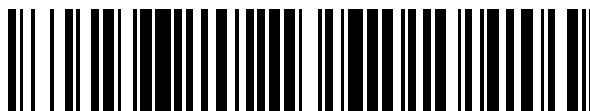


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 679**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 35/33 (2015.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/US2012/064101**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070880**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12846950 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2776556**

54 Título: **Fibroblastos dérmicos para el tratamiento de enfermedad discal degenerativa**

30 Prioridad:

09.11.2011 US 201161557479 P
21.08.2012 US 201261691391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

O'HEERON, PETE y
AN, HOWARD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 653 679 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

Fibroblastos dérmicos para el tratamiento de enfermedad discal degenerativa

5 CAMPO TÉCNICO

El campo de la presente invención incluye los campos de la medicina, cirugía, anatomía, biología, biología celular y/o biología molecular.

- 10 En ciertas realizaciones, el campo de la invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de afecciones médicas asociadas a parte(s) del cuerpo en necesidad de cartílago, tales como la columna vertebral o las articulaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los discos intervertebrales, que pueden denominarse fibrocartilago intervertebral, están situados entre vértebras adyacentes en la columna vertebral, y cada disco forma una articulación cartilaginosa para permitir el ligero movimiento de las vértebras, que actúan como un ligamento para mantener juntas las vértebras. Los discos intervertebrales comprenden placas de fibrocartilago que se corresponden con la forma de las superficies de la placa terminal de los cuerpos vertebrales. Los discos desempeñan una función considerable en el soporte de peso. Los discos intervertebrales comprenden un anillo fibroso externo que rodea el núcleo pulposo gelatinoso interno. El anillo fibroso se inserta en los bordes redondeados lisos en las superficies de placa terminal de los cuerpos vertebrales. El núcleo pulposo pone en contacto las placas de cartilago hialino, que están unidas a las superficies rugosas de los cuerpos vertebrales.

25

La enfermedad de los discos intervertebrales, que puede denominarse trastorno de los discos intervertebrales e incluye enfermedad degenerativa discal (EDD), es una afección médica en la que hay disfunción del disco, que incluye deterioro y/o hernia, por ejemplo. En la EDD, existe una deshidratación gradual del núcleo pulposo. Tras esto, las cargas normalmente absorbidas por el núcleo pulposo son en su lugar transferidas no uniformemente a través del anillo fibroso, que puede sufrir deterioro estructural progresivo. Los discos herniados (que pueden denominarse disco desplazado, hernia discal, o un abombamiento discal) se producen cuando el anillo fibroso se rompe debido a una lesión o debido al envejecimiento, tras lo que el núcleo pulposo puede empezar a sufrir prolapso a través del desgarró.

30

El documento US 2009/068270 A1 desvela el tratamiento de discos degenerados con células autólogas. Se necesitan en la materia métodos y composiciones que sean eficaces y tengan invasividad mínima y/o tiempo de preparación para tratar la enfermedad de los discos intervertebrales.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

40

La presente divulgación se refiere a sistemas, métodos y composiciones para el tratamiento de un individuo en necesidad de los mismos, que incluyen tratamiento de un individuo en necesidad de reparación de cartilago. La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para la reparación biológica de cualquier tipo de cartilago, que incluye cartilago intervertebral y articular, por ejemplo. En aspectos particulares, la presente invención se refiere a los campos de la reparación de cartilago, tal como reparación de cartilago articular. Otros aspectos descritos en el presente documento incluyen métodos de crecimiento, proliferación y/o diferenciación de células en células similares a condrocito bajo esfuerzo mecánico.

45

En ciertos aspectos, la invención genera tejido natural *in vivo* a partir de fibroblastos dérmicos humanos. Específicamente, la presente invención proporciona fibroblastos dérmicos para su uso en un método de tratamiento de un individuo en necesidad de reparación de cartilago, comprendiendo el método diferenciar fibroblastos dérmicos humanos en células similares a condrocito *in vivo* administrando fibroblastos dérmicos a una articulación de un individuo, en los que antes de la administración los fibroblastos dérmicos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos. También se describe en el presente documento un método de crecimiento y diferenciación de fibroblastos humanos en células similares a condrocito, por ejemplo. Las células pueden ser autólogas o alógenas o una mezcla de las mismas, en ciertas realizaciones.

