

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 292**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2012 PCT/IB2012/053512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13008174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2012 E 12748795 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2732030**

54 Título: **Preparación de banco de células parenterales a partir de tejido fetal**

30 Prioridad:

11.07.2011 EP 11173452

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
VAUDOIS (CHUV) (100.0%)
Rue du Bugnon 21
1011 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

LAURENT-APPLEGATE, LEE ANN

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 654 292 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).

PREPARACIÓN DE BANCO DE CÉLULAS PARENTERALES A PARTIR DE TEJIDO FETAL**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de preparación *in vitro* de un banco de células parenterales (PCB) a partir de tejido fetal que consiste en tejido epifisario fetal, tejido de tendón de Aquiles fetal y tejido cutáneo fetal, usando una selección mecánica rápida de cultivo celular primario de un tipo de célula que va a usarse en métodos para la reparación de heridas y tejidos.

Antecedentes de la invención

La terapia celular está convirtiéndose en una adición interesante para terapias médicas para la reparación, restauración o mejora de la función de tejidos y particularmente en combinación con técnicas quirúrgicas tradicionales. Algunas opciones de células son más adaptables a la terapia celular en pacientes. Las opciones de tejidos a partir de animales y seres humanos en todas las edades de desarrollo pueden evaluarse con respecto a sus ventajas y desventajas para cada tipo de célula final. Las restricciones actuales para terapias basadas en células humanas se han relacionado con limitaciones tecnológicas con respecto a la capacidad de proliferación celular (condiciones de cultivo sencillas), mantenimiento de fenotipo diferenciado para cultivo de células humanas primario, transmisión de enfermedades transmisibles y la sistematicidad y estabilidad de la población de células seleccionada dependiendo de su procedimiento de aislamiento. Las células fetales primarias cultivadas a partir de una donación de órgano cumplen los aspectos técnicos exigentes y rigurosos para el desarrollo de productos terapéuticos. Pueden desarrollarse bancos de células maestros y de trabajo a partir de una donación de órgano fetal en periodos breves de tiempo y pueden realizarse pruebas de seguridad en todos los estadios del establecimiento del banco de células.

Se ha propuesto la terapia celular como alternativa menos invasiva o terapia combinada para intervenciones quirúrgicas e ingeniería tisular de tejidos específicos. Se han investigado varios tipos de células para usarse en terapia celular: células madre embrionarias (ES), células de cordón umbilical, células fetales y células madre de adulto (a partir de células madre hematopoyéticas de médula ósea o HSC y células madre de médula o MSC) junto con tejido adiposo, plaquetas, placenta y células de líquido amniótico. Tal como para cualquier aplicación en ingeniería tisular, el origen y tipo de células son aspectos esenciales. Cada tipo de célula requiere diferentes métodos para manipular sus capacidades de diferenciación y de autorrenovación para terapias específicas con diversas ventajas y desventajas.

Se han usado ampliamente células fetales en biología y medicina durante muchos años sin gran conocimiento público en cuanto a su importancia, especialmente en el desarrollo de vacunas necesarias. Las células fetales son células diferenciadas con altas propiedades de expansión, regeneración y bajas propiedades inmunogénicas. Pueden aislarse a partir de tejidos fetales, que siguen al estadio embrionario tras 9 semanas de desarrollo. Las células de piel fetales ofrecen una solución ideal para ingeniería tisular y terapia celular eficaz y segura por varios motivos, incluyendo; a) capacidad de expansión celular a partir de una donación de órgano; b) requisitos de crecimiento celular mínimos; c) adaptación a biomateriales para su administración; y, d) resistencia a estrés oxidativo. Las células de piel fetales tienen amplias posibilidades de expansión ya que sólo requieren una donación de órgano (1-4 cm² de tejido) para crear suficientes células congeladas como para producir un banco que puede proporcionar cientos de miles de tratamientos (es decir, para piel, pueden producirse más de 35 billones de constructos de piel fetales de 9 x 12 cm a partir de un banco de células dedicado). Además, los requisitos de cultivo celular son mínimos en comparación con tipos de células madre o mesenquimatosas. Dado que las células de piel fetales ya están diferenciadas y no necesitan dirigirse o alterarse, no se necesita para el cultivo celular y la expansión, el enorme número de factores de crecimiento adicionales normalmente necesarios. Para la producción de bancos de células, una cuidadosa selección de un donante y un extenso examen de células tanto de donante como en cultivo para evitar enfermedades virales, fúngicas o bacterianas transmisibles proporcionan un uso seguro y protegido de células fetales para uso terapéutico. Además, las células fetales, a diferencia de las células de recién nacido, de joven o de adulto se adaptan particularmente bien a biomateriales, permitiendo una administración eficaz y sencilla al paciente. Se ha demostrado que las células de donantes (de recién nacidos a adultos) no pueden realizar una integración eficaz en diversos biomateriales y, de hecho, algunos biomateriales son tóxicos para la célula. Es cierto que el andamiaje es muy importante para la ingeniería tisular, pero el tipo de célula es lo más probablemente el factor limitante. Para procesar un producto final para administración clínica, tanto la distribución homóloga como la rapidez de desarrollo del producto final son ventajas principales significativas. Cuando se necesitan periodos de cultivo prolongados tal como para injerto autólogo o para los productos comercialmente disponibles hasta la fecha, existe un riesgo aumentado no despreciable de contaminación. También es importante disponer de un procedimiento que se repita de manera sistemática y fácil. Desarrollando bancos de células sistemáticos con células fetales, pueden eliminarse muchos de los factores de riesgo para proporcionar terapias basadas en células humanas seguras y eficaces a pie de cama.

Para productos basados en células se recomiendan elementos clave incluyendo identidad, pureza, esterilidad,

estabilidad, seguridad y eficacia. En conjunto, los nuevos reglamentos imponen criterios estrictos para la producción y el entorno usado para la producción de productos basados en células que van a usarse en ensayos clínicos y tratamientos. Las restricciones actuales para terapias basadas en célula humanas se han relacionado con limitaciones tecnológicas con respecto a la capacidad de proliferación celular (condiciones de cultivo sencillas), mantenimiento de fenotipo diferenciado para cultivo de células humanas primario, transmisión de enfermedades transmisibles y la sistematicidad y estabilidad de la población de células seleccionada dependiendo de su procedimiento de aislamiento. Las células fetales primarias cultivadas a partir de una donación de órgano cumplen los aspectos técnicos exigentes y rigurosos para el desarrollo de productos terapéuticos. Pueden desarrollarse bancos de células maestros y de trabajo a partir de una donación de órgano fetal en periodos breves de tiempo y pueden realizarse pruebas de seguridad en todos los estadios del establecimiento del banco de células. Para uso terapéutico, pueden usarse células fetales hasta dos tercios de su vida útil en un procedimiento de aumento a escala y se garantiza la sistematicidad para varias propiedades biológicas incluyendo concentración de proteínas, expresión génica y actividad biológica.

La manipulación relativamente sencilla de células fetales, en relación con su recogida, expansión en cultivo y almacenamiento, ha convertido a las células fetales en una opción atractiva para terapia celular. Al contrario que las células ES, las células fetales no forman tumores y parecen carecer de inmunogenicidad cuando se trasplantan. A diferencia de las células madre mesenquimatosas hasta la fecha, las células fetales no requieren capas de alimentación para el crecimiento o factores de crecimiento específicos para su diferenciación. Una donación de órgano puede producir un banco de células maestro (MCB) sistemático que estará disponible durante cientos de miles de tratamientos de pacientes. El banco de células sistemático totalmente definido puede someterse a ensayo fácilmente para determinar la seguridad con respecto a cualquier posible virus y patógeno en paralelo con la donación de órgano original en la que se realizaron serología y patología.

Cultivos primarios de células diferenciadas fetales a partir de tejidos específicos tales como cartílago, tendón y piel de los que pueden desarrollarse fuentes de células específicas incluyendo condrocitos (condroprogenitores), progenitores de fibroblastos de piel y progenitores de tendones determinan la calidad del banco de células clínico desarrollado. Está bien aceptado que el tratamiento inicial del tejido es de principal importancia para las propiedades fisiológicas de las células producidas a partir del mismo. El estado de la técnica de rutina en el cultivo primario es digerir de manera enzimática los pequeños fragmentos de tejido para liberar todas las células vivas para el cultivo celular. Esto se usa particularmente para tejidos "duros", pero también para tejidos blandos, en los que de manera rutinaria se usan múltiples etapas de digestión. Al hacer esto, se libera una población de células completamente diferente y se cultiva en los cultivos celulares primario y secundario (Carrascosa A, Audi L, Ballabriga A *Pediatric Research* 19:720-727, 1985; Roche S *et al*, *Biomaterials* 22: 9-18, 2001; Bae H. *et al.*, *The Spine Journal* Vol. 8, n.º 5, páginas 92S-93S, 2008; Reginato A.M. *et al.*, *Arthritis and Rheumatism*, vol. 37, n.º 9, 1994).

Sin embargo, también se sabe que el tratamiento enzimático provoca faltas de sistematicidad, desarrolla poblaciones de células con diferentes morfologías, propiedades fisiológicas, estabilidad y función (Díaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan P, Nestic, Trub T, Varlet P-M *J Cellular Physiol* 202:731-742, 2005).

La naturaleza avascular, aneural y alifática del cartílago articular ha hecho que la reparación de este tejido suponga un desafío tanto para cirujanos como para profesionales de la ingeniería tisular. Un método de referencia para estrategias terapéuticas osteocondrales, especialmente dado que la elección de la fuente de células sigue siendo una cuestión fundamental y controvertida, está lejos de determinarse. Hasta la fecha, las células estromales mesenquimatosas (MSC) del adulto son la fuente de células más usada, a pesar de preocupaciones de homogeneidad fenotípica, fiabilidad y estabilidad.

Se necesita mejorar el tratamiento de defectos osteoartrotríticos ya que hasta la fecha no existe ninguna solución terapéutica satisfactoria. Resulta especialmente crucial desarrollar nuevas soluciones para evitar la degeneración prematura del cartílago para evitar la artroplastia total. El desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas asistidas por células se basa en un producto de banco de células definido que puede cumplir los requisitos de preparación de agentes terapéuticos rigurosos.

Por tanto, todavía existe una necesidad de desarrollar métodos para producir nuevos tejidos tales como tendón, cartílago, otros tejidos musculoesqueléticos, y piel, para su uso en estrategias terapéuticas. Más específicamente, existe una necesidad de desarrollar bancos de células que proporcionen una población de células más estable y uniforme y de encontrar una fuente apropiada de células, que no corra el riesgo de desencadenar una respuesta inmunitaria, y que no sea portadora de ningún agente infeccioso.

Sumario de la invención

Para resolver el problema identificado anteriormente, los solicitantes han establecido un método no enzimático para liberar mecánicamente y rápidamente poblaciones de células adherentes tempranas que definen las características de un establecimiento de banco de células parenterales (PCB). En algunas realizaciones, las células primarias diferenciadas proceden de tejido cartilaginoso específico, tejido tendinoso específico y tejido cutáneo específico. Para un experto en la técnica, otras realizaciones pueden incluir células primarias diferenciadas de piel y tejidos

musculoesqueléticos tales como tendón, hueso, músculo y disco intervertebral. El desarrollo del PCB permite lograr un establecimiento de banco de células adicional sistemático y estable.

5 Específicamente, en una realización la presente invención proporciona un método no enzimático *in vitro* para el aislamiento, la expansión y el desarrollo de células fetales seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos epifisarios fetales, tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel fetales, que comprende las etapas de:

10 a) usar una muestra fetal seleccionada de cartílago fetal cubital que comprende condrocitos epifisarios fetales; tendón de Aquiles fetal que comprende tenocitos del tendón de Aquiles fetales; o piel abdominal fetal que comprende fibroblastos de piel fetales;

15 b) microdisecar mecánicamente y dispersar dicha muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal y permitir la unión de la muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal microdisecada dentro de muescas de superficie ranurada con bisturí;

20 c) cultivar dicha muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal *in vitro* en condiciones en las que dichos condrocitos epifisarios fetales, tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel abdominal fetales proliferan,

d) seleccionar y aislar primeras poblaciones celulares de condrocitos epifisarios fetales adherentes, primeras poblaciones celulares de tenocitos del tendón de Aquiles adherentes y primeras poblaciones celulares de fibroblastos de piel fetales adherentes a partir de la misma.

25 En una realización del método de la presente invención, la selección y el aislamiento de primeras poblaciones de células adherentes se realizan tras 5-7 días de crecimiento.

