factor de crecimiento de insulina uno (IGF-I), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).  
50

La deformación mecánica, tal el alto cizallamiento del fluido y/o carga de presión, se transfiere sobre la capa interna "I", y por lo tanto en  $V_I$  a través de la capa externa "E" y el área externa  $V_E$ . Esta tensión mecánica induce la  
55 diferenciación condrogénica de las células dentro de la capa interna.

A continuación, se instala el sistema de drenaje, en el que cada catéter que sale del espacio intervertebral a través de la abertura de tenotomía se mantiene cuidadosamente lejos de la raíz adyacente o al menos se sitúa a lo largo de la raíz sin ningún conflicto perjudicial.  
60

Se abre una ruta transmuscular usando un introductor desde el lugar operativo hasta una ubicación subcutánea distante de la abertura de la piel. Cada tubo está "tunelizado" en la ruta muscular mencionada anteriormente y después se conecta al depósito correspondiente. Los dos depósitos están distantes de la incisión cutánea media,  
65

posicionados a 2 o 3 cm de la línea media, colocados subcutáneamente de manera que sean fácilmente palpables e identificables. Cada incisión de la piel está cerrada.

5 Como es habitual para proceder después de tal abordaje posterior mínimamente invasivo, se le pide al paciente que se ponga de pie ya el día después de la cirugía, pudiendo comenzar a caminar de nuevo. Por lo tanto, el implante recibe el régimen de presión hidrostática cíclica adecuado en presencia de carga fisiológica, lo que es fundamental para el crecimiento y la conversión de los HDF.

10 Periódicamente, tal como una o más veces por semana o por mes, los medios pueden ser cambiados El sistema de drenaje nos permite proporcionar el volumen  $V_E$  con la cantidad apropiada de los nuevos medios con el fin no solo de seguir suministrando al núcleo vivo, sino también para mantener el volumen adecuado y por lo tanto el régimen de presión correcta. El individuo se encuentra boca abajo. Cada depósito se perfora simultáneamente con una aguja. Se acopla una jeringa a cada una de estas agujas y los nuevos medios se inyectan lentamente empujando hacia abajo el pistón a la vez que se retira simultáneamente la misma cantidad de fluido de la otra jeringa tirando hacia arriba, de modo que la presión interna se mantiene casi igual y evita que el volumen  $V_E$  colapse o, por el contrario, ejerza una presión demasiado alta al volumen  $V_I$ , lo que podría causar daños irreversibles al núcleo vivo. El procedimiento se detiene cuando el color y el aspecto del fluido que sale son idénticos al fluido que entra, por ejemplo. Se pueden tomar muestras de los medios utilizados extraídos para fines bacteriológicos, químicos y patológicos.

20 Cuando el núcleo vivo es capaz de automantenerse y ha llenado el espacio de la discectomía, se pueden quitar ambos tubos y depósitos. Como alternativa, solo uno o ambos depósitos se pueden quitar con anestesia local mientras que los tubos están unidos en su extremo distal. En otra realización alternativa, ambos se pueden dejar en su lugar.

25 En realizaciones específicas, se realiza una RM de seguimiento, por ejemplo, en cuestión de semanas o meses después de la cirugía (por ejemplo, aproximadamente 6 semanas después de la cirugía) para evaluar el crecimiento del injerto y para documentar la curación del disco.

30 En otra realización, el núcleo vivo diseñado es pre-encapsulado y liberado como se ha mencionado anteriormente.

35 Estas funciones anteriores se proporcionan por la estructura inerte de la invención que se basa en dos membranas concéntricas con dos capacidades diferentes. La envoltura externa es mecánicamente capaz de mantener la altura del disco en presencia de carga; es inflable (con el fin de ser implantado mediante un abordaje posterior mínimamente invasivo y recibir la solución de medios); es elástica (para transferir la carga compartida en el injerto); es expansible (para permitir su hinchamiento y llenar la cavidad resultante de la discectomía); es hermética (para evitar cualquier fuga de los medios, extrusión de tejidos de la cicatriz en el canal vertebral o la reincidencia de la hernia a través del defecto del anillo, tenotomía); es biodegradable (la envoltura se reabsorbe para permitir que el injerto se vuelva a conectar con el disco restante natural) y es biocompatible (para minimizar la reacción inflamatoria). Puede ser drenada con uno o varios catéteres conectados a uno o varios depósitos de Rickham subcutáneos insertados al final del procedimiento quirúrgico, por ejemplo.

40 Estos depósitos están destinados a eliminar cualquier desecho tóxico acumulado con el metabolismo (radicales libres o ácido láctico, por ejemplo), así como cualquier otros recortes celulares asociados al crecimiento. También permiten proporcionar el volumen  $V_E$  con la cantidad apropiada de los nuevos medios con el fin no solo de seguir suministrando al núcleo vivo, sino también para mantener el volumen adecuado y por lo tanto el régimen de presión correcta. Estos se quitan cuando el núcleo vivo es capaz de automantenerse y ha llenado el espacio de la discectomía.