50

La invención emplea la diferenciación de ciertas células en células similares a condrocito. Específicamente, los fibroblastos dérmicos humanos (FDH) se diferencian en células similares a condrocito en condiciones particulares.

55

La diferenciación de células en condrocitos o células similares a condrocito se produce *in vivo* tras la implantación.

60

Aspecto específicos descritos en el presente documento proporcionan un método para la regeneración *in vivo* de una articulación, tal como un disco intervertebral, codo, rodilla, hombro, cadera, articulación temporomandibular, etc.

En ciertas realizaciones, el cartílago que es el foco de la solicitud de la invención es cartílago de disco intervertebral.

- 5 En aspectos particulares de la invención, las células utilizadas en la invención se someten a deformación mecánica *in vivo* para la diferenciación condrogénica.

Es un objeto a modo de ejemplo de la presente divulgación proporcionar un método previsto para reparar un disco intervertebral degenerado, por ejemplo, restaurar la anatomía del disco intervertebral y mejorar su funcionamiento.

- 10 Aspectos particulares descritos en el presente documento proporcionan un método de reparación de disco dañado. En un aspecto descrito en el presente documento, existe un método de reparación de cartílago dañado en una articulación (tal como un disco intervertebral) de un individuo, que comprende administrar fibroblastos según la invención a la articulación respectiva (tal como disco intervertebral) del individuo. En aspectos específicos descritos en el presente documento, se administran fibroblastos al disco intervertebral en ausencia de quitar parte o todo el
15 disco degenerado.

Bajo esfuerzo mecánico, las células proporcionadas adquirirán las características de células de núcleo en la parte central y células de anillo en la periferia, por ejemplo. Pueden recogerse células de fibroblasto a modo de ejemplo de piel, tal como por una biopsia, por ejemplo.

- 20 En ciertos aspectos descritos en el presente documento, un individuo se provee de otra terapia, además de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, antes, durante y/o después de la administración de las células de fibroblasto, el individuo puede recibir uno o más antibióticos. Terapias posoperatorias a modo de ejemplo incluye fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), simples calmantes (analgésicos) y/o relajantes musculares
25 según se necesite, y puede ir seguido de una rehabilitación funcional posoperatoria, tal como después de la primera, segunda, tercera o más semana posoperatoria, por ejemplo. En aspectos específicos, el individuo puede proveerse de uno o más de un antibiótico, agente antifúngico o agente antiviral.

- 30 En ciertos aspectos de la invención, las células se diferencian en células de condrocito o células similares a condrocito, tales como en los que las células de condrocito o células similares a condrocito secretan una molécula seleccionada del grupo que consiste en agregano, colágeno de tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión a cartílago, perlecano, y combinaciones de los mismos. En casos particulares, las células se diferencian a partir de células de fibroblasto, y células de fibroblasto a modo de ejemplo incluyen fibroblastos dérmicos, fibroblastos de tendón, fibroblastos de ligamento, fibroblastos sinoviales, fibroblastos de prepucio, o una mezcla de los mismos.

- 35 En realizaciones específicas, no se proporcionan factores de crecimiento a los fibroblastos antes, durante o después de la administración *in vivo* al individuo en necesidad de los mismos, que incluye factores de crecimiento tales como proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2), BMP-4, BMP-6, BMP-7, proteína morfogénica derivada de cartílago (CDMP), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento de insulina uno (IGF-I), factor 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.