30 En otra realización, la presente invención proporciona células fetales obtenidas mediante el método no enzimático de la invención, tales como línea celular de condrocitos epifisarios fetales que tiene la designación FE002-Cart y depositada con el número de registro ECACC 12070303-FE002-Cart, línea celular de tenocitos del tendón de Aquiles fetales que tiene la designación FE002-Ten y depositada con el número de registro ECACC 12070302-FE002-Ten y línea celular de fibroblastos de piel fetales que tiene la designación FE002-SK2 y depositada con el número de registro ECACC 12070301-SK2.

35 En otra realización, la presente invención proporciona un uso de células fetales obtenidas mediante el método de la presente invención para la producción de nuevo tejido cartilaginoso y/o constructos tridimensionales, nuevo tejido tendinoso y/o constructos tridimensionales, nuevo tejido cutáneo y/o constructos tridimensionales, usando las células cartilaginosas, tendinosas o de piel diferenciadas integradas en diversas matrices.

40 En otra realización, la presente invención proporciona las células fetales obtenidas mediante el método de la presente invención para su uso como agente terapéutico.

45 En otra realización, la presente invención proporciona células fetales obtenidas mediante el método de la presente invención para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido osteocondral y tejido musculoesquelético, para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido tendinoso y tejido musculoesquelético, y para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido cutáneo y para el tratamiento de quemaduras, heridas y estado fibrótico.

50 En otra realización, la presente invención proporciona células fetales obtenidas mediante el método de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades o defectos osteocondrales, artritis y enfermedades musculoesqueléticas; para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas y tendinopatías; para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades de la piel.

55 En una realización adicional de la presente invención se proporciona un método de examen para el desarrollo de agentes terapéuticos y/o dispositivos médicos para el tratamiento de defectos osteocondrales artríticos, reparación de cartílagos, reparación de tendones, reparación de tejido musculoesquelético y reparación de la piel, que comprende el uso de condrocitos epifisarios fetales (FEC), tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención.

60 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra biopsia de tejido para comenzar la producción de cultivo de células parenterales para progenitores de piel fetales y selección de células en el día 4 mostrando la sistematicidad.

65 La figura 2 muestra el crecimiento celular de progenitores de piel fetales tras la siembra de baja densidad (~2000 células/cm²) y recuperación de reservas madre de células congeladas en el día 6 y 12 mostrando una alta

estabilidad, sistematicidad y función mantenida.

5 La figura 3 muestra diferencias morfológicas y de crecimiento de la selección de población celular si el tejido se digiere de manera enzimática para preparar bancos de células parenterales y la falta de sistematicidad de la población celular.

10 La figura 4 muestra biopsia de tejido para comenzar la producción de banco de células parenterales para progenitores de tendones fetales (tenocitos del tendón de Aquiles fetales) y la selección de células en el día 4 mostrando la sistematicidad.

La figura 5 muestra el crecimiento celular de progenitores de tendones fetales tras la siembra de baja densidad (~2000 células/cm²) y recuperación de reservas madre de células congeladas en el día 0, 3, 7 y 10 mostrando una alta estabilidad, sistematicidad y función mantenida.

15 La figura 6 muestra análisis de FACS y características de deposición en matriz 3D para progenitores de tendones fetales.

20 La figura 7 muestra el procesamiento de tejido de epífisis cubital proximal para comenzar la producción de banco de células parenterales para condroprogenitores fetales (condrocitos epifisarios fetales) y la selección de células en el día 6 mostrando la sistematicidad.

25 La figura 8 muestra el crecimiento celular de condroprogenitores fetales (condrocitos epifisarios fetales) tras la siembra de baja densidad (~2000 células/cm²) y recuperación de reservas madre de células congeladas en el día 6 y 12 mostrando una alta estabilidad, sistematicidad y función mantenida.

La figura 9 muestra análisis de FACS y características de deposición en matriz 3D para condroprogenitores fetales (condrocitos epifisarios fetales).

30 La figura 10 muestra la expansión de células progenitoras de células fetales sobre plástico de cultivo tisular dirigido a lo largo de placas ranuradas de manera mecánica.

La figura 11 muestra un rápido desarrollo de bancos de células parenterales clínicos usando una preparación no enzimática de tejido.

35 Descripción detallada de la invención

Aunque en la práctica o pruebas de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. Las publicaciones y solicitudes comentadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a tal publicación debido a invención previa. Además, los materiales, métodos y ejemplos sólo son ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

45 En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece el objeto en el presente documento. Tal como se usan en el presente documento, se proporcionan las siguientes definiciones con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención.

Tal como se usan en el presente documento, “un” o “una” significan “al menos uno” o “uno o más”.

55 El término “comprender” se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir que permite la presencia de una o más características o componentes.

60 El término “biomaterial” significa un material natural o sintético, incluyendo metales, cerámicas y polímeros desprovistos de efectos perjudiciales cuando entran en contacto con células o tejidos biológicos. Habitualmente, el soporte de biomaterial se selecciona del grupo que consiste en soporte polimérico comprendiendo polímeros de olefina, polímeros de flúor, poliestireno, polímeros poliacrílicos, polímeros de poliésteres, polímeros de poliuretano, polímeros de silicio, polímeros de celulosa, polímeros epoxídicos, polímeros basados en silicona, hidrogeles sintéticos, policarbonatos; soportes metálicos biocompatibles comprendiendo titanio y aleaciones de titanio, nitinol, circonia, acero inoxidable y cobalto-cromo, materiales compuestos de alúmina-circonia; y/o cerámicas biocompatibles comprendiendo porcelana, hidroxiapatita y mezclas de los mismos.

65 El término “condrocitos fetales o condroprogenitores”, “tenocitos del tendón de Aquiles fetales o progenitores de

tendón fetales” o “fibroblastos fetales o progenitores de piel fetales” significan células diferenciadas en comparación con células fetales sin diferenciar. En contraposición a la presente invención, se usa el término “sin diferenciar” para describir una célula inmadura o primitiva. Por ejemplo, las células de piel fetales sin diferenciar incluyen aquellas que pueden diferenciarse para dar fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos o incluso otros tipos de células específicos de tejido no relacionado. Las células diferenciadas son aquellas que, cuando se colocan en medios de diferenciación específicos para otro tipo de célula o en un microentorno diferente, no se desdiferenciarán para dar un linaje celular diferente. Por ejemplo, si se colocan fibroblastos de piel fetales en medios de diferenciación osteogénicos, no se convertirán en una población completa de osteoblastos o si se colocan en medios adipogénicos no se convertirán en una población completa de adipocitos y si se colocan las mismas células en una matriz 3D en asociación con hueso, no se desdiferenciarán para dar una población completa de osteoblastos debido al cambio de entorno. Estas células diferenciadas definidas tienen entonces ventajas principales para su posible uso como agentes terapéuticos para medicina tanto para seres humanos como veterinaria.

El término “condiciones de cultivo apropiadas” o “condiciones en las que condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores, progenitores de tendones fetales o progenitores de piel fetales proliferan” es un medio para cultivar células que contiene nutrientes que fomentan la proliferación. El medio de nutrientes puede contener cualquiera de los siguientes en una combinación apropiada y en las concentraciones apropiadas: solución salina isotónica, tampón, aminoácidos, suero o sustituto de suero, y otros factores añadidos de manera exógena. Los expertos en la técnica reconocerán que puede usarse cualquier condición de cultivo comúnmente empleada. En la técnica se conocen bien métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación de medio y técnicas de cultivo celular y se describen en una variedad de fuentes, incluyendo Doile *et al.*, (eds.), 1995, *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho and Wang (eds.), 1991, *Animal Cell Bioreactors*, Butterworth-Heinemann, Boston, que se incorporan en el presente documento como referencia. Por ejemplo, puede usarse cualquier tipo apropiado de medio de cultivo para aislar los condrocitos epifisarios fetales de la invención, tal como, pero sin limitarse a, DMEM, medio 5A de McCoy (Gibco), medio basal de Eagle, medio CMRL, medio mínimo esencial de Glasgow, medio F-12 de Ham, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio L-15 de Liebovitz y RPMI 1640, medios libres de suero entre otros. El medio de cultivo puede suplementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), sustitutos de suero con factores de crecimiento definidos, suero equino (ES), suero humano (HS), factores de crecimiento de cultivo celular definidos y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina, o bien solos o bien en combinación, entre otros.

El término “línea celular” se refiere a un cultivo celular establecido de manera permanente que proliferará indefinidamente dado un medio reciente apropiado y espacio suficiente. El término línea celular primaria se refiere a un cultivo celular establecido con números de pase limitados.

El término “banco de células” se refiere a recoger biopsias de tejido fetal de donante, tal como cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel fetal; hacer crecer el tejido fetal y hacer proliferar células fetales hasta una alta concentración en condiciones de cultivo apropiadas; usar tratamientos enzimáticos o no enzimáticos (es decir, tripsina) con el tejido y las células de los cultivos resultantes para permitir su suspensión; combinar las células suspendidas para producir una suspensión generalmente uniforme de células a partir del cultivo; mezclar suavemente con un crioprotector; sellar alícuotas de la suspensión celular en ampollas; y congelar las alícuotas. La tasa óptima de congelación puede determinarse empíricamente. Por ejemplo, reduciendo la temperatura de la ampolla en 1°C/min hasta -80°C y después transfiriendo hasta -160°C aproximadamente 24 horas después, o en ciclos programados en un dispositivo Nano-Freezer automático y calibrado para una congelación de ciclo completo hasta -165°C. Este banco a temperatura ultrafría conserva las células de tal manera que dejan de envejecer, permitiéndoles así conservar la función y actividad que tenían el día que se recogieron.

Las células crioconservadas de la invención constituyen un banco de células (1-10⁷/ml), partes del cual pueden “extraerse” mediante descongelación y después usarse para producir nuevas células y tejido cartilaginoso según se necesite. La descongelación debe llevarse a cabo generalmente de manera rápida, por ejemplo, transfiriendo una ampolla de nitrógeno líquido a un baño de agua a 37°C. El contenido descongelado de la ampolla debe transferirse inmediatamente en condiciones estériles a un recipiente de cultivo que contiene un medio apropiado tal como DMEM acondicionado con FBS al 10%. Es aconsejable que las células en el medio de cultivo se ajusten a una densidad inicial de aproximadamente 1-6X10³⁻⁴ células/ml. Una vez en cultivo, las células pueden examinarse diariamente, por ejemplo, con un microscopio invertido para detectar la proliferación celular, y subcultivarse en cuanto alcanzan una densidad apropiada o monitorizarse en tiempo real con microscopía de barrido para realizar un control de calidad.

Las células de la invención pueden extraerse del banco según se necesite y usarse para la producción de nuevas células o tejido cartilaginoso, tendinoso o cutáneo o bien *in vitro*, por ejemplo, como cultivo tridimensional de cartílago, tendón o piel, tal como se describe en el presente documento, o bien *in vivo*, por ejemplo, mediante administración directa de células al sitio en un sujeto en el que se necesitan nuevas células o tejido cartilaginoso, tendinoso o cutáneo.

