

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 567**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2003 PCT/EP2003/010796**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2004 WO04029230**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2003 E 03750654 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 1546307**

54 Título: **Células sobre una matriz de soporte para reparación tisular**

30 Prioridad:

**27.09.2002 US 414098 P**

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

**25.07.2017**

73 Titular/es:

**VERIGEN AG (100.0%)  
SIEMENSSTRASSE 5B  
63263 NEU-ISENBURG, DE**

72 Inventor/es:

**MING, HAO ZHENG y  
GIANNETTI, BRUNO**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

ES 2 626 567 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**

Células sobre una matriz de soporte para reparación tisular

5 Se producen algunos tipos de defectos tisulares en todas las personas en un aspecto u otro. Quemaduras, rasguños, desgarros del músculo, cartílago o tendón, daño a los nervios, huesos rotos, y similares son habituales en personas con estilos de vida activos.

10 Usando la reparación del cartílago como ejemplo típico, se realizan cada año más de 500.000 procedimientos artroplásticos y reemplazos articulares totales en los Estados Unidos. Se realiza aproximadamente el mismo número de procedimientos similares en Europa. Se incluyen en estos números aproximadamente 90.000 reemplazos totales de rodilla y cerca de 50.000 procedimientos para reparar defectos en la rodilla al año (en: Praemer A., Fumer S., Rice, D. P., Musculoskeletal conditions in the United States, Park Ridge, Ill.: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992, 125).

15 Las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 5.759.190; 5.989.269; 6.120.514; 6.283.980; 6.379.367; 6.569.172; 6.592.598; 6.592.599; y 6.599.300, describen diversas realizaciones de métodos y composiciones para el tratamiento de defectos del cartílago implantando un componente sembrado con condrocitos en el sitio de un defecto del cartílago. El documento WO 99/19005 describe un implante de membrana de colágeno para su uso en la regeneración tisular guiada.

20 Actualmente existe la necesidad de métodos eficientes y eficaces para reparar y/o regenerar tejidos defectuosos distintos de cartílago. Las enseñanzas de la presente invención proporcionan medios eficaces y eficientes de promover la reparación y regeneración de tejidos defectuosos usando matrices de soporte sembradas con células.

25 La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas. También se describen en el presente documento métodos para el tratamiento eficaz de defectos tisulares y para la regeneración de tejidos usando células, preferiblemente células autólogas, sembradas sobre una matriz de soporte. La presente invención se refiere a estructuras de reparación tisular que comprenden una membrana sembrada con células de uno o más tipos específicos para su uso en la reparación y/o regeneración de uno o más tejidos específicos.

30 Se describen en el presente documento métodos y productos para el tratamiento eficaz de cualquier tipo de defecto tisular incluyendo, pero sin limitarse a, músculo, tejido blando, hueso, tendón, nervio y tejido del cartílago, o para regeneración tisular, mediante el trasplante de células (por ejemplo, autólogas) sembradas sobre una matriz de soporte. Los métodos también pueden incluir el uso de células madre no autólogas, un parche de recubrimiento y/o una barrera hemostática.

35 El parche de recubrimiento y/o la barrera hemostática pueden ser cualquier material de matriz o adhesivo descritos en el presente documento. Se proporcionan una descripción detallada de trasplante autólogo y varias matrices de soporte, parches de recubrimiento, y/o barreras hemostáticas en la patente estadounidense n.º 6.379.367, concedida el 30 de abril de 2002.

A. Células y tejidos de la presente invención

45 La presente invención contempla composiciones que incluyen células, preferiblemente células autólogas, sembradas sobre una matriz de soporte para su uso en la reparación y/o regeneración tisular. Por "sembrar" se quiere decir que se ponen las células en contacto con una matriz de soporte, y se adhieren (con o sin un adhesivo) a la matriz de soporte durante un periodo de tiempo antes del trasplante. En una realización, las células se adhieren a y proliferan y se diferencian para dar un tipo celular deseado sobre la matriz de soporte antes del trasplante.

50 En una realización de la invención, las células se retienen únicamente sobre una superficie o un borde de, o a una profundidad específica (tal como se describe en el presente documento) de la matriz de soporte, es decir, las células se adhieren a una superficie o son adyacentes a la matriz de soporte, tal como se describe en la publicación estadounidense n.º 20020173806.

55 En la presente invención, es preferible una siembra uniforme. Se cree que el número de células sembradas no limita el tejido final producido, sin embargo, una siembra óptima puede aumentar la tasa de generación. Las cantidades de siembra óptima dependerán de las condiciones de cultivo específicas. La matriz se siembra con desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 5 veces la densidad celular fisiológica de un tipo de tejido nativo, es decir, en nervio o tendón. La densidad celular puede ser menor de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  células, o más, por ml, normalmente de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por ml.

60 A modo de ejemplo y no como limitación, las células adecuadas incluyen tenocitos, miocitos, células madre, osteocitos, condrocitos, células epiteliales, queratinocitos, células nerviosas (incluyendo, pero sin limitarse a, neurocitos, astrocitos, células dendríticas y células de la glía), fibroblastos, odontocitos, sinoviocitos, adipocitos y cementocitos. Además, también son útiles en la presente invención células precursoras de estos tipos de células. En

una realización, por ejemplo, los mioblastos, que son precursores de miocitos; osteoblastos, que son precursores de osteocitos; y neuroblastos, que son precursores de neurocitos, son todos útiles en la presente invención. En una realización, preferiblemente las células y los precursores celulares son células autólogas y precursores celulares autólogos.