- 45 En el presente documento se describe además un kit que comprende fibroblastos que se alojan en uno o más recipientes adecuados. En aspecto específicos, el kit comprende además uno o más reactivos adecuados para potenciar la diferenciación *in vivo* de fibroblastos a condrocitos o células similares a condrocito. En algunos aspectos, el kit incluye uno o más aparatos para la administración de fibroblastos a un individuo.

- 50 En algunas realizaciones de la invención, existen fibroblastos dérmicos para su uso en métodos relacionados con la administración de fibroblastos a un sitio *in vivo* en un individuo en necesidad de los mismos. En realizaciones específicas, el sitio es *in vivo* y en necesidad de condrocitos, que incluye en necesidad de cartílago. Por ejemplo, un sitio en necesidad de condrocitos incluye articulaciones, por ejemplo articulaciones cartilaginosas (por ejemplo, vértebras). En algunas realizaciones, los fibroblastos se obtienen del individuo en necesidad de cartílago. En realizaciones específicas, los fibroblastos se administran a al menos un disco intervertebral en un individuo. En algunos casos, los fibroblastos se manipulan tras ser obtenidos, tanto si se obtienen como si no del individuo en
55 necesidad de los mismos o tanto si se obtienen como si no de una tercera parte o comercialmente, por ejemplo. Los fibroblastos pueden ser expandidos en cultivo. En ciertas realizaciones, los fibroblastos no se proveen de factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, antes o durante o tras la implantación en una vértebra.

- 60 En algunas realizaciones, existen tanto fibroblastos como células condrocíticas en el disco. En algunas

realizaciones, no todos los fibroblastos que se administran *in vivo* se diferenciarán a condrocitos en el disco, incluso los tejidos fibrosos que se producen en el disco son, sin embargo, útiles en mejorar la altura del disco y la función biomecánica.

5 En el presente documento se describe un método de diferenciación de fibroblastos dérmicos humanos en células similares a condrocito *in vivo*, que comprende la etapa de administrar fibroblastos a una articulación de un individuo, en el que antes de administrar los fibroblastos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos. En casos específicos, el individuo tiene enfermedad de los discos intervertebrales. En algunos casos, la articulación es un disco intervertebral.

10

En algunas realizaciones, algunos de los fibroblastos no diferenciados y células similares a condrocito diferenciadas en el disco se definen además como células que producen moléculas de matriz fibrosa, moléculas de matriz cartilaginosa, o ambas. En ciertos aspectos, las células similares a condrocito se definen además como células que producen moléculas de matriz, tales como colágeno I, colágeno II, proteoglicano, o una combinación de los mismos.

15 En realizaciones específicas, el colágeno comprende colágeno de tipo I y tipo II. En algunos casos, uno de los proteoglicanos es agreganos.

En casos particulares, los fibroblastos se administran entre discos intervertebrales. En ciertos casos, los fibroblastos se administran entre o en el núcleo pulposos y fisuras en el anillo fibroso interno. Los fibroblastos pueden administrarse

20

entre discos intervertebrales, que incluyen núcleo pulposos y fisuras en el anillo fibroso interno, por ejemplo. Algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento incluyen obtener fibroblastos del individuo. La obtención puede englobar la eliminación de fibroblastos de un cuerpo o puede englobar recuperar los fibroblastos ya obtenidos, tales como de una tercera parte, que incluye comercialmente, o de almacenamiento, por ejemplo. En

25 ciertos aspectos, los fibroblastos se expanden, por ejemplo durante al menos un día. En algunos casos, los fibroblastos obtenidos se someten a pases, por ejemplo, más de una vez. En aspectos particulares, los fibroblastos tanto se expanden como se someten a pases.