Se pretende que el término “sujeto” (como en el tratamiento de “un sujeto”) o “paciente” se refiera a un individuo

- 5 mamífero afectado por, propenso a, o que padece un estado, defecto, trastorno o enfermedad (tal como se especifica en el presente documento). El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende que sujetos adultos y recién nacidos, ya sean machos o hembras, queden cubiertos. Este término también incluye tanto seres humanos como animales. Por ejemplo, los sujetos pueden ser, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, fauna salvaje, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, conejos, ratas o ratones. Preferiblemente, los sujetos son seres humanos y caballos. Tal como se usa en el presente documento, el término fauna salvaje incluye cualquier mamífero, ave, anfibio o pez que no está domesticado. Los ejemplos de tal fauna salvaje incluyen, pero no se limitan a, tejones, castores, leones, tigres, osos, halcones y ciervos.
- 10 Una matriz tridimensional significa cualquier matriz seleccionada de una matriz de colágeno o PLA, PLGA, PEG, quitosano, elastina, hidrogel incluyendo por ejemplo HA (ácido hialurónico), silicona, quitosano o una mezcla de los mismos. La matriz proporciona un espacio tridimensional para garantizar una cobertura y administración apropiadas de células fetales, tales como condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores, progenitores de tendones fetales, progenitores de piel fetales o productos fetales en o también en asociación con un material de implante adicional. En una realización, el método de la invención permite la preparación de constructos tridimensionales usando las células diferenciadas cartilaginosas, tendinosas o cutáneas integradas en diversas matrices. La integración de las células diferenciadas cartilaginosas, tendinosas o cutáneas con matriz puede producirse mezclando, combinando, transfiriendo con pipeta, sembrando, sembrando en placa o colocando las células dentro de una matriz.
- 15 El término “colágeno” se refiere a un compuesto polipeptídico que es de naturaleza hidrófila que se somete a degradación por enzimas extracelulares. Dado que esta sustancia está bien estudiada, muchos parámetros clave pueden controlarse. El colágeno es un antígeno débil, dando así como resultado un potencial de rechazo mínimo. Un colágeno preferido usado en los métodos y usos de la invención es colágeno de caballo o colágeno porcino.
- 20 Un “implante” puede considerarse como un dispositivo médico que va a sustituir a una estructura biológica que falta, dar soporte a una estructura biológica dañada o potenciar una estructura biológica existente. Los implantes pueden fabricarse de materiales artificiales o naturales. Los implantes médicos son dispositivos hechos por el hombre y la superficie de los implantes que entra en contacto con el organismo puede fabricarse de un material biomédico tal como titanio, silicona, polímeros, apatita, bioespumas y biogeles. Algunos implantes pueden tener fármacos de elución bioactivos asociados tales como cápsulas implantables o endoprótesis de elución de fármacos. Los materiales de implante pueden asociarse con células fetales diferenciadas de tipo tisular específico para una respuesta antifibrótica.
- 25 El término “sistemas de administración” significa cualquier material, hidrogel, silicona o injerto de implante natural o sintético, maxilofacial, para traumatismo, ortopédico, usado habitualmente o metálico que proporciona un medio para transferir células fetales o productos de células fetales solos o en asociación con un implante para tratar tejido o proporcionar implante.
- 30 El término “tejido cartilaginoso” se usa en el presente documento tal como se reconoce generalmente ese término en la técnica, y se refiere a un tipo especializado de tejido conjuntivo denso que comprende células incrustadas en una ECM (véase, por ejemplo, Cormack, 1987, Ham’s Histology, 9^a ed., J.B. Lippincott Co., págs. 266-272). La composición bioquímica del cartílago difiere según el tipo; sin embargo, la composición general del cartílago comprende condrocitos rodeados por una ECM densa que consiste en colágeno, proteoglicanos y agua. En la técnica se reconocen varios tipos de cartílago, incluyendo, por ejemplo, cartílago hialino, cartílago articular, cartílago costal, cartílago fibroso, cartílago meniscal, cartílago elástico, cartílago auricular y cartílago amarillo. Se pretende que la producción de cualquier tipo de cartílago se encuentre dentro del alcance de la invención. Según una realización, la invención se refiere a composiciones y métodos para la producción de nuevo tejido cartilaginoso para su uso preferiblemente en seres humanos. Sin embargo, la invención también puede ponerse en práctica para producir nuevo tejido cartilaginoso para su uso en cualquier mamífero que lo necesite, incluyendo caballos, perros, gatos, ovejas, cerdos, entre otros. Se pretende que el tratamiento de tales animales se encuentre dentro del alcance de la invención.
- 35 El término “tejido tendinoso” se usa en el presente documento tal como se reconoce generalmente ese término en la técnica, y se refiere a un tipo especializado de tejido conjuntivo fibroso que comprende principalmente colágeno, proteoglicanos y agua.
- 40 El término “tejido cutáneo” se usa en el presente documento tal como se reconoce generalmente ese término en la técnica, y se refiere a un tipo especializado de tejido fibroso que también comprende colágeno, elastina y proteoglicanos.
- 45 En una realización de la presente invención, se da a conocer un método no enzimático para liberar mecánica y rápidamente poblaciones de células adherentes tempranas que definen las características de un establecimiento de banco de células parenterales (PCB). En algunas realizaciones, las células diferenciadas primarias proceden de tejido cartilaginoso específico, de tejido tendinoso específico y de tejido cutáneo específico. El desarrollo del PCB permite lograr un establecimiento de banco de células adicional sistemático y estable.
- 50
- 55
- 60
- 65

Por tanto según una realización de la presente invención, se proporciona un método no enzimático *in vitro* para el aislamiento, la expansión y el desarrollo de células fetales seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos epifisarios fetales, tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel fetales, que comprende las etapas de:

a) usar una muestra fetal seleccionada de cartílago fetal cubital que comprende condrocitos epifisarios fetales; tendón de Aquiles fetal que comprende tenocitos del tendón de Aquiles fetales; o piel abdominal fetal que comprende fibroblastos de piel fetales;

b) microdisecar mecánicamente y dispersar dicha muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal y permitir la unión de la muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal microdisecada dentro de muescas de superficie ranurada con bisturí;

c) cultivar dicha muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal *in vitro* en condiciones en las que dichos condrocitos epifisarios fetales, tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel abdominal fetales proliferan,

d) seleccionar y aislar primeras poblaciones celulares de condrocitos epifisarios fetales adherentes, primeras poblaciones celulares de tenocitos del tendón de Aquiles adherentes y primeras poblaciones celulares de fibroblastos de piel fetales adherentes a partir de la misma.

Preferiblemente, la muestra de cartílago fetal cubital es una muestra de epífisis cubital proximal fetal.

En una realización específica, la invención se refiere a un método para el aislamiento, la expansión y el desarrollo de unos bancos de células parenterales de condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores (FEC), progenitores de tendón de Aquiles fetal y progenitores de piel fetales a partir de una única donación de tejido (sólo 0,2-2 cm de tejido). La fuente de cartílago, tendón y piel es importante para establecer bancos de células sistemáticos. Los solicitantes han encontrado que el cartílago fetal cubital es una fuente superior al cartílago de tibia, fémur o costilla, que el tendón de Aquiles fetal es superior y la piel fetal del abdomen es superior. El cartílago, tendón y piel fetales tienen capacidades notables para la reparación y las células fetales muestran actividad inmunomoduladora y capacidades significativas de cicatrización de heridas. Para el cartílago, estos aspectos, en combinación con su capacidad osteocondrogénica natural tras la osificación epifisaria y la caracterización celular de FEC hace que esta población de células aisladas en el método no enzimático de la presente invención sea una opción celular muy interesante para la reparación y regeneración de tejido osteocondral y/o cartilaginoso.

En el método de la invención no se usan métodos de cultivo primario tradicionales de digestión para la liberación de la población celular de elección. Generalmente se realiza digestión a partir de tejidos que no se disocian de manera automática (es decir componentes celulares de la sangre, algunas secciones de tejido de placenta, algunas secciones de cordón umbilical). La disección mecánica de tejido en combinación con crecimiento tisular/celular dirigido a lo largo de incisiones en las placas de cultivo tisular, selecciona la primera población de células adherentes en tan sólo varios días de crecimiento y esta población es muy sistemática y homogénea. Estas poblaciones celulares crecen más rápidamente y tienen perfiles morfológicos y fisiológicos diferentes de otras poblaciones celulares que se han digerido de manera enzimática. El solicitante ha mostrado diferencias de crecimiento en 2D para tejido cutáneo fetal que se ha digerido de manera enzimática en comparación con el tratamiento mecánico con alineamiento de células sobre una superficie.

De manera importante, si los cultivos primarios se desarrollan sin digestión de tejido, los condrocitos articulares fetales, progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales no pueden desdiferenciarse fácilmente para dar otros linajes celulares. Los condrocitos o condroprogenitores, progenitores de tendones y progenitores de piel desarrollados sin digestión enzimática en el procedimiento de establecimiento de banco de células no se diferencian para dar células osteogénicas completas, neurales y adipogénicas tales como células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea o de células de cartílago articular fetales que se han tratado enzimáticamente para su cultivo celular primario o que no tienen componentes tisulares sólidos para unirse a placas de cultivo de plástico. Otro aspecto importante es que los bancos de células desarrollados a partir del cultivo celular primario de células no enzimático da como resultado células que son más estables a lo largo de pases *in vitro*. La morfología y estabilidad del cromosoma son factores importantes para usar estas células en bancos para determinar agentes terapéuticos en seres humanos.

El aislamiento de cGMP exhaustivo usando un procedimiento y método no enzimático en combinación con la homogeneidad y estabilidad observadas de esta población de FEC, la población de progenitores de tendón y la población de progenitores de piel en cultivo permite la expansión fiable de FEC, progenitores de tendones y progenitores de piel para *in vitro* y el desarrollo de extensos bancos de células maestros a partir de la población de PCB de este método descrito. También hace posible usar el mismo banco de células de cada tejido para aplicaciones clínicas de cientos de miles de pacientes, abriendo la puerta a novedosas terapias osteocondrales, musculoesqueléticas y de regeneración de la piel.

Los tejidos musculoesqueléticos, tales como tejidos tendinoso, óseo, muscular, de disco y cartilaginoso, y cutáneo, cuando se derivan de tejidos fetales de 10-16 semanas, son fuentes ideales para desarrollar rápidamente bancos de células parenterales para su uso clínico. Las células derivadas cuando no se digiere el tejido de manera enzimática y cuando se dirige el alineamiento celular a lo largo de superficies serradas, se preparan rápidamente (en el plazo de 12-14 días frente a de varias semanas a meses cuando se somete el tejido a digestión enzimática), son de población uniforme y mantienen características de tejido específico a tipo de célula con biomarcadores asociados.

El método no enzimático de la presente invención proporciona células diferentes de las obtenidas mediante métodos enzimáticos conocidos. Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona una línea celular de condrocitos epifisarios fetales, obtenida mediante el método no enzimático de la presente invención, que tiene la designación FE002-Cart y depositada con el número de registro ECACC 12070303-FE002-Cart el 3 de julio de 2012. En otra realización, la presente invención proporciona línea celular de tenocitos del tendón de Aquiles fetales (también denominada en el presente documento línea celular de progenitores de tendón de Aquiles fetales), obtenida mediante el método no enzimático de la presente invención, que tiene la designación FE002-Ten y depositada con el número de registro ECACC 12070302-FE002-Ten el 3 de julio de 2012. En una realización adicional, la presente invención proporciona línea celular de fibroblastos de piel fetales (también denominada en el presente documento línea celular de progenitores de piel fetales), obtenida mediante el método no enzimático de la presente invención, que tiene la designación FE002-SK2 y depositada con el número de registro ECACC 12070301-FE002-SK2 el 3 de julio de 2012.

Una vez establecido, puede usarse un cultivo de condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores para producir condrocitos que pueden producir nuevas células y tejido cartilaginoso. La diferenciación de condrocitos epifisarios fetales para dar condrocitos, seguida por la producción de tejido cartilaginoso a partir de los mismos, puede desencadenarse mediante la adición al medio de cultivo con o sin el uso de factores de crecimiento exógenos específicos, tales como, por ejemplo, BMP tales como BMP-13 o TGF- β , con o sin ascorbato. Pueden aplicarse los mismos procedimientos a partir de progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales establecidos.

La invención contempla además el establecimiento y mantenimiento de cultivos de condrocitos así como cultivos mixtos que comprenden tanto condrocitos epifisarios fetales como condrocitos. Al igual que con condrocitos epifisarios fetales, una vez establecido un cultivo de condrocitos o un cultivo mixto de condrocitos epifisarios fetales y condrocitos, la población de células se expande de manera mitótica *in vitro* mediante pase a medio reciente según lo dicte la densidad celular, en condiciones que conducen a la proliferación celular sin formación de cartílago, tales como, por ejemplo, en medio de cultivo que carece de TGF- β u otro factor de crecimiento. Al igual que con cultivos de pre-condrocitos, los cultivos de condrocitos y cultivos mixtos de condrocitos epifisarios fetales y condrocitos deben transferirse a medio reciente cuando se alcanza una densidad celular suficiente. Por tanto, debe prevenirse o minimizarse la formación de una monocapa de células, por ejemplo, transfiriendo una parte de las células a un nuevo recipiente de cultivo y en medio reciente. Tal retirada o transferencia debe realizarse en cualquier recipiente de cultivo que tenga una monocapa celular que supere una confluencia de aproximadamente el 25%. Alternativamente, puede agitarse el sistema de cultivo para prevenir que las células se adhieran. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.

En una realización adicional de la invención, una población de condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores aislados de cartílago fetal cubital se expande de manera mitótica y se cultiva *in vitro* para dar lugar a condrocitos que pueden producir células y tejido cartilaginoso para su uso terapéutico. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales. Por tanto en una realización, la presente invención se refiere a condrocitos epifisarios fetales (FEC), tenocitos del tendón de Aquiles fetales y fibroblastos de piel fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso como agentes terapéuticos.