5 Los tejidos que se beneficiarían de los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, tendones, músculos, cartílago, hueso y dientes, piel, tejido nervioso, tejido epitelial, y otros tejidos.

10 B. Métodos de la presente invención

En un aspecto de la presente invención, la presente invención contempla el uso de células autólogas para el tratamiento de muchos defectos tisulares diferentes y para la regeneración del tejido.

15 A modo de ejemplo, y no como limitación, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de desgarros de tendones trasplantando tenocitos autólogos sobre una matriz de soporte. Un ejemplo representativo de un desgarramiento del tendón es tendinitis del manguito rotador, provocado por un desgarramiento parcial del tendón. La presente invención también incluye métodos para el cultivo de tenocitos, la siembra de tenocitos sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con tenocitos en o sobre el sitio de trasplante.

20 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados para el tratamiento de defectos de los huesos y para la regeneración de los huesos. En una realización, se siembran osteoblastos autólogos sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. Tales ejemplos representativos de defectos de los huesos incluyen fracturas pseudoartrósicas, defecto segmentario del hueso o cirugía reconstructiva usando tejido óseo. También se describe un método para el cultivo de osteoblastos, la siembra de osteoblastos sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

30 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para el tratamiento de defectos de los músculos y para la regeneración del músculo. Se siembran mioblastos autólogos sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. Los ejemplos representativos de un defecto del músculo incluyen degeneración del músculo y desgarramientos del músculo. También se describe un método para el cultivo de mioblastos, la siembra de mioblastos sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

35 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para el tratamiento de defectos del cartílago y para la regeneración del cartílago. Se siembran condrocitos autólogos sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. Un ejemplo representativo de un defecto del cartílago incluye el deterioro o lesión del cartílago en una articulación, tal como la rodilla, el hombro, el codo, la cadera o el tobillo. También se describe un método para el cultivo de condrocitos, la siembra de condrocitos sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

45 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para el tratamiento de defectos de la piel y para la regeneración de la piel. Se siembran queratinocitos autólogos sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. Algunos ejemplos representativos de defectos de la piel incluyen heridas de espesor parcial y total debido a quemaduras, no cicatrización crónica, estasis venosa y úlceras diabéticas. También se describe un método para el cultivo de queratinocitos, la siembra de queratinocitos sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

50 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para el tratamiento de defectos y enfermedades de las vías urinarias (por ejemplo, incontinencia), y para la regeneración del tejido epitelial. Se siembran células epiteliales autólogas sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante en las vías urinarias. También se describe un método para el cultivo de células epiteliales, la siembra de células epiteliales sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

60 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para el tratamiento de defectos de los nervios y para la regeneración de los nervios. Se siembran células nerviosas autólogas sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. Un ejemplo representativo de un defecto de los nervios incluye lesión de la médula espinal o daño de los nervios provocado por golpes.

65 También se describe un método para el cultivo de células nerviosas, la siembra de células nerviosas sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

La presente divulgación también contempla un método para aumentar la cantidad de tejido adiposo en un paciente. A modo de ejemplo, puede desearse un aumento de tejido adiposo durante cirugía plástica o reconstructiva, tal como, aumento o reconstrucción de las mamas.

5 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para la producción de adipocitos para su uso en cirugía plástica o reconstructiva (por ejemplo, cirugía de aumento o reconstrucción de las mamas). Se siembran adipocitos autólogos sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. También se describe un método para el cultivo de adipocitos, la siembra de adipocitos sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

15 La presente divulgación también contempla el uso de los métodos enseñados en la invención para el tratamiento de cualquier defecto tisular o para la regeneración de cualquier tejido. Las células madre autólogas están diferenciadas, parcialmente diferenciadas o no diferenciadas antes de la siembra en la matriz de soporte, y entonces se siembran sobre una matriz de soporte y se implanta la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante. Opcionalmente, pueden usarse factores que ayudan en la diferenciación antes, durante o tras el trasplante de la matriz de soporte sembrada con células. También se describe un método para el cultivo y la diferenciación de las células madre, la siembra de las células madre o células diferenciadas sobre una matriz de soporte e la implantación de la matriz de soporte sembrada con células en o sobre el sitio de trasplante.

20 C. Composiciones de la presente invención

En una realización, se ponen las células en contacto con una o más partes predeterminadas de una matriz de soporte, por ejemplo, con una superficie o parte de una superficie de una matriz de soporte, de manera que una parte sustancial de las células o sustancialmente todas las células migran al interior de una o más de las superficies de la matriz de soporte hasta una profundidad máxima predeterminada de la matriz de soporte. Por ejemplo, en una realización, esa profundidad es hasta aproximadamente el 50 por ciento, preferiblemente hasta el 25 por ciento, más preferiblemente hasta aproximadamente el 10 por ciento e incluso más preferiblemente hasta aproximadamente el 3-5 por ciento de la profundidad de la matriz de soporte. Tal siembra controlada de las células en y/o cerca de una superficie de la matriz de soporte permite que las células migren libremente y pueblen un sitio de trasplante y conduce a proliferación potenciada de las células y regeneración de tejido en el sitio de trasplante. En una realización, tal siembra puede conseguirse con o sin vacío vertiendo las células en o cerca de una superficie de la matriz de soporte, tal como se describe en la publicación estadounidense n.º 20030134411, o mezclando o colocando células en una parte de la matriz de soporte. Las células pueden obtenerse de cualquier modo adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, células obtenidas a partir de una biopsia. Las células así obtenidas pueden entonces aislarse, cultivarse y sembrarse sobre una matriz de soporte, formando una composición de la presente invención, tal como se describe a continuación.