En el presente documento se describe un método de producción de tejido fibroso y/o tejido condrocítico en una articulación de un individuo, que comprende la etapa de administrar fibroblastos a la articulación, en el que los fibroblastos no han sido expuestos a factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, *in vitro* antes de o durante o tras la administración a la articulación. En un aspecto específico, el tejido fibroso y/o condrocítico comprende células que tienen marcadores bioquímicos particulares, tales como tanto colágeno de tipo I como de tipo II, y/o varios proteoglicanos encontrados en tejidos cartilagosos y

35

fibrosos, por ejemplo. En ciertas realizaciones de la invención, la presencia de los fibroblastos y/o la muerte de los fibroblastos antes y/o después de la administración a la articulación del individuo desencadenan la respuesta de una o más células. En casos específicos, la presencia de los fibroblastos y/o la muerte de los fibroblastos desencadenan la respuesta de otras células en la articulación, y las otras células pueden ser de cualquier tipo, que incluye las células endógenas del individuo, tales como condrocitos, fibroblastos, células madre de disco, etc. En aspectos particulares, la respuesta de células endógenas incluye la estimulación del crecimiento, por ejemplo, ya que al menos algunos fibroblastos mueren en la articulación. Así, en realizaciones específicas, la mera presencia de los fibroblastos y/o la liberación de factores intracelulares tras la muerte de células pueden estimular una respuesta de crecimiento celular de células existentes en el disco. En casos particulares, la respuesta de crecimiento celular produce el re-

45

crecimiento del disco (o la reparación de la articulación). En realizaciones particulares de la invención, como resultado indirecto o directo de la administración de los fibroblastos a la articulación, puede formarse tejido cicatricial en la articulación. En al menos casos específicos, tal formación de tejido cicatricial es beneficiosa para la articulación, por ejemplo, cuando la articulación es un disco, proporcionando estabilidad, resistencia, amortiguamiento, sellado de fisura(s) anular(es), etc.

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "un" o "una" puede significar uno o más. Como se usa en el presente documento en la(s) reivindicación (reivindicaciones), cuando se usa conjuntamente con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

60 En realizaciones específicas, aspectos de la invención pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" uno o

más elementos o etapas de la invención, por ejemplo.

Se contempla que cualquier método o composición descrito en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito en el presente documento.

5

El término "células similares a condrocito", como se usa en el presente documento, se refiere a células que no son condrocitos primarios, pero derivan de fibroblastos, por ejemplo. Estas células similares a condrocito tienen un fenotipo de condrocito (células de cartílago) que incluyen una forma de condrocitos (células poligonales y/o romboidales, por ejemplo) y/o son capaces de agregarse y producir componentes de matriz de cartílago, tales como proteoglicano sulfatado y colágeno de tipo II, por ejemplo. Así, marcadores a modo de ejemplo de células similares a condrocito incluyen uno o más de agregano, que es un sulfato de condroitina y el proteoglicano de queratán sulfato, colágeno de tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión a cartílago, y perlecán, que es un proteoglicano de heparán sulfato, por ejemplo.

10

15 El término "articulación", como se usa en el presente documento, se refiere a una región en el cuerpo en la que se unen dos huesos de un esqueleto.

Aunque cualquier tejido puede ser reparado al menos en parte por los métodos descritos en el presente documento, que incluye cualquier tejido de cartílago, en una realización a modo de ejemplo particular, se repara cartílago de disco intervertebral o cartílago de articulación. Una realización general de la invención es usar FDH como fuente de células para manipular nuevo cartílago para el disco intervertebral, debido a que estas células son fáciles de recoger y cultivar. La invención engloba la diferenciación de estas células en células similares a condrocito.

20

I. Células utilizadas en la invención

25

En ciertos aspectos descritos en el presente documento, puede emplearse cualquier célula, mientras que la célula sea capaz de diferenciarse en un condrocito o célula similar a condrocito. Sin embargo, en aspectos específicos, la célula es una célula de fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, fibroblasto de tendón, fibroblasto de ligamento, o fibroblasto sinovial, por ejemplo. Pueden utilizarse células autólogas, aunque en realizaciones alternativas se emplean células alogénicas; en realizaciones específicas, las células alogénicas han sido ensayadas para enfermedad y se consideran adecuadas para transmisión humana. En ciertos aspectos de la invención, la célula o células son autólogas, aunque en realizaciones alternativas las células son alogénicas. En casos en los que las células no sean autólogas, antes de uso en la invención, las células pueden procesarse por medios estándar en la materia para eliminar materiales potencialmente peligrosos, patógenos, etc.