En otra realización de la invención, condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores aislados a partir de cartílago fetal cubital, se crioconservan y se almacenan congelados en un "banco" a partir del cual pueden descongelarse y usarse para producir células y tejido cartilaginoso según se necesite. Los condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores, que se recogen o producen a partir del mismo, pueden almacenarse congelados en un "banco" durante un periodo de años. Las células pueden retirarse del banco según se necesite mediante descongelación, y las células descongeladas pueden usarse para producir nuevos tejidos y células en cualquier momento para la reparación, la sustitución o el aumento de cartílago, así como otros tejidos mesenquimatosos, tales como hueso, tendón o ligamento. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.

Como resultado de la naturaleza "fetal" de las células aisladas a partir de la muestra de cartílago fetal cubital, puede minimizarse el rechazo inmunitario de los condrocitos epifisarios fetales implantados de la invención, o tejido cartilaginoso producido a partir de los mismos. Por consiguiente, en otra realización de la invención, tales células son útiles como "células de donante ubicuas" para su uso en cualquier sujeto que lo necesite. Las mismas características pueden observarse del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.

En otra realización de la invención, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras, progenitores de tendón de Aquiles fetales o progenitores de piel fetales se suspenden en una disolución de hidrogel en la que pueden o bien inyectarse o bien implantarse en un paciente. Alternativamente, las células pueden sembrarse en primer lugar en el hidrogel y después cultivarse antes de la implantación. Preferiblemente, las células se cultivan en el hidrogel de modo que se expanden de manera mitótica antes de la implantación.

En aún otra realización de la invención, se preparan nuevas poblaciones celulares y tejido cartilaginoso a partir de los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención y se usan para reparar, sustituir o aumentar tejido cartilaginoso en un sujeto usando cualquier técnica de reparación, sustitución o aumento conocida en la técnica o que se desarrolle en el futuro. Por ejemplo, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención pueden sembrarse en un andamiaje o entramado tridimensional compuesto por un material no vivo biocompatible que tiene espacios intersticiales, aberturas o poros que pueden conectarse a modo de puente por los condrocitos. En condiciones de cultivo *in vitro* apropiadas, las células sembradas envuelven sustancialmente el entramado tridimensional y secretan una matriz extracelular para formar nuevo tejido cartilaginoso vivo que puede implantarse *in vivo*. Alternativamente, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención se siembran sobre un entramado tridimensional y se implantan inmediatamente en un sitio en el sujeto. Las células sembradas proceden a formar nuevo tejido cartilaginoso *in vivo* o estimular el cartílago de receptor para repararse y reorganizarse. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales en los medios para formar o estimular nuevo tejido tendinoso o nuevo tejido cutáneo del tendón o la piel de receptor para repararse y reorganizarse.

En aún otra realización, el entramado tridimensional sobre el que se siembran las células de la invención comprende además, o está recubierto con, uno o más agentes bioactivos u otros compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento, inmunosupresores, etc.

En aún otra realización de la invención, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención se inoculan y se hacen crecer sobre un entramado tridimensional y se colocan en un recipiente que puede manipularse para permitir cambios de presión intermitentes, o en un sistema de biorreactor especialmente diseñado para la producción *in vitro* de constructos de tejido cartilaginoso, biorreactor que permite la presurización de la cámara durante el crecimiento y un suministro adecuado de nutrientes para condrocitos mediante convección. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.

La terapia celular basada en andamiaje proporciona una ventaja evidente en cuanto a que el agente de generación de tejido terapéutico administrado, en este caso las células, se localiza fácilmente y por tanto puede implantarse de manera artroscópica junto con el andamiaje (Iwasa *et al.*, 2009). Esto evita la necesidad de cirugía invasiva mayor (artroplastia total) y conserva el tejido nativo lo mejor posible, reduciendo así significativamente la aparición de inflamación, lo que puede muy fácilmente afectar de manera negativa al desenlace de la terapia (van Osch *et al.*, 2009). Con el fin de proporcionar una plantilla que soporte el crecimiento tisular 3D, debe ajustarse cuidadosamente a medida la estructura y composición de un andamiaje. Se han usado materiales sintéticos tales como polietilenglicol (PEG), poli(ácido láctico) (PLA) y poli(ácido glicólico) (PGA) así como materiales derivados de manera natural tales como hialuronano, sulfato de condroitina y quitosano con o sin modificación química adicional y adición de grupos laterales con el fin de generar hueso y cartílago (Ahmed *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2008).

Los andamiajes de biomaterial funcionan como matriz extracelular para proporcionar una estructura física para proteger a las células y para guiar el crecimiento tisular. La integración en la matriz es esencial para tener un sistema tridimensional para administración al sitio de cirugía de interés. Se ha mostrado que las células fetales, a diferencia de las células mesenquimatosas y de adulto, penetran a través de diversos biomateriales debido a sus propiedades inherentes de adhesión y migración. Esto permite una rápida siembra de las células en los biomateriales respectivos y menos manipulación de los implantes antes de la implantación. Diferentes materiales y métodos de fabricación pueden formar andamiajes de biomaterial con distintas propiedades que pueden adaptarse a la ingeniería de tejido cartilaginoso. Se han desarrollado muchos biomateriales biodegradables e hidrogeles para otros fines quirúrgicos tales como esponjas hemostáticas y materiales de relleno tisular (Mast *et al.*, 1993; Patino *et al.* 2002; Drury y Moony, 2003). Estos biomateriales proporcionan materiales de calidad clínica (clasificados como dispositivos médicos) para someterse a prueba para determinar su biocompatibilidad y para garantizar que no se producen productos derivados radicales mediante la asociación del sistema de administración de biomaterial y los productos celulares.

En una realización adicional, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención se administran directamente en un sitio *in vivo*, por ejemplo, mediante inyección y sin unión a un entramado tridimensional, para producir nuevo tejido cartilaginoso y poblaciones celulares en ese sitio. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales. Por tanto en una realización, la presente invención se refiere al uso de condrocitos epifisarios fetales (FEC) obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para la producción de nuevo tejido cartilaginoso y/o constructos tridimensionales; al uso de tenocitos del tendón de Aquiles fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para la producción de nuevo tejido tendinoso y/o constructos tridimensionales y al uso de fibroblastos de

piel fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para la producción de nuevo tejido cutáneo y/o constructos tridimensionales.

5 En una realización adicional de la invención, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención se estimulan para producir cartílago usando factores de crecimiento suministrados de manera exógena tales como, por ejemplo, TGF- β o BMP tales como BMP-2, BMP-12 y BMP-13.

10 En aún otra realización de la invención, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para producir, o para aumentar la producción de, tipos específicos de factores de crecimiento, péptidos, proteínas u otras moléculas que sirven para aumentar la cantidad de cartílago producido, o que mejoran el éxito de la implantación, por ejemplo, reduciendo el riesgo de rechazo o inflamación asociado con el implante. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.

15 La invención también se refiere a los productos de los métodos anteriores, incluyendo, pero sin limitarse a, los condrocitos epifisarios fetales o las células condroprogenitoras de la invención, expandidos de manera mitótica o de otro modo; nuevo tejido cartilaginoso producido a partir de los mismos; matriz extracelular extraída a partir de los mismos; y constructos de cartílago/entramado tridimensionales. La invención también se refiere al uso de estas células, constructos y tejidos *in vivo* para reparar, sustituir o aumentar cartílago, o *in vitro* para formar cultivos de cartílago tridimensionales que son útiles para producir nuevo tejido cartilaginoso o agentes bioactivos, o para someter a prueba la citotoxicidad de posibles agentes terapéuticos. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.

25 En una realización de la presente invención, los condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores aislados a partir de cartílago fetal cubital, así como los condrocitos diferenciados a partir de los mismos, pueden usarse para producir nuevas células y tejido cartilaginoso para reparar o sustituir cartílago. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales que pueden usarse para producir nuevas células y tejidos tendinoso o cutáneo para reparar o sustituir tendón o piel.

30 En una realización adicional de la presente invención, los condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores aislados a partir de cartílago fetal cubital según el método de la presente invención, así como los condrocitos diferenciados a partir de los mismos, pueden usarse como agente terapéutico. Preferiblemente, los condrocitos epifisarios fetales aislados a partir de cartílago fetal cubital según el método de la presente invención, así como los condrocitos diferenciados a partir de los mismos, son para su uso en el método para regeneración y reparación osteocondral (incluyendo reparación de cartílagos y reparación de tendones), y en el método para el tratamiento de enfermedades o defectos osteocondrales (incluyendo lesiones osteocondrales, heridas, traumatismo, fragmentaciones y fracturas, necrosis ósea subcondral y osteocondritis) y/o artritis. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales para tratamientos específicos de tendón y piel.

40 Por tanto en una realización, la presente invención se refiere a condrocitos epifisarios fetales (FEC) obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido osteocondral y tejido musculoesquelético; tenocitos del tendón de Aquiles fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido tendinoso y tejido musculoesquelético; y fibroblastos de piel fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido cutáneo y para el tratamiento de quemaduras, heridas y estado fibrótico.

50 En una realización adicional de la presente invención, se proporcionan condrocitos epifisarios fetales (FEC) obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades o defectos osteocondrales, artritis y enfermedades musculoesqueléticas; tenocitos del tendón de Aquiles fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas y tendinopatías; fibroblastos de piel fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades de la piel.

55 El uso de condrocitos epifisarios fetales (FEC) o condroprogenitores para ingeniería de tejido osteocondral es muy prometedor. De hecho, a lo largo del desarrollo fetal, la epífisis se convierte en el sitio principal para el centro de osificación secundaria (SOC), que transforma el condensado de FEC tanto en una región cartilaginosa articular como en lo que pasa a ser médula y hueso trabecular epifisario tras invasión vascular (Blumer *et al.*, 2008; Onyekwelu *et al.*, 2009). Se sabe que el cartílago fetal, tal como el observado para piel fetal, tiene una capacidad notable de autorreparación. En un modelo de cabra fetal, se ha mostrado que los defectos se reparan sin la formación de tejido fibroso o cicatriz (Namba *et al.*, 1998).

65 Las células (condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores y condrocitos) y tejidos cartilaginosos de la invención pueden usarse *in vitro* para examinar una amplia variedad de compuestos para determinar la eficacia y citotoxicidad de agentes farmacéuticos, factores de crecimiento/reguladores, agentes antiinflamatorios, etc. Para

ello, las células de la invención, o cultivos tisulares descritos anteriormente, se mantienen *in vitro* y se exponen al compuesto que va a someterse a prueba. La actividad de un compuesto citotóxico puede medirse por su capacidad para dañar o destruir células en cultivo. Esto puede evaluarse fácilmente mediante técnicas de tinción vital. El efecto de factores de crecimiento/reguladores puede evaluarse analizando el número de células vivas *in vitro*, por ejemplo, mediante recuentos de células totales, y recuentos de células diferenciales. Esto puede lograrse usando técnicas convencionales citológicas y/o histológicas, incluyendo el uso de técnicas inmunocitoquímicas que emplean anticuerpos que definen antígenos celulares específicos del tipo. Puede evaluarse el efecto de diversos fármacos sobre las células de la invención o bien en cultivo en suspensión o bien en el sistema tridimensional descrito anteriormente. Por tanto, los condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores aislados a partir de cartílago fetal cubital también pueden usarse para desarrollar agentes terapéuticos y/o dispositivos médicos avanzados para los tratamientos de defectos osteocondrales artríticos, reparación de cartílagos, reparación de tendones. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales que también pueden usarse para desarrollar agentes terapéuticos y/o dispositivos médicos avanzados para los tratamientos de tejidos musculoesqueléticos.

Por tanto en una realización de la presente invención, se proporciona un método de examen para el desarrollo de agentes terapéuticos y/o dispositivos médicos para el tratamiento de defectos osteocondrales artríticos, reparación de cartílagos, reparación de tendones, reparación de tejido musculoesquelético y reparación de la piel, que comprende el uso de condrocitos epifisarios fetales (FEC), tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel fetales obtenidos mediante el método no enzimático de la invención.