40 1. Obtención de células para su uso con la presente invención

Pueden aislarse células de tejido de distintas maneras, las cuales son todas conocidas para un experto en la técnica. En una realización, pueden aislarse células de un material de biopsia mediante métodos convencionales. El material de biopsia puede extraerse de cualquier tejido del paciente relacionado con el tipo de tejido del defecto o regeneración tisular. Por ejemplo, un paciente que requiere tratamiento o regeneración de un tendón puede tener una biopsia tomada de cualquier tendón en el cuerpo. Tales tendones incluyen, pero no se limitan a, un tendón del flexor radial del carpo y el tendón calcáneo. De la biopsia de tendones, se aíslan tenocitos y se cultivan mediante métodos convencionales.

50 Asimismo, un paciente que requiere tratamiento de tendinitis del manguito rotador puede tener una biopsia tomada de cualquier tendón. Tales tendones incluyen, pero no se limitan a, flexor radial del carpo y el tendón calcáneo. De la biopsia de tendones, se aíslan osteoblastos y se cultivan mediante métodos convencionales.

Para el tratamiento de defectos de tejidos blandos, tales como un defecto de la piel (por ejemplo, una quemadura, corte o laceración), puede tomarse una biopsia de piel de cualquier parte de la epidermis del paciente que contiene queratinocitos. De la biopsia de piel, se aíslan queratinocitos y se cultivan mediante métodos convencionales.

60 Para otros defectos de tejidos blandos, tales como defectos en el revestimiento epitelial de la vejiga, puede tomarse una biopsia de las vías urinarias, de la que pueden aislarse células epiteliales. Pueden aislarse células epiteliales de tejidos que incluyen, pero no se limitan a, fosa navicular de la uretra. De la biopsia uretral, se aíslan células epiteliales y se cultivan mediante métodos convencionales.

Para el tratamiento de defectos de los huesos, puede tomarse una biopsia de cualquier hueso en el cuerpo. Tales huesos incluyen, pero no se limitan a, la cresta ílica. De la biopsia de hueso, se aíslan osteoblastos y se cultivan mediante métodos convencionales.

65 Para el tratamiento de un defecto del cartílago, puede tomarse una biopsia de cartílago de cualquier tipo de cartílago

en el cuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, cartílago articular y cartílago del menisco, dependiendo del tipo de cartílago del sitio del defecto o que va a regenerarse. En el caso de cartílago, el tipo de cartílago no es relevante para el método de tratamiento del defecto. Por tanto, pueden usarse células en una biopsia de cartílago articular para el tratamiento de un defecto del cartílago del menisco y viceversa. Puede obtenerse cartílago del menisco de, por ejemplo, la rodilla. El cartílago articular es un tipo más especializado de cartílago hialino y puede hallarse en cualquier superficie de las articulaciones. Pueden usarse condrocitos obtenidos de cualquier superficie articular para el tratamiento de cualquier defecto del cartílago. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, la articulación de la rodilla.

Para el tratamiento de un defecto de los nervios, puede tomarse una biopsia de una célula nerviosa de cualquier nervio periférico o médula espinal. De la biopsia, se aíslan células nerviosas y se cultivan mediante métodos convencionales.

Alternativamente, para el tratamiento de cualquier tipo de defecto tisular, puede tomarse una biopsia que contiene células madre de médula ósea, sangre de cordón umbilical, piel o cartílago de un paciente. De la biopsia, se aíslan y se cultivan células madre del paciente. Las células madre se diferencian para dar las células específicas para su uso en el tratamiento del defecto tisular específico.

También se aíslan células madre de tejido fetal y cordón umbilical mediante métodos convencionales. Las células madre pueden ser autólogas o no autólogas puesto que determinadas células madre están solamente disponibles en sangre de cordón umbilical, pero pueden diferenciarse para dar un tipo de célula requerida. Cualquier tipo de célula madre, incluyendo células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, células madre no humanas totipotentes y células madre pluripotentes, puede usarse en la presente invención, dependiendo del defecto particular que va a repararse o tejido que va a regenerarse.

## 2. Incubación, aislamiento y cultivo de células

Una vez que se extrae la biopsia, se lava la biopsia y se incuba en un medio de crecimiento celular que contiene una enzima adecuada que disolverá el material de biopsia que rodea las células dentro del tejido sin dañar las células, durante un periodo de tiempo recomendado. El medio de crecimiento celular es específico para el tipo de célula que se está extrayendo de la biopsia. En una realización de la invención, el medio de crecimiento celular incluye suero de ternero fetal al 20%, y opcionalmente un antibiótico, un antifúngico, y factor(es) necesario(s) para la inducción de la diferenciación de la linaje celular (a continuación en el presente documento "medio de crecimiento celular"). Por ejemplo, un factor necesario para la diferenciación de condrocitos en cultivo a partir de un cultivo de condrocitos primario aislado de una biopsia de cartílago es el ácido ascórbico. Otro factor necesario para la diferenciación de condrocitos a partir de células madre en cultivo es el factor de crecimiento transformante beta.