30

La lógica para usar FDH autólogas como medio de fuente de células se deduce de lo siguiente: 1) los FDH pueden ser no invasivamente recogidos de una biopsia en sacabocados de solo un espécimen de piel circular de 3,0 mm de diámetro, por ejemplo; 2) no existe el riesgo de contaminación de otro donante (tal como virus de la hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, etc.); y 3) los FDH pueden expandirse fácilmente en cultivo y diferenciarse en células similares a condrocito en condiciones de cultivo particulares. Podrían usarse otras poblaciones de fibroblastos, tales como tendón o ligamento, por ejemplo. En una realización, se prefieren fibroblastos autólogos. Algunos aspectos de la invención pueden emplear FDH comprados comercialmente, tales como de laboratorios (tales como Cascade Biologics). Las células pueden ser FDH adultos o FDH neonatales. Los fibroblastos de prepucio neonatal son una fuente muy conveniente de células, por ejemplo.

35

Como se describe en el presente documento, se recogen FDH autólogos de biopsia en sacabocados de tejido de piel (6 mm) del individuo. En el laboratorio, pueden diseccionarse la grasa subcutánea y dermis profunda con tijeras. El tejido restante puede ser troceado e incubado durante la noche en 0,25 % de tripsina a 4 °C. Entonces, pueden separarse fragmentos dérmicos y epidérmicos, tal como separarse mecánicamente. Los fragmentos dérmicos de la biopsia pueden ser troceados y los trozos pueden usarse para iniciar cultivos de explante. Los fibroblastos recogidos de los explantes pueden cultivarse en MEM de Dulbecco (DMEM) con 10 % de suero de ternero a 37 °C en 8 % de CO₂. Estas células pueden ser expandidas antes de ser diferenciadas en condrocitos, en aspectos particulares.

40

55 En aspectos particulares, la diferenciación similar a condrocito de fibroblastos dérmicos humanos puede facilitarse empleando deformación mecánica. En realizaciones específicas de la invención, tras la diferenciación de fibroblastos, las células resultantes comprenden *in vivo* la expresión de ciertos marcadores bioquímicos indicativos de colágeno de tipo I y II y proteoglicanos.

60 En aspectos particulares, puede producirse diferenciación similar a condrocito de fibroblastos dérmicos humanos *in*

vivo, en la que el micro-entorno del disco intervertebral es propicio para la diferenciación condrocítica. La carga hidrostática, hipoxia, interacción célula con célula con células condrocíticas residentes en el disco y otros entornos bioquímicos en el disco intervertebral pueden facilitar la diferenciación de fibroblasto a células condrocíticas, en realizaciones particulares. En realizaciones específicas de la invención, las células en el disco intervertebral tras el trasplante de células serán una combinación de células fibrocíticas y condrocíticas que producen tanto tejidos fibrosos como condrocíticos con marcadores bioquímicos de tanto colágeno de tipo I como de tipo II y/o varios proteoglicanos encontrados en tejidos cartilagosos y fibrosos.

II. Aspectos de métodos a modo de ejemplo de la divulgación, que incluyen métodos de reparación de cartilago dañado

La presente invención se refiere a fibroblastos dérmicos para su uso en un método de tratamiento de un individuo en necesidad de reparación de cartilago, comprendiendo el método diferenciar fibroblastos dérmicos humanos en células similares a condrocito *in vivo* administrando fibroblastos dérmicos a una articulación de un individuo, en la que antes de la administración los fibroblastos dérmicos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos.

En el presente documento se describen métodos de diferenciación de células, que incluyen fibroblastos (por ejemplo, humanos) en células similares a condrocito *in vivo*. Los métodos pueden comprender la etapa de administrar fibroblastos a una articulación de un individuo, en los que antes de la administración de los fibroblastos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos. Los fibroblastos pueden o pueden no exponerse a condiciones hipóxicas antes de la administración *in vivo*.