Las células (condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores y condrocitos) y tejidos cartilagosos de la invención pueden usarse como sistemas de modelo para el estudio de estados fisiológicos o patológicos. Por ejemplo, las articulaciones que se inmovilizan presentan dolencias de manera relativamente rápida en varios aspectos. La actividad metabólica de condrocitos parece afectada dado que pronto se observan una pérdida de proteoglicanos y un aumento del contenido en agua. El aspecto brillante y blanco normal del cartílago cambia a un color azulado y opaco, y el grosor de cartílago se reduce. Sin embargo, aún no está clara la cantidad de este cambio que se debe a la deficiencia nutricional frente a la cantidad debida a la alteración de la homeostasis metabólica dependiente del estrés. Las células y tejidos cartilagosos de la invención pueden usarse para determinar los requisitos nutricionales de cartílago en diferentes condiciones físicas, por ejemplo, presurización intermitente y mediante acción de bombeo de medio con nutrientes al interior y al exterior del constructo de cartílago. Esto puede ser especialmente útil en el estudio de causas subyacentes para la disminución relacionada con la edad o relacionada con lesiones de la resistencia a la tracción de cartílago articular, por ejemplo, en la rodilla, que predispone el cartílago debilitado a daño por traumatismo. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales útiles en el estudio de causas subyacentes para la disminución relacionada con la edad o relacionada con lesiones de la resistencia a la tracción de tendón y piel frente a daño por traumatismo o relacionado con la edad.

Las células (condrocitos epifisarios fetales o condroprogenitores y condrocitos) y tejidos cartilagosos de la invención también pueden usarse para estudiar el mecanismo de acción de citocinas y otros mediadores proinflamatorios, por ejemplo, IL-1, TNF y prostaglandinas, que se liberan en el líquido sinovial como resultado de enfermedad reumática. Por tanto, puede someterse a prueba el propio líquido sinovial del paciente *in vitro* para estudiar los efectos de estos compuestos sobre el crecimiento de las células de la invención. Además, pueden examinarse agentes citotóxicos y/o farmacéuticos para seleccionar aquellos que son más eficaces para un paciente particular, tales como aquellos que reducen o previenen la resorción de cartílago o potencian de otro modo el crecimiento equilibrado de cartílago articular. Entonces pueden usarse agentes que demuestran ser eficaces *in vitro* para tratar al paciente de manera terapéutica. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales útiles en el estudio del mecanismo de acción de factores de crecimiento, citocinas y otros mediadores proinflamatorios que provocan un desequilibrio en la reparación tisular.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas de tales variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, de manera individual o colectiva, y todas y cada una de las combinaciones o dos o más cualesquiera de dichas etapas o características. Por tanto, debe considerarse que la presente divulgación es en todos los aspectos ilustrativa y no limitativa, indicándose el alcance de la invención por las reivindicaciones adjuntas, y se pretende que todos los cambios que entren dentro del significado y alcance de equivalencia queden abarcados en las mismas.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son a modo de ejemplo de métodos de poner en práctica la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos

Se procesaron epífisis cubital proximal, tendón de Aquiles y piel abdominal siguiendo estrictas leyes y reglamentos y directrices sobre trasplantes para la donación de órgano y examen para crear bancos de células parenterales de FEC, tendón y piel para aplicaciones de ingeniería tisular (protocolo n.º 62/07 del comité ético de CHUV). Se microdisecaron las biopsias de tejido (cartílago, ~2 mm³, tendón, ~0,2 mm³, piel, ~2 cm²) y se dispersaron mediante unión mecánica a superficies ranuradas con bisturí. (No se usaron tratamientos enzimáticos para garantizar únicamente el crecimiento de piel, tendón o cartílago adherente y la sistematicidad de la población celular: criterios necesarios para su uso clínico). Se observó crecimiento de FEC, tendón y piel a de 1-2 días a una semana y se logró la expansión a una y a dos semanas. Se estableció el banco de células parenterales con 50-200 viales de 5-10 x10⁶ células y se almacenó en la fase de vapor de nitrógeno líquido. La caracterización *in vitro* de células aisladas muestra una homogeneidad notable en el cultivo en monocapa así como un potencial proliferativo notable con una propensión a solapamiento (cultivo 3D). Los FEC, progenitores de tendones y progenitores de piel no parecen mostrar variaciones fenotípicas notables en los primeros seis pases. Los FEC y progenitores de tendones pueden coalescer de manera espontánea cuando se colocan en forma de cultivo en sedimento, depositar matriz y expresar marcadores de tenocitos o condrogénicos fundamentales. Análisis de citometría de flujo revelaron distribuciones unimodales indicativas de una población homogénea. Una comparación con MSC derivadas de médula ósea de adulto proporcionó perfiles de marcadores de superficie de tendón o FEC compatibles con un fenotipo condrogénico o de tenocito en vez de un progenitor sin diferenciar.

Establecimiento de banco de células de condrocitos fetales, progenitores de tendón y progenitores de piel, caracterización con respecto a la preparación de agentes terapéuticos.

Establecimiento de banco de células

Se han establecido bancos de células en el Hospital universitario de Lausana a partir de biopsias fetales entre 12-14 semanas de gestación obtenidas tras aborto con consentimiento informado por escrito y aprobación del comité ético de la escuela de medicina local desde 1993 y más particularmente para bancos de células clínicos desde 2007. Se han desarrollado satisfactoriamente bancos de células de cartílago articular preclínicos a partir de 2 donantes independientes hasta la fecha. Usando uno de ellos (FE002-Cart p. 0, FE-002-Ten p. 0, FE-002-SK2, p. 0), será posible establecer todas las células necesarias para ensayos preclínicos y clínicos a pases bajos (MCB a p. 3 y WCB a p. 5).

A partir de ~0,3 cm³ de cartílago articular (radio) (véase la figura 7), a partir de ~0,2 mm³ de tendón de Aquiles y a partir ~1 cm² de piel abdominal, se prepararon bancos de células preclínicos a pases 0 y 1. Se disecó tejido para dar fragmentos de <0,5 mm³, cuando fue posible, y se hicieron crecer en DMEM suplementado con FCS al 10% y glutamina y se usaron las células para la caracterización y experimentación al pase 3 y 6 ó 1 y 9. Se hicieron crecer hasta la confluencia antes de dividirlos y se aclararon dos veces con PBS y se contaron.

Procedimiento detallado sin procesamiento enzimático:

Se divide el tejido en dos placas de 10 cm con fragmentos de tejido completo de ~5 por placa (<0,5 mm³), cuando fue posible. Previamente, se ranuraron de manera profunda las placas de cultivo tisular con un bisturí estéril en un patrón de tablero de ajedrez bajo la campana de flujo laminar. Se colocaron fragmentos de tejido en las regiones de plástico ranuradas picando suavemente y uniendo los fragmentos dentro de las muescas de plástico. Se colocó una pequeña cantidad de medios con nutrientes alrededor de cada fragmento para evitar que flotarán tejidos durante las primeras 24 horas. Tras las primeras 24 horas, se añadieron 8 ml de medios de cultivo a cada placa de 10 cm y se cambió esto dos veces por semana antes del pase. Se hicieron crecer estos fragmentos en DMEM suplementado con tan sólo suero bovino fetal al 10% (Hyclone) para ayudar a garantizar un cultivo celular sistemático. Se hicieron crecer los cultivos celulares a 37°C en una atmósfera humidificada de aire al 95%/CO₂ al 10%. Es importante mencionar que cualquier componente de nutriente necesario para el cultivo celular para ensayos clínicos debe tener unos exhaustivos requisitos de seguridad y seguimiento. Todos los productos derivados de animales, tales como para suero bovino fetal y tripsina, deben emplearse lotes clínicos específicos de tripsina y suero irradiado con radiación gamma que se han sometido a prueba para detectar agentes no previstos. Se observó crecimiento celular por primera vez incluso tras un día, pero tras avanzar el crecimiento celular durante 5-7 días, se retiraron las placas de tejido y células de las placas o bien mediante tripsinación (tripsina al 0,25% - ácido etilendiaminatetraacético [EDTA] al 0,1%) o bien con EDTA solo para el pase a múltiples frascos de cultivo tisular o se congelaron para el establecimiento de banco de células. En este punto, se congelaron algunas células de cartílago fetales, de tendón fetales o de piel fetales en unidades individuales en nitrógeno líquido y otras se sometieron a pase a 1.000-2.000 células/cm² o 10.000-50.000 células/cm² para producir el PCB. Se centrifugaron las células a 2000 g durante 15 min y volvieron a suspenderse en una disolución de congelación de DMEM (5 ml) + FCS (4 ml) + DMSO (1 ml, Fluka) y se congelaron en alícuotas de 1 ml (~5-10 millones de células) a -80°C en recipientes de congelación Nalgene Cryo 1°C (Nalgene) para lograr una tasa de curva de enfriamiento y congelación de -1°C/min. Tras 24 h, se transfirieron las células a nitrógeno líquido para su almacenamiento a más largo plazo.

Se usan 1-2 viales de cartílago articular fetal, tendón fetal o piel fetal preclínicos para preparar un banco de células de trabajo (WCB) sistemático para su caracterización. El diseño de procedimiento es el mismo que el usado en la fabricación de cGMP. En resumen, se inician las células a 1.500 células/cm², o a partir de 1.000-100.000 células/cm²

- 5 en 100 frascos de cultivo celular (T75, Nunc) con 15 ml de medios con nutrientes (DMEM + suero bovino fetal de calidad clínica al 10%, Invitrogen). Se cambian los medios de las células cada 2 días y se realiza la producción / expansión de células durante 10-14 días a 37°C, humedad del 10% o durante 3-6 días a siembras de densidad superior. En el día 12-14, se someten lotes de 10 frascos T75 a TrypLE para separar las células de los frascos y se colocan en tubos de centrifugadora. Se añade un volumen igual de medios con nutrientes a cada tubo antes de la centrifugación para tamponar los efectos de TrypLE. Se resuspende el sedimento celular obtenido a partir de todos los frascos en 200 ml de disolución de medios de congelación (DMEM, suero, DMSO, razón de 5:4:1) y se trasladan alícuotas a 100 viales de congelación Nunc (1,5 ml) a una dilución de 10×10^6 células/ml.
- 10 Se congelan las células a -80°C en recipientes de congelación Nalgene Cryo 1°C (Nalgene) para lograr una tasa de curva de enfriamiento y congelación de -1°C/min. Tras 24 h, se transfieren las células a nitrógeno líquido en la fase de gas. Este WCB se encuentra a un pase 2 y se usa para la caracterización de células y se usan las células a diversos pases pero principalmente entre 2-8.
- 15 Caracterización de condrocitos fetales: identidad, estabilidad, sistematicidad, estabilidad genética
- Se compararon condrocitos fetales establecidos en bancos a lo largo del estudio de los solicitantes con células BM-MSc que se han establecido en bancos en las mismas condiciones técnicas en su laboratorio. MSC son células alogénicas y uno de los otros tipos de células principales que se han propuesto y usado en experimentación preclínica y clínica para la regeneración de cartílago entre otros tejidos (sin embargo, las células mesenquimatosas no son específicas de tejido y tienen que programarse para producir otros tipos de tejido). Además, las MSC son más inestables y tienen que usarse por debajo del pase 4. Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales.
- 20
- 25 Caracterización de cartílago fetal en comparación con BM-MSc
- Se caracterizaron bancos de células de cartílago articular fetal mediante marcadores de superficie obtenidos con análisis de FACS, ensayos funcionales para determinar la deposición de matriz en comparación con células BM-MSc. Se aislaron células de cartílago fetal derivadas de tejido epifisario articular y se congelaron bancos de células parenterales.
- 30
- Algunos marcadores que se compararon en experimentos preliminares incluyen:
- 35 CD105: Endoglina. Parte del complejo de receptor de TGFβ. Criterio principal para la selección positiva de MSC.
- CD90: Thy-1. Criterio principal para la selección positiva de MSC.
- CD44: PTPRC. Marcador de leucocitos. Criterio para la selección negativa de bmMSC.
- 40 CD73: NT5E. Criterio principal para la selección positiva de MSC.
- CD166: ALCAM.
- 45 (Véanse las figuras 8 y 9)
- Puede aplicarse el mismo método del mismo modo para progenitores de tendones fetales y progenitores de piel fetales
- 50 Biocompatibilidad: biocompatibilidad de cartílago fetal con hidrogeles y matriz
- Se someten inicialmente a prueba diferentes matrices que están disponibles para su uso médico para determinar su biocompatibilidad. Se usan hidrogeles de diversas composiciones, colágenos y algunos polímeros biodegradables en los primeros experimentos. Para los hidrogeles, se cultivan células dentro del gel que se inserta en un molde de agar previamente preparado. Esto es necesario para evitar la unión celular al tubo y para permitir el crecimiento tridimensional. Se prepara el molde transfiriendo con pipeta 1 ml de agarosa fundida (agar al 20%, agar de bajo punto de fusión) dentro de un tubo de centrifugadora Eppendorf cónico estéril de 1,5 ml para lo que se inserta un tubo de centrifugadora Eppendorf cónico estéril de 0,5 ml en el agar líquido y se deja que solidifique antes de extraer el tubo de 0,5 ml dejando un inserto cónico. Tras la adición de gel y células, se transfieren con pipeta 100 μl de medios sobre la superficie de cada tubo y se cambian los medios dos veces por semana. Se hacen crecer las células durante una, dos y cuatro semanas en una incubadora a 37°C a una humedad relativa del 95% y CO₂ al 10%.
- 60
- 65 Para preparaciones de matriz, se realizan experimentos preliminares que investigan la densidad de siembra de células (desde 10^3 hasta 10^4 células cm²) y periodos de crecimiento (desde 1 hasta 28 días) con el fin de determinar condiciones óptimas para la administración de células fetales. Se colocan células fetales y BM-MSc a pases 3 ó 4 (máximo de 4 para MSC debido a la inestabilidad después del mismo) en 10 ml de medios (DMEM que contiene

5 FBS al 10%) y se siembran sobre matriz. Se coloca la matriz que contiene las células en una incubadora a 37°C a una humedad relativa del 95% y CO₂ al 10%. Después se añaden 30 ml adicionales de medios una hora más tarde. Se cambia la matriz dos veces por semana con medios con nutrientes. También se mide la biocompatibilidad mediante un ensayo de contacto en el que se cultivan células dentro de una placa de cultivo tisular en la que se siembran inicialmente hidrogel o matriz. Se analizan visualmente el crecimiento y la migración celulares con respecto a la superficie de contacto de hidrogel y matriz. Tras una, dos y cuatro semanas, se tiñen muestras con Giemsa y se fotografían (Sony CyberShot DSC-S70, lente macro Zeiss, aumento de 6x, 3,3 megapíxeles).