En una realización, la enzima incluida en el medio de crecimiento celular es preferiblemente una disolución de tripsina/EDTA. Alternativamente, la enzima puede ser colagenasa.

En una realización, tras la incubación, el material de biopsia se lava de nuevo, y se pesa. Con el fin de obtener un número adecuado de células para empezar un cultivo celular, el material de biopsia pesa entre 80 y 300 miligramos. Preferiblemente, el material de biopsia pesa al menos entre 200 y 300 miligramos.

En una realización, entonces se digiere el material de biopsia, preferiblemente con una enzima digestiva que no dañará las células, incubando el material de biopsia en una disolución de la enzima digestiva y medio de cultivo celular durante aproximadamente de 5 a aproximadamente 30 horas, preferiblemente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 horas a 37 grados centígrados en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. La enzima digestiva puede ser, por ejemplo, colagenasa en bruto, para la digestión de cualquier tipo de colágeno. En una realización, el material de biopsia se desmenuza preferiblemente para ayudar en la digestión del material.

En una realización, tras la digestión, las células del material de biopsia se aíslan centrifugando la disolución de biopsia, y lavando el sedimento resultante con medio de crecimiento celular. Alternativamente, el material desmenuzado puede colarse en primer lugar a través de una malla que tiene un tamaño de poro adecuado para el tipo de célula particular para eliminar residuos más grandes y aislar las células. Las células aisladas se cuentan entonces y se evalúan para determinar su viabilidad.

En una realización, tras el aislamiento, las células se cultivan en medio de crecimiento celular durante aproximadamente 3 días hasta aproximadamente cinco semanas, a 37 grados centígrados en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. El periodo de tiempo para el cultivo de células puede variar con el tipo de célula. El tiempo de cultivo puede variar con diferentes tipos de células puesto que diferentes tipos de células tienen tasas de proliferación diferentes.

## 3. Matrices de soporte de la presente invención

Una vez que las células se han cultivado hasta una densidad adecuada, entonces se siembran las células sobre una matriz de soporte.

La matriz de soporte puede estar en cualquier forma adecuada para la adherencia de células con o sin un adhesivo. A modo de ejemplo y no como limitación, la matriz de soporte puede estar en forma de una membrana, microperlas, felpa, hilos, o un gel, y/o mezclas de los mismos. El material de la matriz de soporte puede tener otros atributos físicos o mecánicos, tales como actuar como barrera hemostática. Una barrera hemostática inhibe la penetración de células y tejido adjuntos en el área de defecto tratado.

La matriz de soporte es un material semipermeable que puede incluir colágeno reticulado o no reticulado, preferiblemente de tipo I en combinación con tipo III o tipo II. La matriz de soporte también puede incluir polipéptidos o proteínas obtenidos de fuentes naturales o mediante síntesis, tales como ácido hialurónico, submucosa de intestino delgado (SIS), peritoneo, pericardio, poli(ácidos lácticos) y ácidos relacionados, sangre (es decir, que es un tejido circulante que incluye una parte fluida (plasma) con elementos formados en suspensión (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas), u otro material que sea bioabsorbible. También son útiles en la presente invención polímeros bioabsorbibles, tales como elastina, fibrina, laminina y fibronectina. También son útiles en la presente invención materiales de matriz de soporte tal como se describe en la publicación estadounidense n.º 20020173806.

Además, de manera preferible la matriz de soporte está inicialmente (es decir, antes de ponerse en contacto con las células que van a trasplantarse) libre de células intactas y es reabsorbible dentro del paciente. La matriz de soporte puede tener una o varias superficies, tales como una superficie porosa, una superficie densa, o una combinación de ambas. La matriz de soporte también puede incluir superficies semipermeables, impermeables o totalmente permeables. Se describen matrices de soporte que tienen una superficie porosa, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.569.172.

La matriz de soporte es autóloga o alógena. En una realización, se forma una matriz de soporte autóloga adecuada a partir de sangre, tal como se ejemplifica en la patente estadounidense n.º 6.368.298, concedida a Berretta, *et al.* el 9 de abril de 2002.

Una matriz de soporte adecuada será un soporte sólido, semisólido, gel o de tipo gel caracterizado por ser capaces de mantener una forma estable durante un periodo de tiempo para permitir la adherencia y/o el crecimiento de células en los mismos, tanto antes del trasplante como después del trasplante, y para proporcionar un sistema similar al medio natural de las células para optimizar el crecimiento y diferenciación celulares. Se dan a conocer ejemplos de matrices de soporte adecuadas en la publicación estadounidense n.º 20020173806.

En una realización, la matriz de soporte y/o células, o bien individualmente o bien en combinación, pueden combinarse con un adhesivo (por ejemplo, un pegamento biocompatible tal como pegamento de fibrina que puede ser autólogo o alógeno) o medios de retención física o mecánica tal como una aguja reabsorbible para ayudar en la conservación de las estructuras de reparación según la presente invención en o sobre el sitio de trasplante. Los ejemplos adicionales de matrices de soporte incluyen los descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º 10/427.463, presentada el 1 de mayo de 2003.