50 Cabe señalar que los diversos componentes y características de la estructura híbrida, así como el método de reparación del cartílago dañado y el método para el cultivo de HDF en células de tipo condrocito descritos anteriormente, se pueden combinar en una variedad de formas a fin de proporcionar otras realizaciones dentro del alcance de la invención.

## 55 VII. Forma de realización alternativa de la invención

60 En otra realización, en lugar de tener dos envolturas concéntricas generalmente esféricas (por ejemplo), el dispositivo podría estar hecho de una única envoltura externa "E" con las mismas características anteriormente mencionadas (en especial la capacidad de expansión y/o propiedades inflables) y recibir un núcleo vivo no envuelto (no encapsulado, ni envuelto con una membrana). En realidad, en esta realización, este núcleo vivo es una construcción de células-matriz y se coloca directamente en "E". A continuación, el volumen  $V_E$  se expande con la solución líquida de los medios hasta que se acomoda en la cavidad.

65 Por lo tanto, en otra realización, en lugar de tener dos globos "concéntricos", el dispositivo se compone de un único globo "E" externo, con las mismas características anteriormente mencionadas (en especial la capacidad de expansión y/o propiedades inflables) para alojar el núcleo vivo diseñado. Una vez que el núcleo vivo se libera dentro

de la membrana "E", el volumen  $V_E$  se expande con la solución líquida de los medios hasta que la membrana "E" alcanza los límites de la cavidad. Ni la barrera ni la membrana envuelven más el injerto. A medida que se consumen los medios, el núcleo vivo se expande hasta la pared interior del globo/capa/membrana "E". La envoltura se reabsorbe y el injerto se vuelve a conectar con el disco natural.

5

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y todavía obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

10

## 15 EJEMPLO 1

### EJEMPLOS DE MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplos de realización de materiales y métodos para su uso en la invención se describen en este Ejemplo.

20

#### Cultivo de células

Aunque los HDF autólogos recogidos del paciente se utilizan para construir el implante, los estudios preliminares se realizan usando fibroblastos de prepucio neonatal, ya que son fuentes convenientes de células con fines experimentales, por ejemplo. Se llevan a cabo otros estudios utilizando células autólogas recogidas del paciente para demostrar que el procedimiento funciona con estas células.

25

Los HDF de prepucio neonatal se obtienen a partir de Cascade Biologics (Portland, Oregón) y se expanden *in vitro* con DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), que contiene FBS 10 % (Invitrogen) y antibióticos. Las suspensiones de HDF se siembran en alginato o en cultivo en monocapa, como se describe a continuación.

30

Para generar cultivos de gel de alginato, las células se suspenden a alta densidad ( $10^7$  células/ml) en alginato de viscosidad media p/vol 2 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 25 ml de gotitas se reticularan en  $\text{CaCl}_2$  100 mM, solución de NaCl 0,9 %. Las perlas de alginato resultantes se lavaron extensamente en DMEM que contenía FBS 10 % y antibióticos. Las perlas de alginato se sumergen en DMEM que contiene FBS 10 % y antibióticos suplementado Proteína Morfogénica Ósea humana 2 (BMP-2) recombinante 100 ng/ml y 50 mg de ácido ascórbico. Se han elegido como condiciones una elevada densidad celular y cultivo con BMP-2 y ácido ascórbico porque son conocidos por estimular la condroinducción (Watt, 1988; Dozin et al., 1992; Sullivan et al., 1994; Denker et al., 1999; Zur Nieden et al., 2005; Zhou et al., 2004).

35

Para generar cultivos en monocapa, los HDF se siembran en matraces de plástico con un nivel de oxígeno de 20 % en DMEM que contiene FBS 10 % sin BMP-2 y sin ácido ascórbico. Estas células sirven como control.

40

#### Cultivo en $\text{O}_2$ 5 % y 20 %

Las perlas de alginato embebidas en células se mantienen bajo una atmósfera de  $\text{O}_2$  5 %,  $\text{CO}_2$  5 % y  $\text{N}_2$  90 % en una incubadora regulada por  $\text{O}_2$ -/ $\text{CO}_2$ - (baja tensión de oxígeno) o en  $\text{O}_2$  20 %,  $\text{CO}_2$  5 % y  $\text{N}_2$  75 % en una incubadora regulada por  $\text{CO}_2$  (tensión atmosférica de oxígeno) y se cultivaron durante 3 semanas. A continuación, se realiza la evaluación de la diferenciación condrogénica (véase el Ejemplo 3).

45

50

#### Compresión hidrostática

Las perlas de alginato embebidas en células se dividen en grupos presurizado y control y de cada grupo se colocaron en bolsas de polietileno/nylon flexibles separadas permeables al oxígeno y dióxido de carbono. Las bolsas se llenaron con 15 ml de medio y son termoselladas para excluir todo el aire.