REIVINDICACIONES

1. Método no enzimático *in vitro* para el aislamiento, la expansión y el desarrollo de células fetales seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos epifisarios fetales, tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel fetales que comprende las etapas de:
 - a) usar una muestra fetal seleccionada de cartílago fetal cubital que comprende condrocitos epifisarios fetales; tendón de Aquiles fetal que comprende tenocitos del tendón de Aquiles fetales; o piel abdominal fetal que comprende fibroblastos de piel fetales;
 - b) microdisecar mecánicamente y dispersar dicha muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal y permitir la unión de la muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal microdisecada dentro de muescas de superficie ranurada con bisturí;
 - c) cultivar dicha muestra de cartílago fetal cubital, tendón de Aquiles fetal o piel abdominal fetal *in vitro* en condiciones en las que dichos condrocitos epifisarios fetales, tenocitos del tendón de Aquiles fetales o fibroblastos de piel abdominal fetales proliferan,
 - d) seleccionar y aislar primeras poblaciones celulares de condrocitos epifisarios fetales adherentes, primeras poblaciones celulares de tenocitos del tendón de Aquiles fetales adherentes y primeras poblaciones celulares de fibroblastos de piel fetales adherentes a partir de la misma.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la selección y el aislamiento de dichas primeras poblaciones de células adherentes se realizan tras 5-7 días de crecimiento.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de cartílago fetal cubital es una muestra de epífisis cubital proximal fetal.
4. Línea celular de condrocitos epifisarios fetales (FEC) obtenida mediante el método según la reivindicación 1, que tiene la designación FE002-Cart y depositada con el número de registro ECACC 12070303-FE002-Cart.
5. Línea celular de tenocitos del tendón de Aquiles fetales obtenida mediante el método según la reivindicación 1, que tiene la designación FE002-Ten y depositada con el número de registro ECACC 12070302-FE002-Ten.
6. Línea celular de fibroblastos de piel fetales obtenida mediante el método según la reivindicación 1, que tiene la designación FE002-SK2 y depositada con el número de registro ECACC 12070301-SK2.
7. Uso de los condrocitos epifisarios fetales (FEC) según la reivindicación 4 para la producción de nuevo tejido cartilaginoso y/o constructos tridimensionales.
8. Uso de los tenocitos del tendón de Aquiles fetales según la reivindicación 5 para la producción de nuevo tejido tendinoso y/o constructos tridimensionales.
9. Uso de los fibroblastos de piel fetales según la reivindicación 6 para la producción de nuevo tejido cutáneo y/o constructos tridimensionales.
10. Condrocitos epifisarios fetales (FEC) según la reivindicación 4 para su uso como agente terapéutico.
11. Tenocitos del tendón de Aquiles fetales según la reivindicación 5 para su uso como agente terapéutico.
12. Fibroblastos de piel fetales según la reivindicación 6 para su uso como agente terapéutico.
13. Condrocitos epifisarios fetales (FEC) según la reivindicación 4 para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido osteocondral y tejido musculoesquelético.
14. Tenocitos del tendón de Aquiles fetales según la reivindicación 5 para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido tendinoso y tejido musculoesquelético.
15. Fibroblastos de piel fetales según la reivindicación 6 para su uso en un método para la reparación y regeneración de tejido cutáneo y para el tratamiento de quemaduras, heridas y estado fibrótico.
16. Condrocitos epifisarios fetales (FEC) según la reivindicación 4 para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades o defectos osteocondrales, artritis y enfermedades musculoesqueléticas.

17. Tenocitos del tendón de Aquiles fetales según la reivindicación 5 para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas y tendinopatías.
- 5 18. Fibroblastos de piel fetales según la reivindicación 6 para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades de la piel.
- 10 19. Método de examen para el desarrollo de agentes terapéuticos y/o dispositivos médicos para el tratamiento de defectos osteocondrales artríticos, reparación de cartílagos, reparación de tendones, reparación de tejido musculoesquelético y reparación de la piel, que comprende el uso de condrocitos epifisarios fetales (FEC) según la reivindicación 4, tenocitos del tendón de Aquiles fetales según la reivindicación 5 o fibroblastos de piel fetales según la reivindicación 6.