La matriz de soporte puede cortarse o formarse para dar cualquier forma regular o irregular. En una realización preferida, la matriz de soporte puede cortarse para que corresponda con la forma del defecto. La matriz de soporte puede ser de forma plana, redonda y/o cilíndrica. La forma de la matriz de soporte también puede moldearse para ajustarse a la forma de un defecto tisular particular. Si la matriz de soporte es un material fibroso, o tiene las características de una fibra, la matriz de soporte puede tejarse para dar una forma deseada. Alternativamente, la matriz de soporte puede ser un material de gel, de tipo gel, o material no tejido.

En una realización, una matriz de soporte de la presente invención puede sembrarse con múltiples tipos de células y tener diferentes tipos de células sobre y/o en y/o a lo largo y/o adyacentes a diferentes partes de la matriz de soporte. A modo de ejemplo, una parte de la matriz de soporte puede incluir un primer tipo de célula (por ejemplo, células de tendón) y otra parte de la matriz puede incluir un segundo tipo de célula (por ejemplo, células musculares). Por ejemplo, para reparar un defecto de los huesos o del cartílago en la intersección del hueso y el cartílago, una parte de la matriz de soporte puede incluir condrocitos y otra parte de la matriz puede incluir osteocitos.

A modo de ejemplo adicional, si la matriz tiene forma de disco, que tiene dos lados y un borde, un primer lado puede incluir un primer tipo de célula (por ejemplo, células de tendón) en el mismo y el segundo lado o borde puede incluir un segundo tipo de célula (por ejemplo, células musculares) en el mismo. Alternativamente, cada superficie de una matriz de soporte puede incluir el mismo tipo de célula en y/o sobre y/o a lo largo y/o adyacente a una superficie. Preferiblemente, se siembran las células de tal modo que se impide que las células migren de un lado a otro. Por tanto, en algunas realizaciones, los tipos de células no interactuarán entre sí.

En otra realización, dos o más matrices de soporte pueden estar en contacto entre sí. En una realización de este tipo, una primera matriz de soporte puede estar en contacto con una segunda matriz de soporte antes, durante o después de que cualquiera de las matrices de soporte se ponga en contacto con uno o más tipos de células.

D. Implantación de la composición de la presente invención

Después de que las células se siembren sobre la matriz de soporte, la matriz de soporte y las células se trasplantan en el defecto tisular, con las células enfrentándose a la superficie que va a tratarse. En una realización, se sujeta un parche de recubrimiento (por ejemplo, adhesivo o sutura biocompatibles) sobre el defecto tal como se describe en el presente documento, y se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

En una realización, un parche de recubrimiento sirve para recubrir el defecto para impedir adicionalmente la infiltración de materiales no deseados, tales como fibroblastos o macrófagos, del medio circundante. En una realización, el parche de recubrimiento puede ser cualquier de las matrices de soporte descritas en el presente documento, y/o puede incluir colágeno (tipo I/III), ácido hialurónico, fibrina y poli(ácido láctico). Preferiblemente, el parche de recubrimiento está libre de células y es reabsorbible, y puede ser semipermeable.

En una realización, la matriz de soporte y las células pueden inyectarse al sitio de trasplante, con o sin un adhesivo o pegamento.

E. Otros materiales

Una matriz de soporte o matriz de soporte sembrada de la presente invención también puede incluir diversos principios activos farmacológicos incluyendo, pero sin limitarse a, antimicrobianos, antivíricos, antibióticos, factores de crecimiento adecuados para el tipo de tejido que va a regenerarse y/o repararse, moduladores de la coagulación sanguínea tales como heparina y similares, adicionalmente pueden añadirse mezclas y capas compuestas de los mismos al material de matriz de soporte biocompatible y biodegradable, antes de impregnarlos en la matriz de soporte.

Una matriz de soporte o matriz de soporte sembrada de la presente invención también puede incluir factores de crecimiento tales como factores de crecimiento autólogos y no autólogos adecuados para el tipo de tejido que va a regenerarse y/o repararse, incluyendo, pero sin limitarse a, factor de crecimiento transformante (tal como TGF-beta-3), proteína morfogenética ósea (tal como BMP-2), PTHxP, osteoprotegerina (OPG), Indian Hedgehog ("erizo indio"), RANKL, y factor de crecimiento similar a insulina (IgF1), tal como se describe en la publicación estadounidense n.º 20030144197.

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención también puede incluir un pegamento biocompatible en contacto con un sustrato y/o material biodegradable y/o células. Tales pegamentos o adhesivos biocompatibles pueden incluir un pegamento orgánico de fibrina (por ejemplo, Tisseel®, adhesivo a base de fibrina disponible de Baxter, Austria, o un pegamento de fibrina preparado en el quirófano usando muestras de sangre autólogas). En una realización, pueden mezclarse células de la presente invención con un pegamento apropiado antes, durante y/o después del contacto con una matriz de soporte de la presente invención. Alternativamente, puede colocarse un pegamento apropiado en un defecto o disponerse en capas encima de células o como una capa por debajo de células sobre una superficie o borde o impregnarse en una matriz de soporte de la presente invención.