El esfuerzo / deformación mecánica son factores importantes para la condrogénesis. El método descrito en el presente documento usa deformaciones mecánicas *in vivo* y, en aspectos particulares, usa presión inherente de la columna vertebral para proporcionar deformación mecánica. En algunos aspectos, el método se produce en ausencia de otros tipos de presión, que incluye presión hidrostática intermitente, tensión por fluidos de cizallamiento, etc. En algunos aspectos, el método se produce en ausencia de presión distinta de presión espinal inherente, tensión de bajo oxígeno, factores de crecimiento, cultivo en una matriz, etc. En algunos aspectos, la carga de presión de la columna vertebral se emplea para inducir la diferenciación de fibroblastos a otras células.

Pueden obtenerse fibroblastos de fuente de donante (alógenos) o biopsia de piel autóloga. Puede emplearse aislamiento de células de la piel y expandirlas en cultivo, y en ciertos casos las células no se manipulan o se manipulan mínimamente (por ejemplo, se exponen a suero, antibióticos, etc.). Estas células pueden ponerse en un dispositivo (por ejemplo, una jeringa que tiene células resuspendas en medio de un cultivo de monocapa) e inyectarse en el individuo. El suero que se usa para alimentar las células para la multiplicación puede lavarse con medios tales como DMEM para evitar que cualquier suero extraño se inyecte en el individuo. En aspectos de este sistema, no se emplea matriz, que no incluye alginato. En aspectos descritos en el presente documento, se inyectan las células solo (o una cantidad mínima de fluido para suspender las células para inyección) y no se inyecta medio, por ejemplo. La suspensión de fluido que contiene las células puede comprender tampón, aminoácidos, sales, glucosa y/o vitaminas que son componentes de DMEM. Moléculas de matriz a modo de ejemplo para la manipulación de células que no son empleadas en etapas de método descritas en el presente documento incluyen polímeros (incluyendo PGA, PLGA y PCL, por ejemplo); hidrogeles naturales tales como colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa, quitosano, por ejemplo; e hidrogeles sintéticos tales como PEO, PVA, PAA, etc.).

En aspectos específicos de la invención, se inducen células para experimentar diferenciación en condrocitos o células similares a condrocito. Tal diferenciación se produce posterior a la administración *in vivo*. En realizaciones específicas de la invención, el esfuerzo mecánico estimula la diferenciación condrogénica de FDH.

En aspectos de la invención, puede mejorarse la biomecánica de la matriz y biología del disco aumentando el tamaño del disco, contenido de colágeno y/o nivel de ciertas moléculas biológicas. Las células en los discos, en tanto que no se fuguen del espacio y no mueran, producen moléculas de matriz tales como colágeno, proteoglicano, etc., en realizaciones de la invención. En ciertos aspectos, las moléculas biológicas proporcionan propiedades biomecánicas beneficiosas, tales como resistencia a las cargas de compresión/tensión. Las células sometidas a carga con posición normal/caminar/flexión de la columna vertebral se diferenciarán en células cartilaginosas o células similares a cartilaginosas *in vivo*. Tanto los fibroblastos como las células condrocíticas en el disco pueden producir matriz fibrosa y/o de cartilago o tejido que puede mejorar la altura y volumen del disco intervertebral y potenciar las propiedades biomecánicas.