55

Las bolsas en el grupo presurizado se colocan dentro de un dispositivo recientemente desarrollado diseñado para la aplicación de la compresión hidrostática cíclica (Elder et al., 2005). Este dispositivo permite la comparación de los regímenes de carga en un amplio rango fisiológico bajo condiciones de cultivo tridimensional iguales. Se compone de una gran base de acero inoxidable cilíndrica conectada a una tapa por medio de pernos que comprimen una junta tórica interviniente. Un cilindro hidráulico está soldado a la tapa de manera que su interior es continuo con el de la cámara. El cilindro y la cámara están completamente llenos de agua, de modo que se consigue una rápida compresión hidrostática mediante una fuerza (generada por una máquina de ensayo servohidráulico MTS) aplicada al pistón del cilindro. Se mantiene una temperatura estable de 37 °C sumergiendo la cámara en un baño de agua circulante de temperatura regulada. Las bolsas en el grupo de control se colocan en una cámara de acero inoxidable separada, llena de agua en el mismo baño de agua.

60

65

La magnitud y la frecuencia de la presión aplicada se eligen para que estén dentro de los rangos fisiológicos (Mow et al., 1992), los cuales se ha demostrado previamente que estimulan la diferenciación condrogénica de células mesenquimales multipotenciales (Elder et al., 2005) y la re-diferenciación de los condrocitos desdiferenciadas (Domm et al., 2000). Se ensaya la presurización de corta y larga duración y se determina un modelo de presurización hidrostática condroinductiva adecuado entre la presurización hidrostática de corta y larga duración mediante la evaluación cuantitativa y cualitativa de la condrogénesis.

Un ejemplo de régimen comprende lo siguiente:

Forma de onda sinusoidal de la compresión hidrostática a 1,0 Hz con una presión aplicada mínima de 0,3 Mpa y máxima de 5,0 MPa. Para la presurización de corta duración, las células se presurizan 1h/día durante 7 días. Para la presurización de larga duración, las células se presurizan 4h/día durante 7 días. Cada día, inmediatamente después de la finalización de la carga, los cultivos se retiran del recipiente a presión y devuelven a un baño de agua dentro de la incubadora de cultivo de tejidos.

La viabilidad celular y la diferenciación condrogénica de los HDF bajo compresión cíclica hidrostática y cultivados en condiciones específicas (tales como hipoxia, medio condrogénico, alta densidad de células) se evalúan utilizando técnicas estándar en la técnica.

En otra realización, la conversión de células fibroblastos en condrocitos es inducida por presión hidrostática cíclica y la tensión de cizallamiento. En este caso, las células se siembran en un armazón microfluídico.

Se lleva a cabo la evaluación de la diferenciación condrogénica (véase el Ejemplo 3, por ejemplo).

## **EJEMPLO 2**

### **EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE HDFs EN PERLAS DE ALGINATO**

La viabilidad de los HDF en perlas de alginato cultivados en medio condrogénico se ensaya por microscopía óptica y/o mediante una prueba de viabilidad, en aspectos específicos de la invención. La microscopía óptica se emplea para estudiar la morfología y la proliferación de los HDF. En una prueba de viabilidad de ejemplo, las perlas de alginato se disuelven en la disolución de tampón (citrate de Na 0,55 M, NaCl 1,5 M y EDTA 0,5 M), las células se centrifugan y el sedimento se trata con colagenasa durante 1 h. Las células se resuspenden en DMEM y la viabilidad se determina utilizando, por ejemplo, una cámara de Neubauer y el método de exclusión con azul de tripano.

## **EJEMPLO 3**

### **EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA**

En realizaciones específicas, los HDF se caracterizan por la producción de colágeno de tipo I, III y V, mientras que los condrocitos se caracterizan por la producción de colágeno de tipo II, IX, XI y la producción de proteoglicanos sulfatados.

La diferenciación condrogénica se evalúa mediante la medición del contenido de glicosaminoglicano sulfatado (sGAG) y la producción de colágeno I y II por transferencia Western. La tasa de síntesis de colágeno se mide por la incorporación de [<sup>3</sup>H]-prolina.

#### **ADN total y contenido de sGAG**

Las células en perlas de alginato se recuperan del alginato citrate de sodio 55 mM, solución de NaCl 0,9 %. A continuación, las células se lisan en 300 µl de tampón Nonidet P-40 0,5 % v/v (Tris-Cl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM). El lisado se transfiere a tubos de microcentrífuga, se centrifuga y el ADN se mide en una alícuota de sobrenadante de 100 µl usando el método de tinción de Hoescht (DNA Quantification Kit, Sigma, St. Louis, MO) con ADN de timo de ternera como patrón. El tampón de lisis restante se elimina y el sGAG digiere en 100 µl de papaína 2 % v/v, acetato de sodio 20 mM (pH 6) durante la noche a 60 °C. El contenido total de sGAG se mide a continuación por el método de precipitación con azul de dimetilmetileno (Blyscan Glycoaminoglycan Assay, Biocolor, Ltd.) usando condroitín 4-sulfato purificado a partir de la tráquea bovina como patrón. Para cada muestra, el contenido de sGAG se normaliza al contenido de ADN.