En una realización, la presente invención incluye células y pegamento combinados entre sí en una mezcla de pegamento y células o una o más capas alternantes de células y pegamento sobre una superficie o borde de una matriz de soporte. Se contempla que pueden trasplantarse células que son autólogas al interior de un defecto. Se mezclan células, o bien de manera homogénea o bien de manera no homogénea, con un pegamento adecuado antes de la aplicación de la mezcla de células/pegamento a una matriz de soporte. Preferiblemente, el pegamento y las células se mezclan inmediatamente (es decir, en el quirófano) antes de aplicar el pegamento y las células a la matriz de soporte y la implantación de la combinación de pegamento, células y matriz de soporte a un defecto. Alternativamente, se aplican células y un pegamento de manera alternante en una o más capas a una matriz de soporte. En una realización, un pegamento para su uso en la presente invención es un pegamento biocompatible, tal como un pegamento de fibrina, y más específicamente o bien un pegamento de fibrina autóloga o bien un pegamento de fibrina no autóloga. Preferiblemente, se usa un pegamento de fibrina autóloga.

Los siguientes ejemplos describen métodos adecuados para poner en práctica varias realizaciones de la presente invención.

F. Ejemplos

Ejemplo 1: Método de tratamiento de tendinitis

Se toma una biopsia del tendón del flexor radial del carpo o tendón calcáneo, y se lava en DMEM, después se retira el tejido adiposo. Se desmenuza el tejido y se digiere en tripsina al 0,25% en DMEM libre de suero durante 1 hora a 37 grados centígrados, seguido por una digestión de 5 horas en colagenasa 1 miligramo por mililitro en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) libre de suero a 37 grados centígrados. Se lava el sedimento celular de 2 a 3 veces (se centrifuga a 200g durante aproximadamente 10 minutos), y vuelve a suspenderse en medio de crecimiento (DMEM que contiene suero de ternero fetal (FCS) al 10%, ácido ascórbico 50 microgramos por mililitro,

sulfato de gentamicina 70 micromol/litro, anfotericina 2,2 micromol/litro). Se cuentan los tenocitos para determinar la viabilidad y después se siembran. Se mantiene el cultivo en una atmósfera humidificada del 5% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipula en un laboratorio de clase 100. Se cambia el medio cada de 2 a 3 días. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células.

5 Después se someten las células a tripsinización usando tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul trípano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

10 Se usa una membrana de colágeno de tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH, (Kaiserstr., Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

15 Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio en el día 3.

20

Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

25

#### Ejemplo 2: Método de tratamiento de defectos de los huesos

30 Se toma una biopsia de la cresta ilíaca, y se corta en pequeños fragmentos antes de colocarla en un matraz de cultivo tisular. Las células que migraron desde los fragmentos de hueso se dispersaron mediante digestión con colagenasa. Se aíslan los osteoblastos y se cuentan para determinar la viabilidad. Se mantienen los osteoblastos en cultivo monocapa con alfa-MEM que contiene suero bovino fetal (FBS) al 10%, 2 milimolar de beta-glicerofosfato y 50 microgramos por mililitro de ácido L-ascórbico. Se mantiene el cultivo en una atmósfera humidificada del 5% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire a 37 grados centígrados en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipula en un laboratorio de clase 100. Se cambia el medio cada 2-3 días. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células. Se someten las células a tripsinización usando tripsina y EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul trípano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

35

40 Se usa una membrana de colágeno de tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH, (Kaiserstr., Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

45 Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio en el día 3.

50

Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

55

#### Ejemplo 3: Método de tratamiento de defectos musculares

60 Se toma una biopsia de músculo *M. gastrocnemius*. Se lava la biopsia en medio F12 de Ham suplementado con Hepes 10 milimolar/NaOH (pH 7,2), y se retiran los tendones y el tejido adiposo. Se corta el tejido en pequeños fragmentos, después se incuba en el tampón de disociación, que es el tampón anterior que contiene pronasa al 0,12% (p/v) y EDTA al 0,03% (p/v), durante 1 hora a 37 grados centígrados en un baño de agua con agitación. Tras la digestión, se filtra la suspensión a través de una malla de nailon de 100 micrómetros al interior de un volumen igual del medio de cultivo que es F12 de Ham que contiene 2,2 gramos por litro de bicarbonato de sodio, suero de ternero fetal (FCS) al 20% y penicilina y estreptomina. Se lava el sedimento celular centrifugando a 300g durante 10 minutos a 4 grados centígrados y vuelve a suspenderse el sedimento en el medio de cultivo. Se aíslan las células musculares y se cuentan para determinar la viabilidad. Se cultivan los mioblastos y se mantienen en una atmósfera

65

humidificada del 5% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipulan en un laboratorio de clase 100. Se cambia el medio 24 horas después de la siembra y después cada 4 días. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células. Se someten las células a tripsinización usando tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul trípano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

Se usa una membrana de colágeno de tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH, (Kaiserstr., Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio en el día 3.

Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

#### Ejemplo 4: Método de tratamiento de defectos de cartílago

Se toma una biopsia de la rodilla y se lava la biopsia una vez en medio de crecimiento celular. El medio de crecimiento contiene sulfato de gentamicina 70 micromol/litro, anfotericina 2,2 micromol/litro, ácido ascórbico 0,3 millimol/litro y suero de ternero fetal al 20%. Se incuba la biopsia en medio de crecimiento celular que contiene tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos a 37 grados centígrados y al 5% de CO<sub>2</sub>. Se lava la biopsia dos o tres veces más con medio de cultivo celular para eliminar cualquier tripsina-EDTA restante. Se pesa la biopsia y después se digiere con colagenasa (aproximadamente 5000 unidades para una biopsia de 80-300 miligramos) durante aproximadamente de 3 a 12 horas a 37 grados centígrados y al 5% de CO<sub>2</sub>. Alternativamente, se desmenuza la biopsia en este momento para ayudar a la digestión del material. Después se centrifuga el material de biopsia a 700g durante aproximadamente 10 minutos, y se lava el sedimento con medio de crecimiento celular. Se aíslan los condrocitos y se cuentan para determinar la viabilidad. Se cultivan los condrocitos.