Figura 1

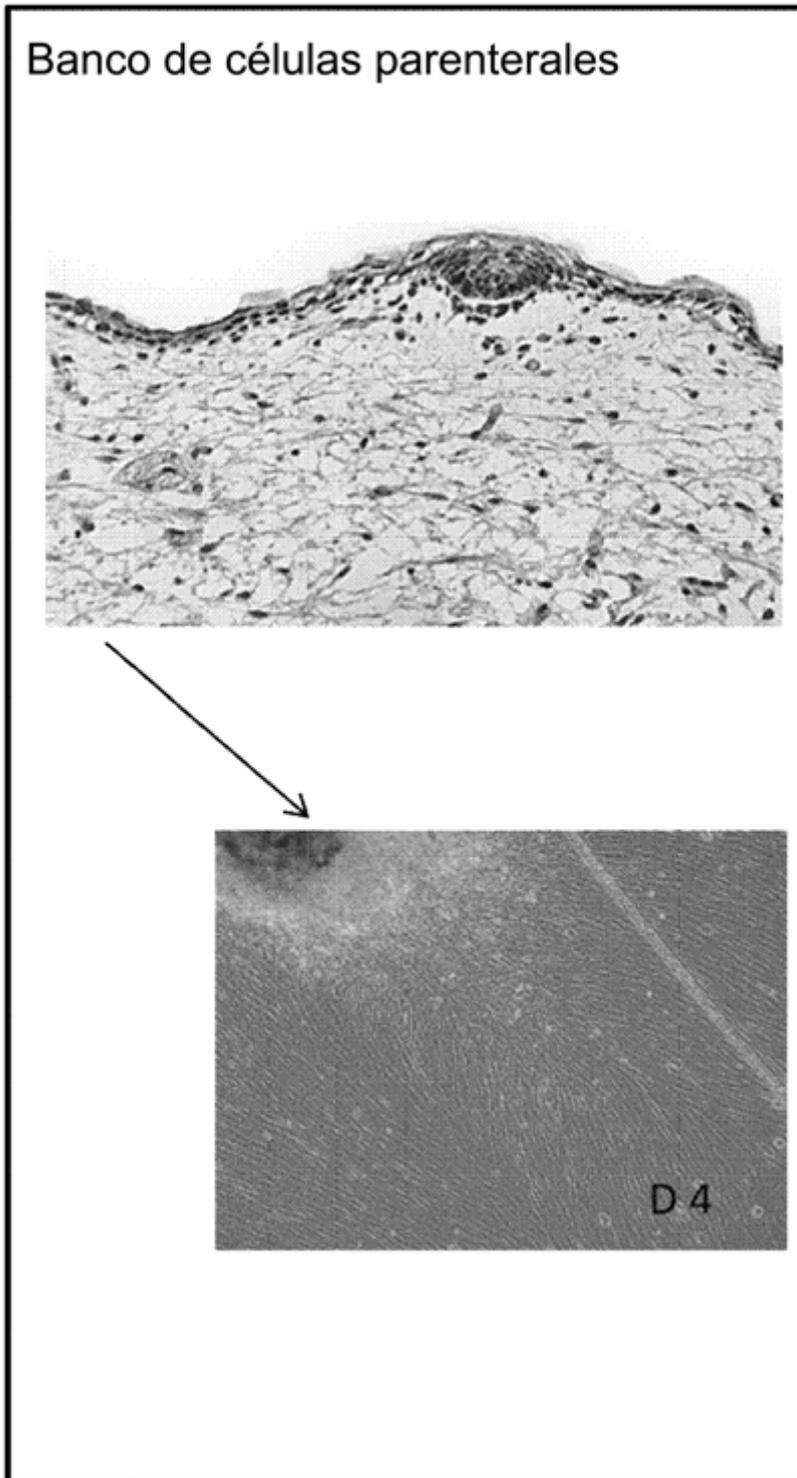


Figura 2

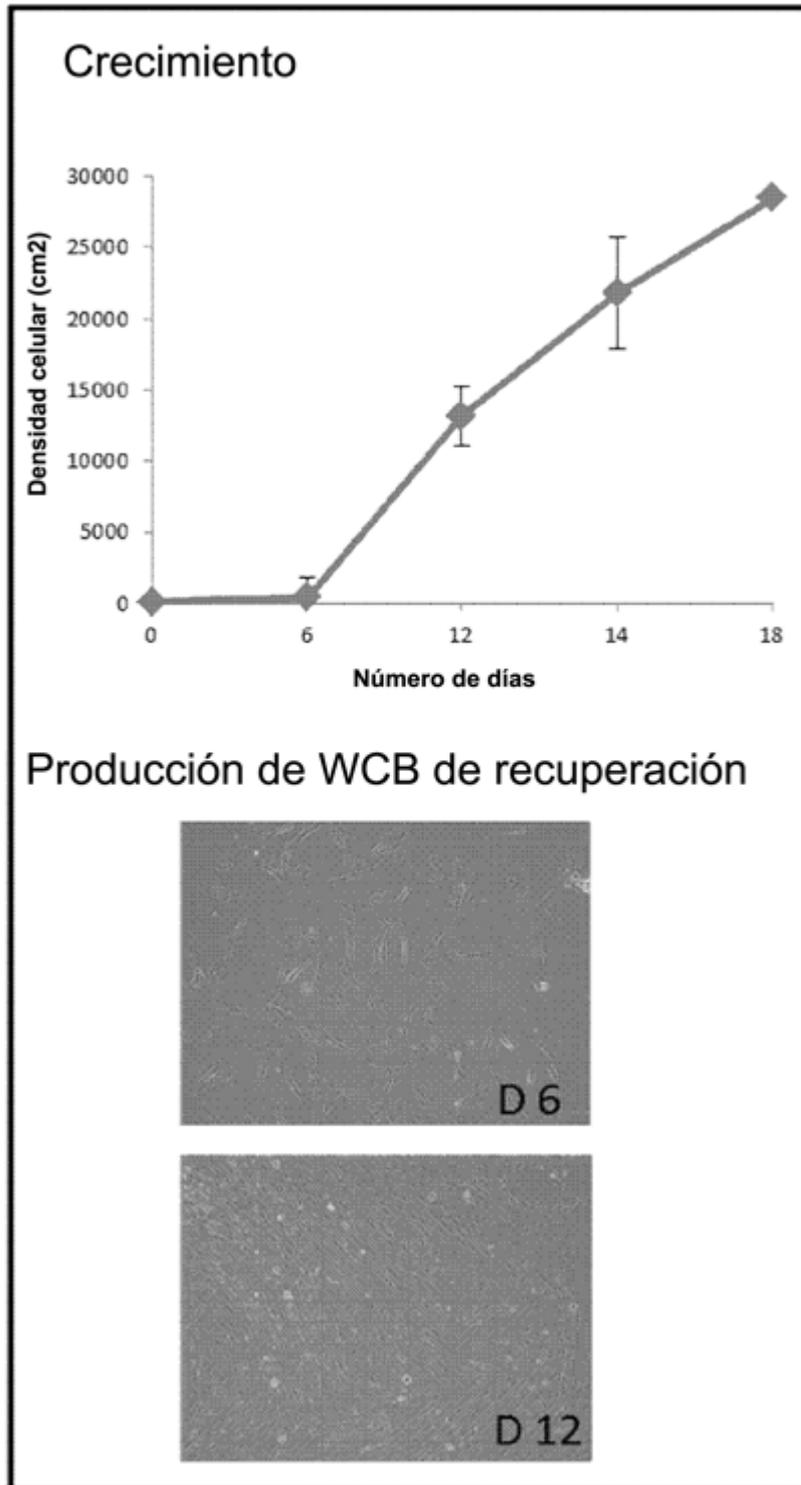


Figura 3

Digestión enzimática

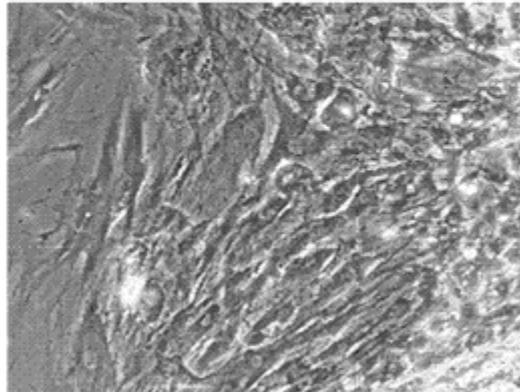
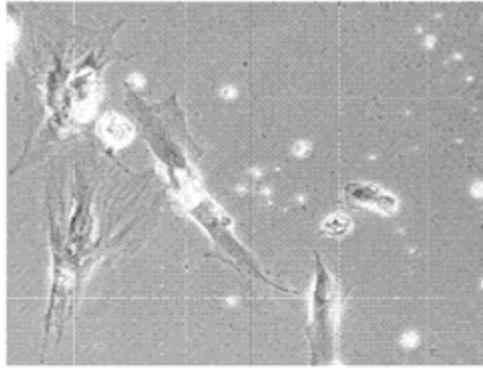