#### **Transferencia Western para el colágeno tipo I y tipo II**

Cinco perlas de cada muestra se disuelven en 400 ml de tampón (citrate de sodio 55 mM, NaCl 150 mM). Para la solubilización del colágeno, se añaden 100 µl de ácido acético 0,25 M y 100 µl de solución de pepsina (ácido acético 1 mg/ml 50 mM: P-6887, Sigma) y la mezcla se mantiene a 4 °C durante 24 h. A continuación, se añaden 100 µl de una solución madre 10x de TBS (Tris 1 M, NaCl 2M y CaCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 8) y 100 ml de elastasa pancreática (1 mg/ml TBS; Sigma E-6883) y las muestras se incuban durante 30 min a 37 °C. Las muestras se centrifugan durante

10 min a 9000xg. Se recoge el sobrenadante. Se mezclan 25 µl de colágeno bovino tipo I, colágeno bovino tipo II (Sigma) o muestra (conteniendo cada uno 5 mg de proteína total; cuantificación con ensayo de proteínas Bio-Rad) con 6 µl de tampón de muestra, se desnaturaliza durante 5 min a 95 °C y se carga en un gel de acrilamida 7 %. La electroforesis se lleva a cabo. El gel se transfiere a la membrana de transferencia. La membrana se bloquea durante la noche en tampón de bloqueo (leche en polvo 10 % en tampón TBST) y después se incuba con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo I (COL-1, ab 6308, Abcam Inc) o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo II (5B2.5, ab3092, Abcam Inc) durante la noche a 4 °C. La membrana se lava con tampón de TBST. Se añade anticuerpo secundario conjugado con biotina anti-ratón de cabra (1:500) durante 1 h, seguido por estreptavidina-HRP en dilución 1:1000 durante 1 h. La transferencia de puntos se desarrolla utilizando ECL de Amersham.

#### Medida de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-prolina

En perlas de alginato en las que se determina la tasa de producción de colágeno, el medio se retira y se sustituye con DMEM suplementado con FBS 10 %, antibióticos, 25 mg de ácido ascórbico, [<sup>3</sup>H]-prolina a 10 µCi/ml y β-amino-propionitrilo (β-APN) 100 mg/ml para inhibir la formación de colágeno reticulado. Después de un período de incubación de 24 h, se mide la incorporación de [<sup>3</sup>H] prolina en el colágeno. Las perlas se digieren a 65 °C durante la noche en 1 ml de solución de papaína [0,125 mg/ml (2.125 unidades/ml, Sigma), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 6,5]. Se añaden 200 µl de cada muestra a 2 ml de líquido de centelleo y se mide utilizando un contador de centelleo.

Se mezclan 500 µl de cada muestra con 500 µl de PBS y se usan para determinar el contenido de ADN. Las muestras y los blancos (que contienen 1 ml de PBS) se tratan con un haz de ultrasonidos durante 15 segundos. Se añaden 0,5 ml de ARNasa y 0,5 ml de pronasa y se incuba a 37 °C durante 30 min. A continuación, se añaden 0,5 ml de bromuro de etidio, las muestras se incuban durante 30 min y se miden con un fluorómetro.

La incorporación de [<sup>3</sup>H]-prolina se normaliza con el contenido total de ADN.

#### EJEMPLO 4

#### EJEMPLOS DE DISEÑO DE ESTUDIOS

En aspectos específicos de la invención, la viabilidad celular y la diferenciación condrogénica de los HDF sembrados se determinan en cultivos tridimensionales de perlas de alginato. En particular, la viabilidad celular y la diferenciación condrogénica de los HDF sembrados en perlas de alginato y cultivados en un medio condrogénico (medio suplementado con BMP-2 y ácido ascórbico) en presencia de O<sub>2</sub> 20 % se comparan con las de los HDF en cultivos de monocapa en DMEM con FBS 10 % en presencia de O<sub>2</sub> 20 % usando el método del ejemplo descrito anteriormente.

En otro aspecto de la invención, se determinan los efectos de la tensión de oxígeno sobre la diferenciación de HDF cultivados en perlas de alginato. Los HDF sembrados en perlas de alginato en el medio condrogénico se cultivan durante 3 semanas en 2 tensiones de oxígeno diferentes: 1) tensión de oxígeno baja de O<sub>2</sub> 5 %, CO<sub>2</sub> 5 % y N<sub>2</sub> 90 % en un incubador regulado por O<sub>2</sub>-/CO<sub>2</sub>-, y 2) tensión atmosférica de oxígeno de O<sub>2</sub> 20 %, CO<sub>2</sub> 5 % y N<sub>2</sub> 75 % en un incubador regulado por CO<sub>2</sub>-.

La diferenciación condrogénica se compara con el método de ejemplo descrito anteriormente.