Se hacen crecer condrocitos en medio de cultivo esencial mínimo que contiene F12 de HAM y tampón Hepes 15 milimolar y suero autólogo a del 5 al 10% en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipulan en un laboratorio de clase 100. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células. Se someten las células a tripsinización usando tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul trípano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

Se usa una membrana de colágeno de tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH, (Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio en el día 3.

Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

#### Ejemplo 5: Método de tratamiento de defectos de la piel

Se toma una biopsia de piel humana. Se lava la biopsia una vez en medio de crecimiento celular. El medio de crecimiento contiene sulfato de gentamicina 70 micromol/litro, anfotericina 2,2 micromol/litro, ácido ascórbico 0,3 millimol/litro y suero de ternero fetal al 20%. Se incuba la biopsia en medio de crecimiento celular que contiene tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos a 37 grados centígrados y al 5% de CO<sub>2</sub>. Se lava la biopsia dos o tres

5 veces más con medio de cultivo celular para eliminar cualquier tripsina-EDTA restante. Se pesa la biopsia y después se digiere con colagenasa (aproximadamente 5000 unidades para una biopsia de 80-300 miligramos) durante aproximadamente de 17 a 21 horas a 37 grados centígrados y al 5% de CO<sub>2</sub>. La biopsia puede desmenuzarse en este momento para ayudar a la digestión del material. Después se centrifuga el material de biopsia a 700g durante aproximadamente 10 minutos, y se lava el sedimento con medio de crecimiento celular. Se aíslan los queratinocitos y se cuentan para determinar la viabilidad. Se cultivan los queratinocitos.

10 Se cultivan los queratinocitos en presencia de fibroblastos NIH 3T3 en medio de cultivo DMEM/F12 que contiene suero bovino fetal al 10%, hidrocortisona (0,4 microgramos por mililitro), factor de crecimiento epidérmico humano (10 nanogramos por mililitro), toxina del cólera 10-10 M y insulina libre de zinc 5 microgramos por mililitro, adenina 24 microgramos por mililitro y 3,3,5-triyodo-L-tironina 2x10<sup>-9</sup> molar.

15 Se usa una membrana de colágeno de tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH, (Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

20 Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante 4 días con un cambio de medio en el día 2.

25 Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se implanta la matriz de soporte sembrada con células, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

30 Ejemplo 6: Método de tratamiento de defectos del epitelio

35 Se extrae una biopsia de las vías urinarias altas o bajas y se transporta en HBSS (solución salina equilibrada de Hank) libre de calcio, libre de magnesio con bicarbonato de sodio 0,35 gramos por litro que contiene tampón ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etanosulfónico (HEPES) 10 milimolar y aprotinina 100 KUI por mililitro. Se lava la muestra dos veces en HBSS, y se elimina el tejido del estroma en exceso de manera aséptica. Después se corta el tejido en fragmentos de 3 milímetros cúbicos antes de la digestión en EDTA al 0,1% durante la noche a 4 grados centígrados. Se aclara el sedimento celular de 2 a 3 veces (se centrifuga a 200g durante aproximadamente 10 minutos) en el medio de crecimiento que es un medio libre de suero, con bajo contenido en calcio, formulado para el cultivo de queratinocitos primario. Se suministran al este medio factor de crecimiento epidérmico recombinante y extracto de hipófisis bovina como aditivos. Se añade toxina del cólera al medio a una concentración final de 30 nanogramos por mililitro. Se aíslan las células uroepiteliales y se cuentan para determinar la viabilidad. Se siembran las células y se mantienen en una atmósfera humidificada del 5% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipulan en un laboratorio de clase 100. Se cambia el medio 3 veces por semana. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células. Se someten las células a tripsinización usando tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul trípiano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

50 Se usa una membrana de colágeno de tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH (Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). En primer lugar se trata previamente esta matriz de soporte particular o bien con glutaraldehído al 0,6% durante 1 minuto o bien con Tisseel® (Immuno AG, Viena, Austria), que es un pegamento de fibrina. Estos tratamientos retrasan significativamente la resorción de la matriz. Se lava esta matriz de soporte varias veces en agua destilada hasta que se elimina el glutaraldehído que no ha reaccionado. Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

60 Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio en el día 3.