Figura 4

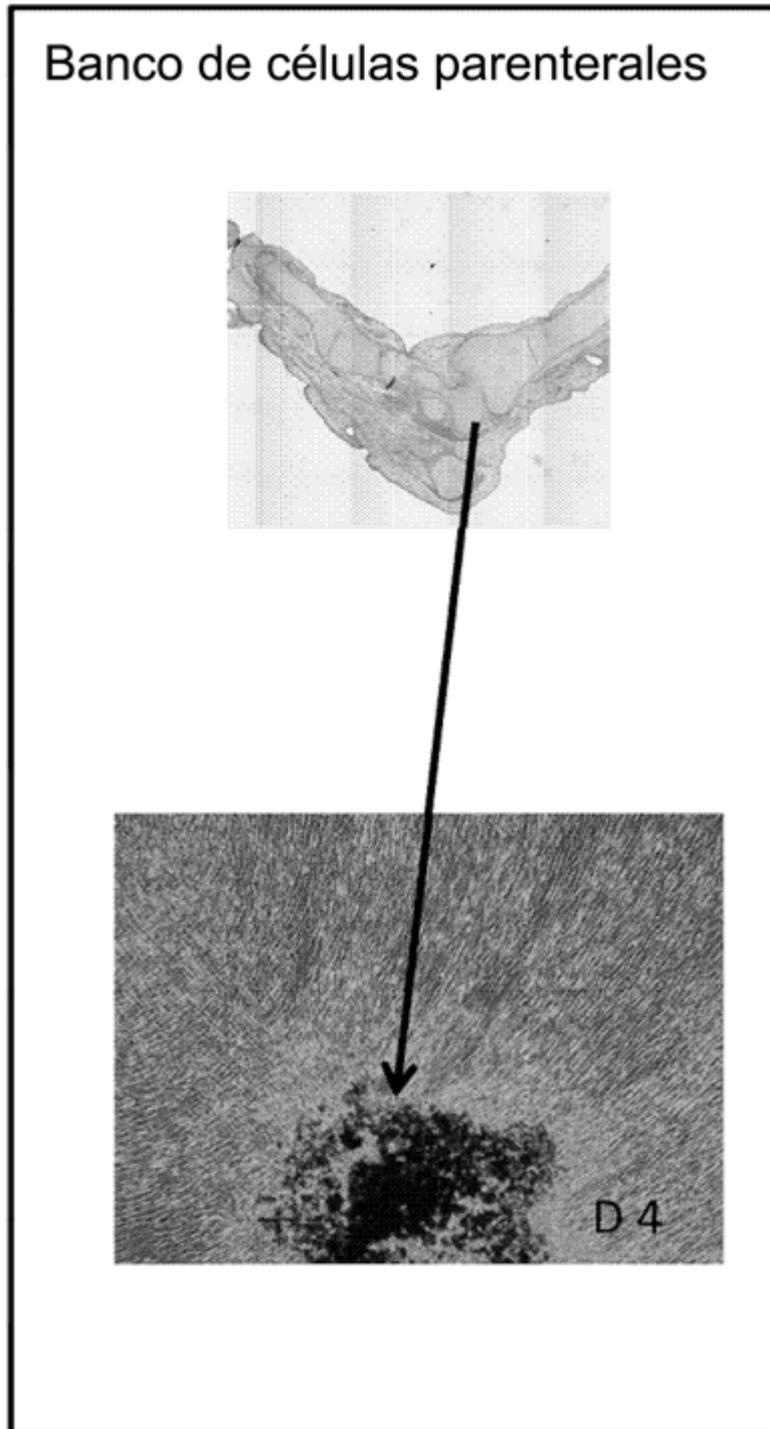


Figura 5

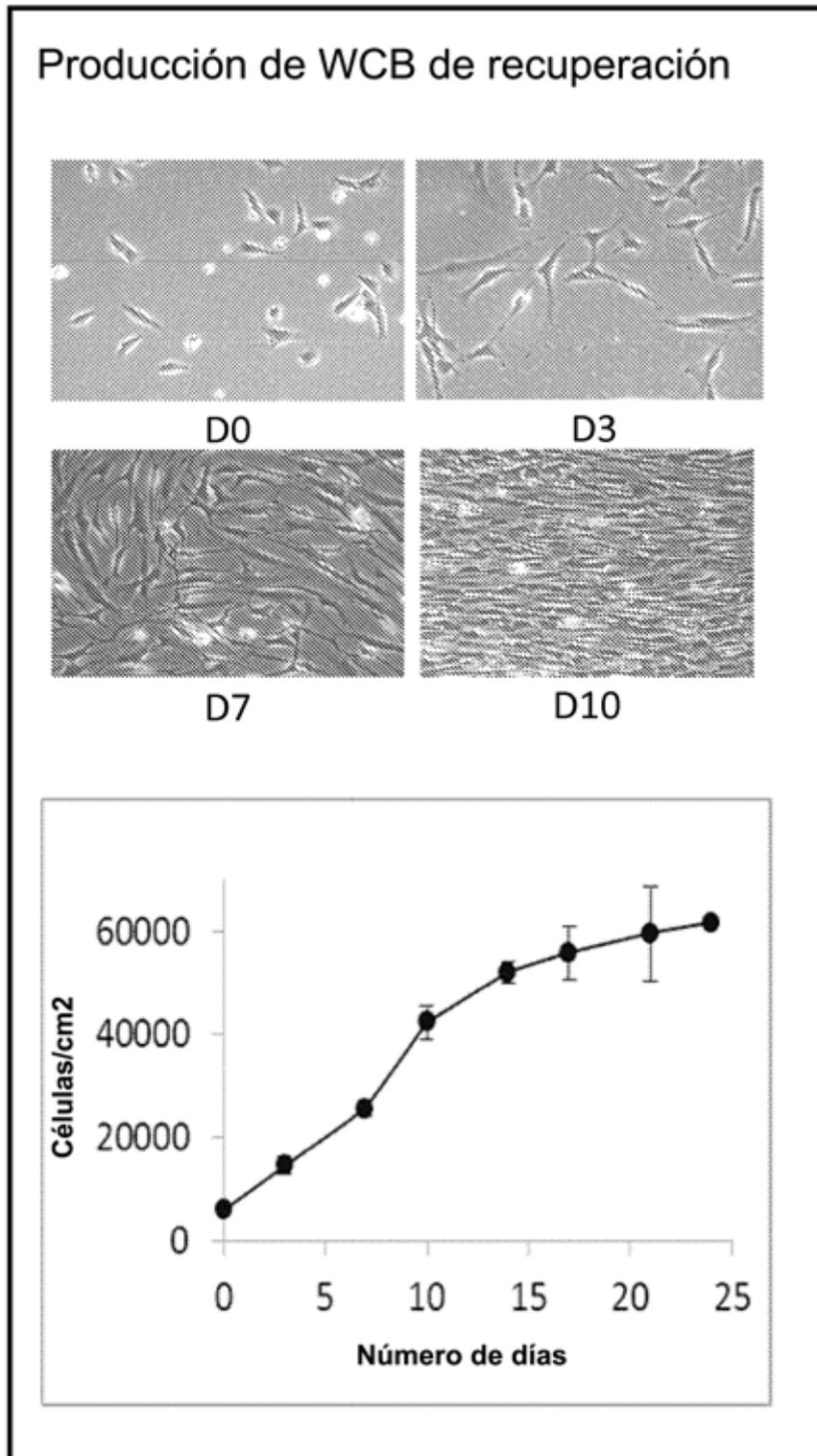


Figura 6

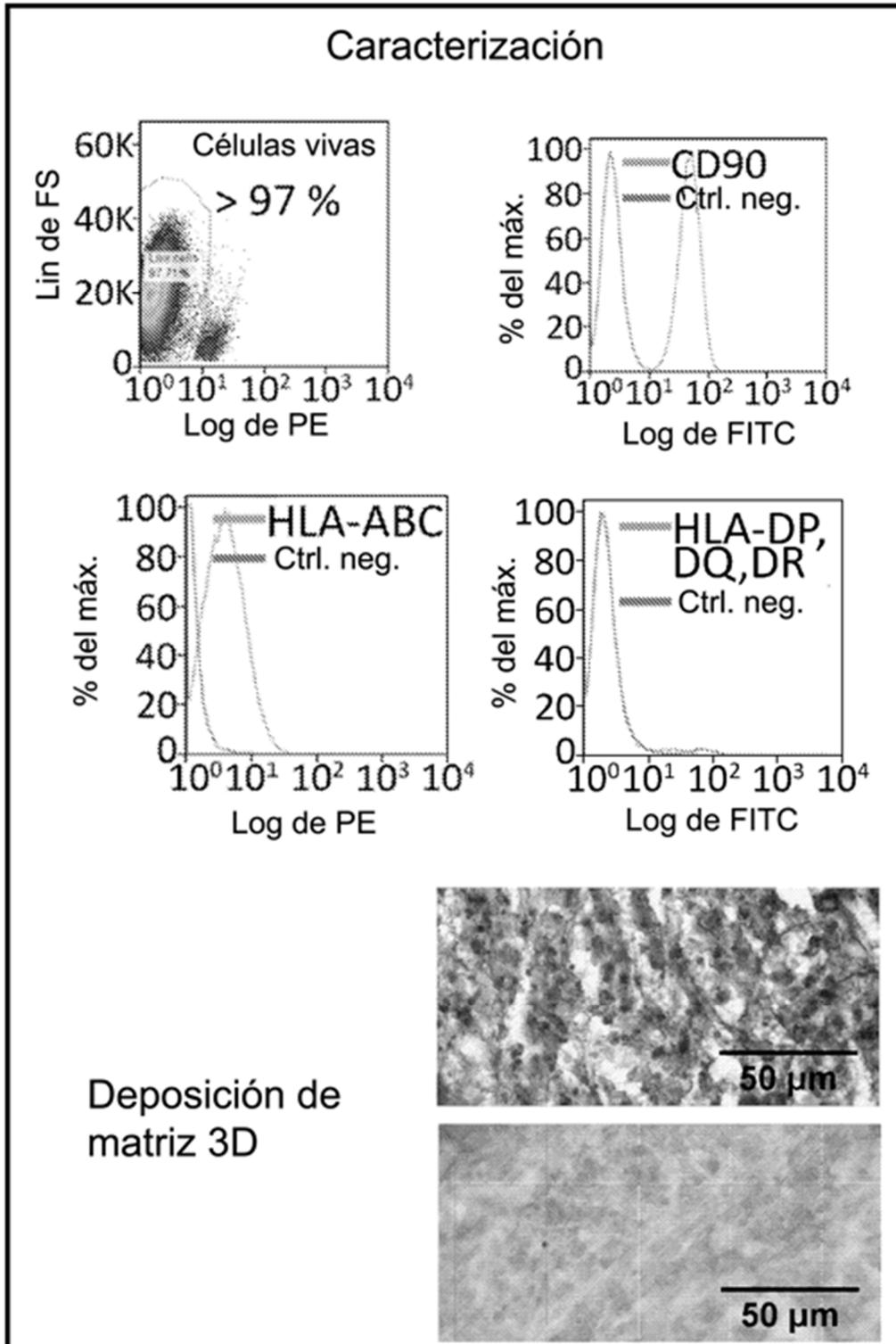


Figura 7

Banco de células parenterales
de condroprogenitores

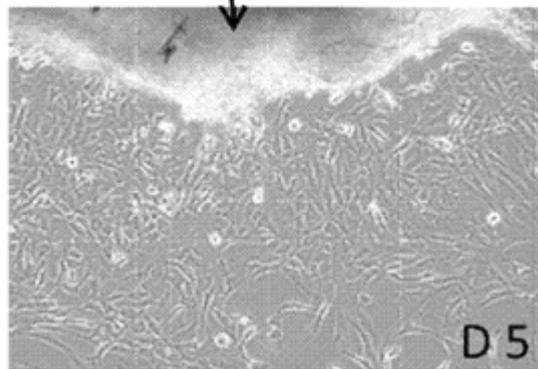
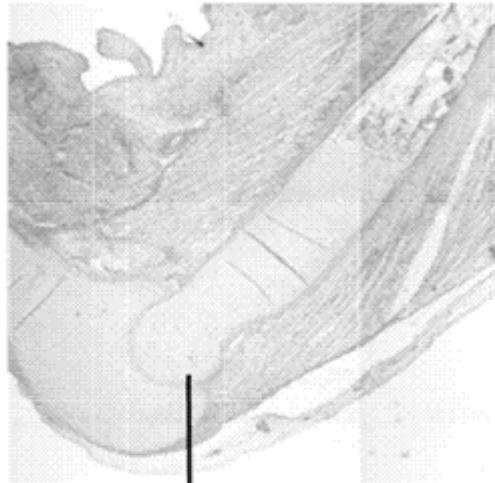
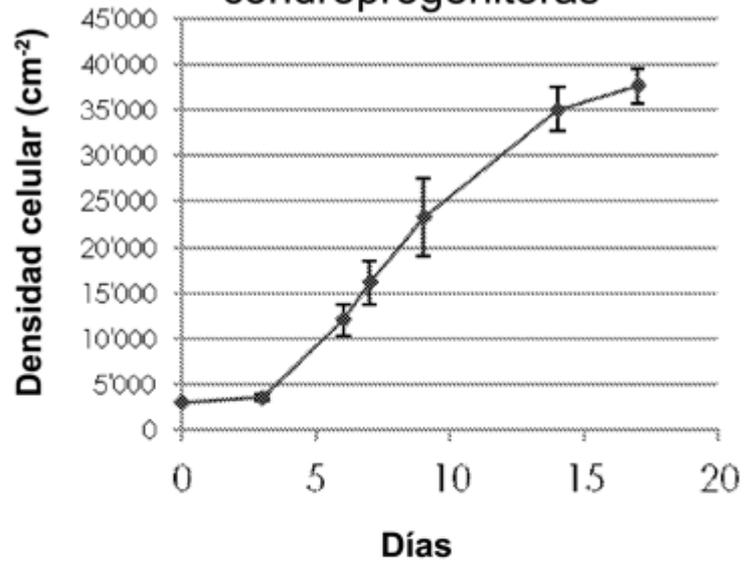


Figura 8
Crecimiento de células
condroprogenitoras



WCB de recuperación

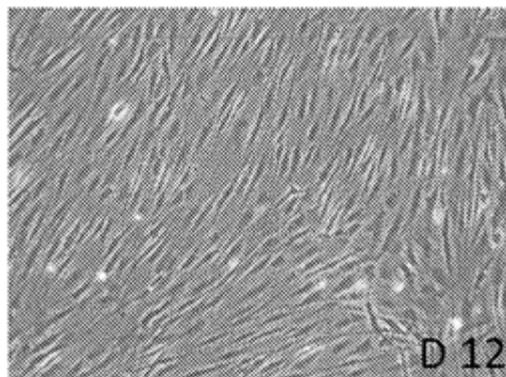
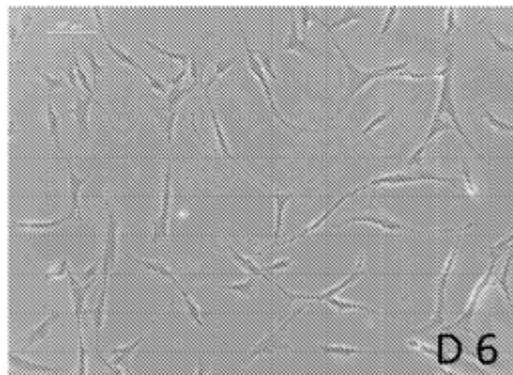


Figura 9

Caracterización de condroprogenitores

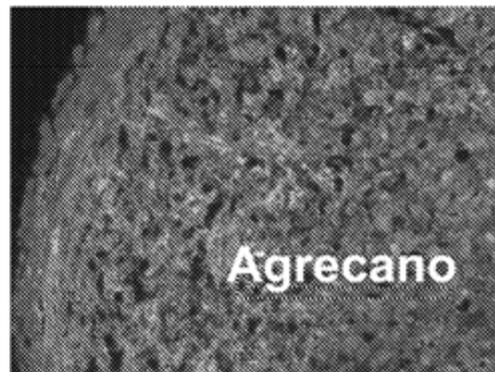
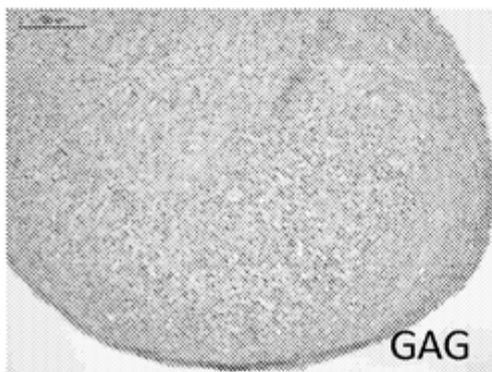
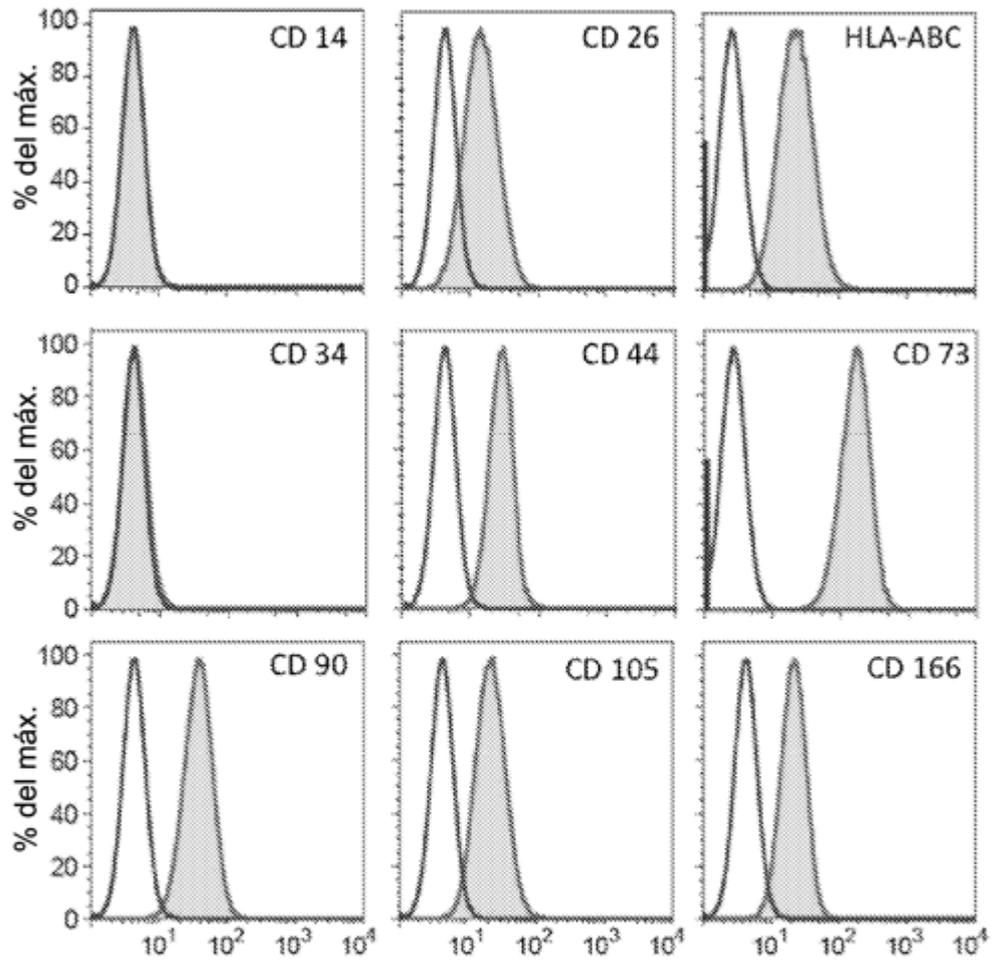
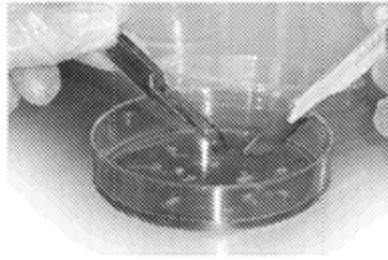
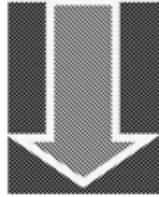


Figura 10



Disección de
tejido



Fragmentos de
tejido unidos con
bisturí a placa de
cultivo tisular

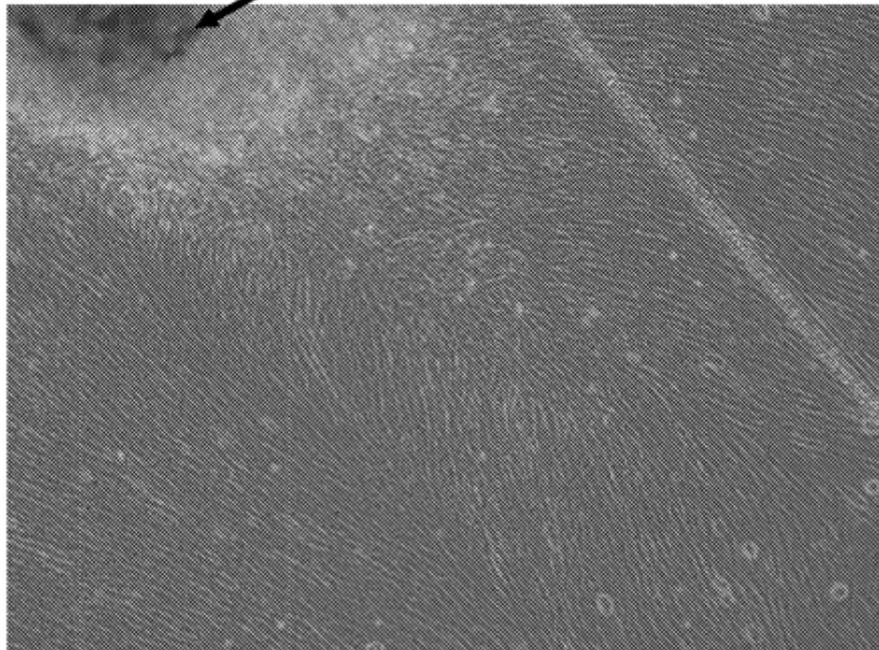
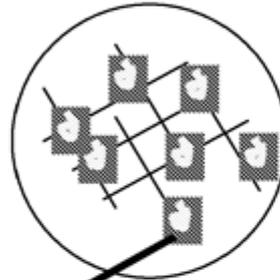


Figura 11

Creación rápida de un banco de células parenterales