En una realización adicional de la invención, se determinan los efectos de la compresión hidrostática sobre la diferenciación de HDF cultivados en perlas de alginato. Los HDF sembrados en perlas de alginato en el medio condrogénico se someten a diferentes estímulos: 1) 1 h/día durante 7 días a presión hidrostática (compresión hidrostática sinusoidal 1,0 Hz mín 0,3 MPa máx 5,0 Mpa) y O<sub>2</sub> 20 %; 2) 4 h/día durante 7 días a presión hidrostática (compresión hidrostática sinusoidal 1,0 Hz mín 0,3 MPa máx 5,0 Mpa) y O<sub>2</sub> 20 %; 3) 1 h/día durante 7 días a presión hidrostática (compresión hidrostática sinusoidal 1,0 Hz mín 0,3 MPa máx 5,0 Mpa) y O<sub>2</sub> 5 %; 4) 4 h/día durante 7 días a presión hidrostática (compresión hidrostática sinusoidal 1,0 Hz mín 0,3 MPa máx 5,0 Mpa) y O<sub>2</sub> 5 %.

La diferenciación condrogénica se puede evaluar mediante el método de ejemplo descrito anteriormente.

Las patentes y publicaciones de AU mencionadas en la memoria son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

#### PATENTES

Patente US-6.489.165

Patente US-6.627.422

65

**PUBLICACIONES**

- Barry F, Boyton RE, Liu B et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001 (268): 189-200.
- 5 Carter DR, Orr TE, Fyhrie DP, Schurman DJ. Influences of mechanical stress on prenatal and postnatal skeletal development. *Clin Orthop* 1987(219):237-250.
- 10 Cui, L., Yin, S., Deng, CL., Yang, GH., Chen, FG., Liu, W., Liu, DL., Cao, YL. Cartilage-derived morphogenetic protein 1 initiates chondrogenic differentiation of human dermal fibroblasts in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2 ago 2004;84(15): 1304-1309.
- 15 Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures *Differentiation* 1999;64:67-76
- Domn C, Fay J, Schunke M, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure *Orthopade* Feb 2000; 29(2):91-99
- 20 Dozin, R. Quarto, G. Campanile & R. Cancedda: In vitro differentiation of mouse embryo chondrocytes: requirement for ascorbic acid. *Eur J Cell Biol* 1992;58, 390-4
- Elder SH, Fulzele KS, McCulley WR. Cyclic hydrostatic compression stimulates chondroinduction of C3H/10T1/2 cells. *Biomechan Model Mechanobiol* 2005(3): 141-146
- 25 French MM, Rose S, Canseco J and Athanasiou KA. Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; 32 (1):50-56.
- 30 Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocyte cultured in alginate beads. *Matrix* 1992(12):116-129.
- Kessler, D., Dethlefsen, S., Haase, I., Plomann, M., Hirche, F., Krieg, T., Eckes, B. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J. Biol. Chem.* Sept 2001; 276(39):36575-36585.
- 35 Majumdar MK, Wang E and Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J. Cell. Physiol.* 2001(189):275-284.
- 40 Meisel, HJ., Alasevic, O., Hutton, W., Ganey, T. Disc repair with autologous chondrocytes: A pilot clinical study. *European Cells and Materials*. Vol. 10 Supl. 3, 2005 (page 39) Watt FM. Effect of seeding density on stability of the dedifferentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* 1988; 89:373-378.
- Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, Kojima K, Ueda M, and Bonassar LJ. Tissue-engineered composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine* 2004 (29):1290-1298.
- 45 Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992; 13(2):67-97.
- Nicoll SB., Wedrychowska, A., Smith, NR., Bhatnagar, RS. Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass culture and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype. *Connect. Tissue Res.* 2001;42(1):59-69.
- 50 T.A. Sullivan, B. Uschmann, R. Hough & P.S. Leboy: Ascorbate modulation of chondrocyte gene expression is independent of its role in collagen secretion. *J Biol Chem* 1994; 36, 22500-6
- 55 Watt FM. Effect of seeding density on stability of the dedifferentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* 1988; 89:373-378
- Zhou S, Glowacki J, and Yates KE. Comparison of TGF-b/BMP pathways signaled by demineralized bone powder and BMP-2 in human dermal fibroblasts. *J Bone Miner Res* 2004; 19:1732-1741.
- 60 Zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol*, 2005; 26 ene (5): 1-15.
- 65 Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, debe entenderse que se pueden hacer diversos cambios, sustituciones y alteraciones en la presente memoria sin apartarse del alcance de la invención

5 como se define por las reivindicaciones adjuntas. Además, el alcance de la presente solicitud no pretende limitar las realizaciones particulares del proceso, máquina, fabricación, composición de materia, medios, métodos y etapas descritos en la memoria. Aquel con experiencia ordinaria en la técnica apreciará fácilmente a partir de la divulgación de la presente invención, que los procesos, máquinas, fabricación, composiciones químicas, medios, métodos, o etapa, existentes actualmente o desarrollados posteriormente que realizan sustancialmente la misma función o logran sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en la presente memoria, pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, las reivindicaciones adjuntas pretenden incluir dentro de su alcance tales procesos, máquinas, fabricación, composiciones químicas, medios, métodos o etapas.