En algunos métodos descritos en el presente documento, tras obtenerse las células de fibroblasto, puede expandirse

el número de células, aunque en realizaciones alternativas los fibroblastos se proporcionan *in vivo* a un individuo en necesidad de las mismas en ausencia de cualquier expansión previa. El experto reconoce que las células en cultivo requieren nutrición y las células pueden ser alimentadas con medios, tales como FBS (suero bovino fetal). Puede prevenirse la contaminación o infección (por ejemplo, añadiendo antibióticos), en algunos casos. Antes de la inyección de las células al individuo, las células se lavan con medio DMEM para eliminar FBS y antibióticos, por ejemplo, y las células en suspensión se usarán para inyección. La suspensión de fluido puede contener una pequeña cantidad de medios que incluyen tampón, aminoácidos, sales, glucosa y/o vitaminas, por ejemplo. El crecimiento *in vitro* de las células de fibroblasto puede comprender al menos uno o más días para el crecimiento antes del uso *in vivo*. En ciertos casos, las células pueden comprobarse o monitorizarse para garantizar que al menos algunas de las células estén dividiéndose. Pueden eliminarse las células que no están dividiéndose.

En ciertos aspectos, mejora la altura del disco y/o ciertos marcadores bioquímicos se presentan en las células implantadas. La altura del disco puede medirse usando simples radiografías, comparando antes y después de la terapia, por ejemplo. En al menos casos específicos, también puede emplearse imagen por resonancia magnética (IRM), ensayo de marcador bioquímico y/o histología. La restauración de la altura del disco mejora el espacio para los nervios espinales que están cruzando la columna vertebral, y tiene un beneficio indirecto de esta forma, además de mejorar la biomecánica del disco y la biología del área. Cambios histológicos tras el trasplante de los fibroblastos pueden mostrar una combinación de células fibrosas y cartilaginosas y matriz con elevada altura de disco debido a tejido más abundante, en realizaciones particulares.

En algunos aspectos, se inyectan células de fibroblasto entre las vértebras o discos intervertebrales, y las células en el núcleo pulposo pueden migrar a las fisuras en el anillo asociado a la degeneración del disco. Estas células potenciarán la formación de matriz en tanto núcleo pulposo como anillo fibroso para ayudar en la reparación y regeneración de tejido. Las células en el núcleo pulposo se diferenciarán más hacia condrocíticas y las células en el anillo fibroso serán más fibrocíticas debido a entornos mecánicos y bioquímicos del núcleo pulposo y anillo fibroso.

En algunos aspectos, la diferenciación de las células de fibroblasto no empieza hasta la implantación *in vivo* y no todas de las células trasplantadas pueden diferenciarse en células condrocíticas debido a los entornos biomecánicos y bioquímicos variables.

En aspectos descritos en el presente documento, se obtienen fibroblastos, por ejemplo del individuo que está tratándose, se obtienen de otro individuo (incluyendo un cadáver o donante vivo, por ejemplo), o se obtienen comercialmente. Puede tomarse una biopsia de piel y en algunas realizaciones puede manipularse la biopsia de piel. Por ejemplo, puede digerirse el tejido de piel durante la noche para conseguir fibroblastos, cultivar las células para expandirlas, y proporcionarlas al individuo que incluye inyectarlas al individuo. Antes de la administración al individuo, las células pueden ser sometidas a pases una o más veces dependiendo del número de células necesarias, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces, por ejemplo. La realización de pases puede producirse durante el transcurso de uno o más días, que incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o 1, 2, 3, 4, o más semanas, por ejemplo. En algunas realizaciones, las células se someten a pases durante 5-7 días, por ejemplo.

En aspectos de la invención, la enfermedad de los discos intervertebrales se previene proporcionando fibroblastos *in vivo* a un individuo en necesidad de los mismos, que incluye un individuo susceptible a la enfermedad, por ejemplo un individuo en envejecimiento. En algunas realizaciones, el individuo es un adulto. Un individuo en riesgo de enfermedad incluye un atleta (profesional o aficionado), fumadores, individuos obesos, y/o aquellos cuyas ocupaciones o estilo de vida requieren trabajo físico, que incluye levantamiento excesivo, por ejemplo.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe ser apreciado por aquellos expertos en la materia que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y así puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

EJEMPLO 1

INYECCIÓN DE FIBROBLASTOS Y DIFERENCIACIÓN *IN VIVO*

En aspectos de la invención descritos en el presente documento, se administran fibroblastos a vértebras de mamífero para mejorar la degeneración de discos intervertebrales, por ejemplo. En algunos aspectos, se administran fibroblastos a vértebras de mamífero para inducir la diferenciación de condrocitos o para continuar la diferenciación

de condrocitos.