65 Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se

recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

Ejemplo 7: Método de tratamiento de defectos de médula espinal

5 Se toma una biopsia de cualquier nervio periférico o médula espinal. Se mantienen nervios periféricos humanos en DMEM con FBS al 10%, penicilina 100 microgramos por mililitro y estreptomycin 100 microgramos por mililitro. Se elimina el epineuro y se cortan los fascículos nerviosos en segmentos de 1 a 2 milímetros de longitud. Se mantienen explantes de los segmentos en el medio anterior para inducir una degeneración walleriana *in vitro* durante 14 días. Durante este periodo, se cambia el medio cada dos días. Tras 14 días se digieren los explantes en colagenasa 1300 unidades por mililitro y dispasa 10 unidades por mililitro en DMEM con agitación continua a 37 grados centígrados durante 1 hora, después se disocia adicionalmente el tejido digerido mediante trituración repetida mediante una pipeta Pasteur. Se lava el sedimento celular y vuelve a suspenderse en DMEM con FBS al 10% antes de sembrarse en placas de cultivo que se habían recubierto con colágeno de cola de rata tipo I. Se mantienen los cultivos de células nerviosas en una atmósfera humidificada del 5% de CO<sub>2</sub>, el 95% de aire en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipulan en un laboratorio de clase 100. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células. Se someten las células a tripsinización usando tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul tripano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

20 Se usa una membrana de colágeno tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH (Kaiserstr., Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). En primer lugar se trata previamente esta matriz de soporte particular o bien con glutaraldehído al 0,6% durante 1 minuto o bien con Tisseel® (Immuno AG, Viena, Austria), que es un pegamento de fibrina. Estos tratamientos retrasan significativamente la resorción de la matriz. Se lava esta matriz de soporte varias veces en agua destilada hasta que se elimina el glutaraldehído que no ha reaccionado. Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

30 Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio en el día 3.

Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

Ejemplo 8: Método de tratamiento de cualquier defecto tisular

45 Se toma una biopsia de médula ósea y se lava la biopsia una vez en medio de crecimiento celular. El medio de crecimiento contiene F12 de HAM y tampón Hepes 15 milimolar, sulfato de gentomicina 70 micromol/litro, anfotericina 2,2 micromol/litro, ácido ascórbico 0,3 millimol/litro y suero de ternero fetal al 20%. Se incluyen factor(es) de crecimiento específico(s) en el medio de crecimiento para la inducción de linaje celular específico. Por ejemplo, se incluye factor de crecimiento transformante beta en el medio para la inducción de diferenciación de condrocitos mientras que se incluye factor de crecimiento de fibroblastos en el medio para la inducción de diferenciación de tenocitos. Se cultivan las células madre en el medio y se cuentan para determinar la viabilidad. Se hacen crecer las células diferenciadas en medio de cultivo esencial mínimo que contiene F12 de HAM y tampón Hepes 15 milimolar y suero autólogo a del 5 al 7,5% en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados y se manipulan en un laboratorio de clase 100. Pueden usarse otras composiciones de medio de cultivo para cultivar las células. Se someten las células a tripsinización usando tripsina-EDTA durante de 5 a 10 minutos y se cuentan usando tinción de viabilidad con azul tripano en una cámara Buurker-Turk. Se ajusta el recuento de células a 7,5x10<sup>5</sup> células por mililitro.

55 Se usa una membrana de colágeno tipo I/III de Geistlich Sohne (Suiza) o Matricel GmbH (Kaiserstr., Alemania) como matriz de soporte. Se corta la matriz a un tamaño adecuado para ajustarse en el fondo del pocillo en la bandeja de cultivo tisular de 6 pocillos NUNCLON™ Delta y se coloca en el pocillo en condiciones asépticas (NUNC (InterMed) Roskilde, Dinamarca). Se aplica una pequeña cantidad del medio de cultivo celular que contiene suero a la matriz para absorberse en la matriz y para mantener la matriz húmeda en el fondo del pocillo.

65 Se colocan aproximadamente 10<sup>6</sup> células en 1 mililitro de medio de cultivo directamente encima de la matriz, se dispersan sobre la superficie de la matriz. Después se incuba la placa de cultivo tisular en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 grados centígrados durante 60 minutos. Se añaden cuidadosamente desde 2 hasta 5 mililitros de medio de cultivo tisular que contiene suero a del 5 al 7,5% al pocillo de cultivo tisular que contiene las células. Se ajusta el pH a aproximadamente de 7,4 a 7,5 si es necesario. Se incuba la placa durante de 3 a 7 días con un cambio de medio

en el día 3.

5 Al final del periodo de incubación se decanta el medio y se lava la matriz de soporte sembrada con células. Después se implanta la matriz de soporte, con el lado con células hacia abajo, en el sitio de defecto, y opcionalmente se recubre con un parche de recubrimiento. Después se deja que cicatrice el defecto por sí mismo.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones y modificación a la invención mostrada en las realizaciones específicas.

10 Por tanto, debe considerarse que las presentes realizaciones y ejemplos son ilustrativos y no restrictivos en todos los aspectos.

**REIVINDICACIONES**

1. Estructura de reparación tisular para su uso en el tratamiento de cualquier defecto tisular o para regenerar cualquier tejido *in vivo*, que comprende
- 5
- a) una membrana de colágeno libre de células y
- b) células madre adheridas a una superficie de dicha membrana,
- 10
- en la que la superficie es porosa de manera que las células madre pueden migrar al interior de la membrana y del tejido.
2. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana de colágeno es reabsorbible.
- 15
3. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana de colágeno tiene una superficie densa.
4. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana de colágeno es autóloga.
- 20
5. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana de colágeno es alogénica.
- 25
6. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana de colágeno comprende una combinación de colágeno de tipo I y colágeno de tipo III.
7. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana de colágeno comprende colágeno de tipo II.
- 30
8. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha estructura se puede implantar.
9. Estructura de reparación tisular para su uso según la reivindicación 4, en la que dichas células madre están parcialmente diferenciadas, o no diferenciadas.
- 35