10



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método *ex vivo* de preparación de una composición de células/armazón, en el que las células son condrocitos o células de tipo condrocito, comprendiendo el método:
- 10 fijar las células capaces de diferenciarse en una célula de tipo condrocito a un armazón;  
encapsular las células por medio de dos membranas biopoliméricas biodegradables en forma de globo expandibles; y  
someter las células a tensión mecánica.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además someter las células a uno o más factores de crecimiento adecuados para la diferenciación en un condrocito o en una célula de tipo condrocito.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la tensión mecánica es intermitente.
- 20 4. Un dispositivo implantable que comprende:  
un biorreactor *in vivo* para el diseño de cartílago, que comprende un dispositivo que encapsula células;  
un núcleo vivo que comprende células que son capaces de diferenciarse en condrocitos o en células de tipo condrocito;  
en el que dicho dispositivo que encapsula las células encapsula dicho núcleo vivo;  
en el que la encapsulación de dichas células en dicho núcleo vivo ofrece condiciones adecuadas para el crecimiento y la diferenciación *in vivo* de dichas células, en el que dichas condiciones comprenden proporcionar un régimen de carga fisiológica en dichas células, y  
25 **caracterizado por que**  
dicho dispositivo que encapsula las células comprende dos membranas biopoliméricas biodegradables en forma de globo expandibles.
- 30 5. El dispositivo implantable de la reivindicación 4, en el que dichas células comprenden una composición de células/armazón;  
en el que una primera dicha membrana biodegradable que encapsula las células comprende una primera membrana que tiene un interior y un exterior; y  
comprendiendo además dicho biorreactor:
- 35 una estructura para el intercambio de al menos parte del fluido que está dentro de la primera membrana, en el que la primera membrana tiene una o más de las siguientes características:
- 40 semi-permeable;  
biocompatible; y  
reabsorbible.
- 45 6. El dispositivo implantable de la reivindicación 4, en el que dichas células comprenden una composición de células/armazón; y en el que una primera dicha membrana biodegradable que encapsula las células comprende una primera membrana que tiene un interior y un exterior;
- 50 en el que una segunda dicha membrana tiene un interior y un exterior, en el que la primera membrana está encapsulada dentro de la segunda membrana; comprendiendo además dicho dispositivo:  
un primer volumen dispuesto dentro de la primera membrana;  
un segundo volumen que está dispuesto fuera de la primera membrana y que está dispuesto dentro de la segunda membrana; y  
una estructura para la adición de fluido al segundo volumen, extrayendo fluido del segundo volumen, o ambos,
- 55 en el que la composición de células/armazón está dispuesta dentro de la primera membrana y la primera membrana tiene una o más de las siguientes características:
- 60 semi-permeable;  
biocompatible; y  
reabsorbible,
- 65 en el que la segunda membrana tiene una o más de las siguientes características:  
biocompatible;  
hermética a los fluidos;  
permeable al oxígeno;  
reabsorbible;  
biodegradable; y

expandible.

7. El dispositivo implantable de la reivindicación 6, en el que el armazón está comprendido por un polímero sintético, un hidrogel natural o un hidrogel sintético.

5 8. El dispositivo implantable de la reivindicación 7, en el que se aplica uno de los siguientes casos:

10 (a) el polímero sintético es ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, poli-ε-caprolactona o poli(glicerol-sebacato) (PGS); o

(b) el polímero sintético es un polifosfaceno, un polianhídrido o un poli(ortoéster); o

(c) el hidrogel natural comprende colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa, quitosano, fibrina, gelatina o un copolímero de los mismos; o

(d) el hidrogel sintético comprende poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(propileno fumarato-co-etilenglicol) o un copolímero de los mismos.

15 9. El dispositivo implantable de la reivindicación 6, en el que las células condrocitos o las células de tipo condrocito secretan una molécula seleccionada del grupo que consiste en agregcano, colágeno tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión al cartílago y perlecán.

20 10. El dispositivo implantable de la reivindicación 6, en el que las células se diferencian a partir de células fibroblastos y/o células madre.

25 11. El dispositivo implantable de la reivindicación 10, en el que las células fibroblastos son fibroblastos dérmicos, fibroblastos de tendón, fibroblastos de ligamento, fibroblastos sinoviales, fibroblastos de prepucio o una mezcla de los mismos.

12. El dispositivo implantable de la reivindicación 6, en el que la tasa de reabsorción de la segunda membrana es más lenta que la tasa de reabsorción de la primera membrana.

30 13. El dispositivo implantable de la reivindicación 6, en el que la estructura se define además como que comprende uno o más de:

35 un primer tubo;  
un segundo tubo;  
opcionalmente, un primer depósito; y  
opcionalmente, un segundo depósito.

40 14. El dispositivo implantable de la reivindicación 13, en el que el primer y segundo tubos comprenden, respectivamente, primeros extremos posicionados dentro del segundo volumen, en el que el primer y segundo tubos comprenden, respectivamente, segundos extremos conectados al primer y segundo depósitos, o ambos.