- Se empleó un modelo de conejo que implicaba perforar el anillo, que reduce la altura del disco (debido a la pérdida de matriz y degeneración, por ejemplo) hasta aproximadamente el 70 % de la altura normal aproximadamente 4 semanas después de la lesión. El trasplante de células en este modelo se realiza 4 semanas tras la perforación del anillo, y la altura del disco aumenta gradualmente, por ejemplo durante las siguientes 3-4 semanas. Las células que se inyectaron están contenidas en el disco y están vivas para producir más matriz (tejido fibroso y cartilaginoso) para aumentar la altura del disco. Cuanta más matriz y aumento de la altura de disco se produzca, mejor función biomecánica y menos dolor para el individuo. En realizaciones específicas, por ejemplo basadas en IRM, el tejido regenerado es principalmente fibrocartílago en vez de cartílago de tipo hialino con altos proteoglicanos y agua. En ciertos aspectos, el análisis bioquímico muestra que se expresa colágeno de tipo I y tipo II, que muestra que hay componente cartilaginoso, que indica que al menos en algunos casos hay tejido cartilaginoso (si fuera todo fibroso (tejido cicatricial), el colágeno de tipo I sin colágeno de tipo II se expresaría principalmente, pero el tejido cartilaginoso expresaría colágeno de tipo II).
- 15 Tras la manipulación del modelo de conejo anteriormente referenciado, la altura de disco aumenta tras el trasplante de los fibroblastos.

REIVINDICACIONES

1. Fibroblastos dérmicos para su uso en un método de tratamiento de un individuo en necesidad de reparación de cartílago, comprendiendo el método diferenciar fibroblastos dérmicos humanos en células similares a condrocito *in vivo* administrando fibroblastos dérmicos a una articulación de un individuo, en los que antes de la administración los fibroblastos dérmicos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos.
2. Los fibroblastos para el uso de la reivindicación 1, donde:
- (a) el individuo tiene enfermedad de los discos intervertebrales; y/o
(b) la articulación es un disco intervertebral.
3. Los fibroblastos dérmicos para el uso de la reivindicación 1, donde que los fibroblastos dérmicos se administran entre discos intervertebrales, opcionalmente en los que los fibroblastos dérmicos se administran entre o en el núcleo pulposo y las fisuras en el anillo fibroso interno.
4. Los fibroblastos dérmicos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los fibroblastos dérmicos se obtienen del individuo.
5. Los fibroblastos dérmicos para el uso de la reivindicación 4, donde:
- (a) los fibroblastos dérmicos obtenidos se expanden, opcionalmente durante al menos un día; y/o
(b) los fibroblastos dérmicos obtenidos se someten a pases, opcionalmente más de una vez.
6. Los fibroblastos dérmicos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde tras la administración de los fibroblastos dérmicos a la articulación del individuo mueren una pluralidad de fibroblastos dérmicos.
7. Los fibroblastos dérmicos para el uso de la reivindicación 6, donde la muerte de los fibroblastos dérmicos produce una respuesta celular de células articulares endógenas del individuo opcionalmente donde la respuesta celular comprende la estimulación del crecimiento de las células articulares endógenas del individuo.
8. Los fibroblastos dérmicos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde tras la administración de los fibroblastos dérmicos a la articulación, los fibroblastos dérmicos desencadenan una respuesta celular de las células articulares endógenas del individuo, opcionalmente donde la respuesta celular comprende la estimulación del crecimiento de las células articulares endógenas del individuo.
9. Los fibroblastos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la administración de los fibroblastos a la articulación del individuo produce indirectamente o directamente el desarrollo de tejido cicatricial en la articulación.