45 15. El dispositivo implantable de la reivindicación 13, en el que el primer y/o segundo tubos están comprendidos por el mismo material que la segunda membrana; o en el que el primer y/o segundo tubos están comprendidos por caucho de silicona.

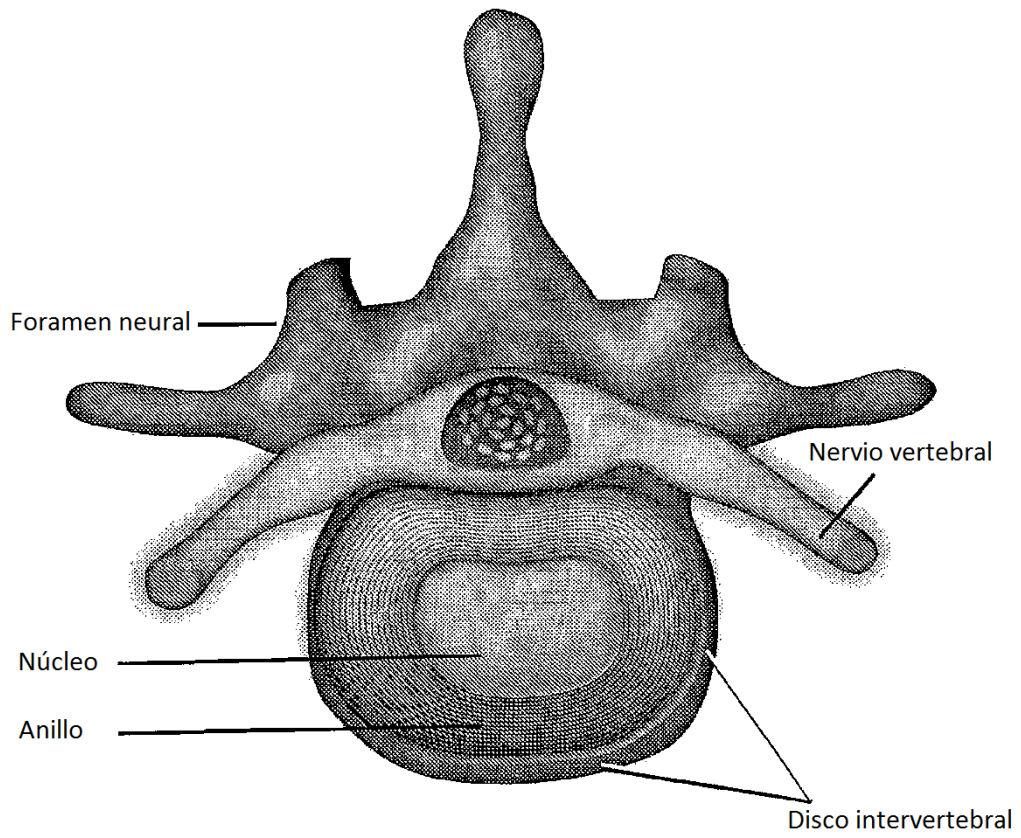


FIG. 1

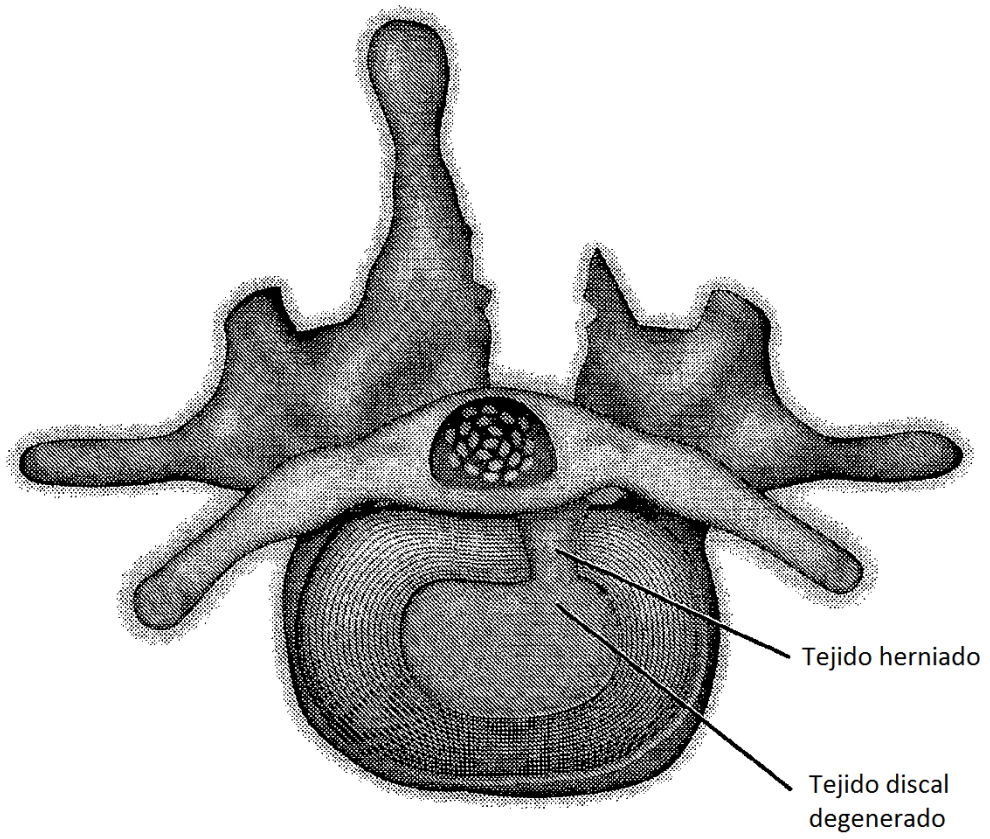


FIG. 2

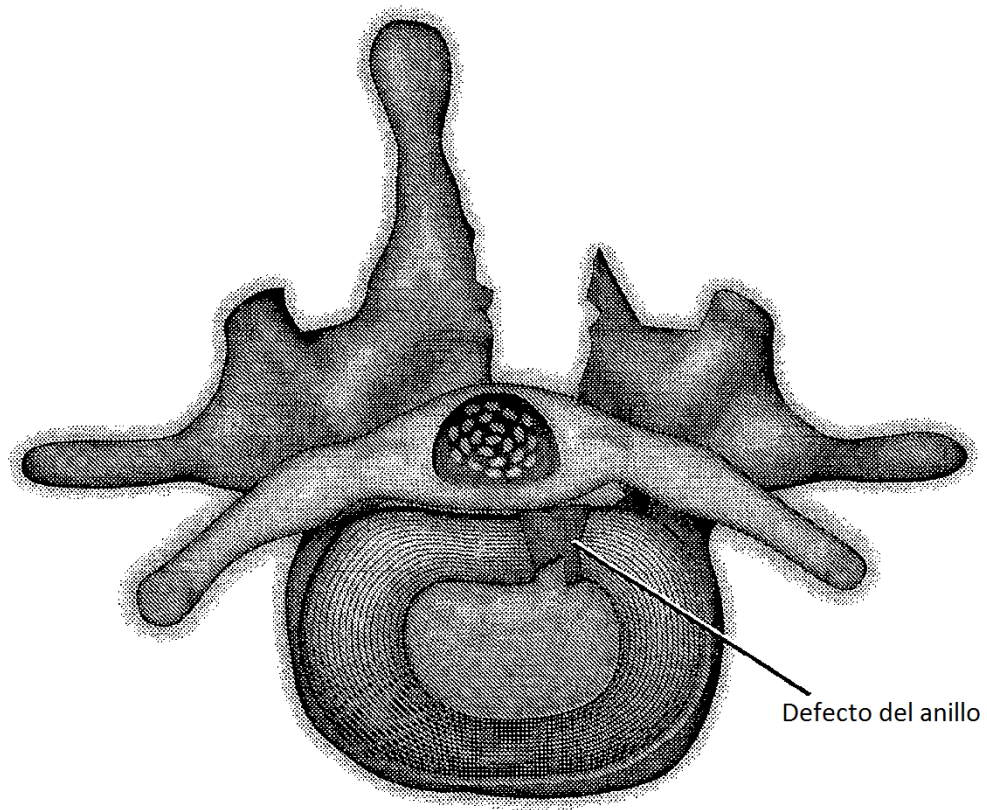


FIG. 3

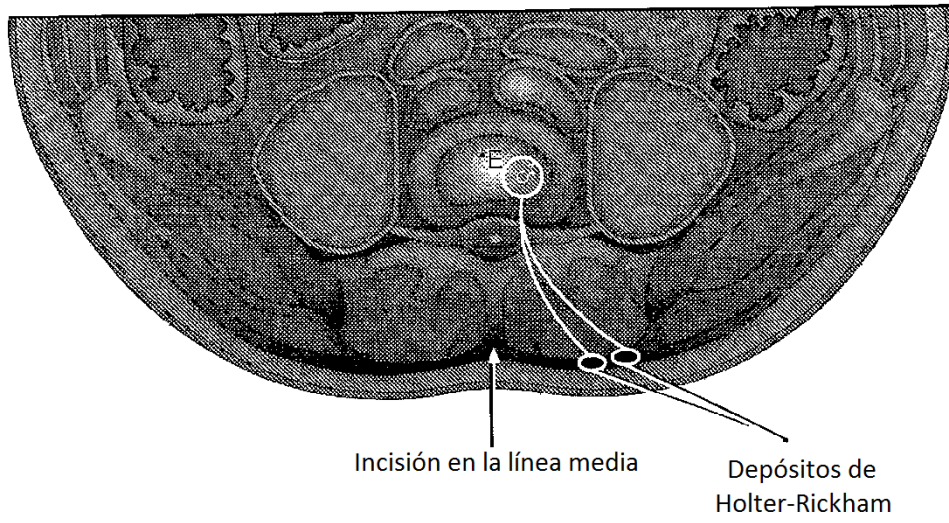


FIG. 4