

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 204**

51 Int. Cl.:

A61K 35/32 (2015.01)

A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2010 PCT/AU2010/000360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10108237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10755333 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2411023**

54 Título: **Método de reparación tisular**

30 Prioridad:

27.03.2009 AU 2009901325

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

21.03.2018

73 Titular/es:

**ORTHOCELL LIMITED (100.0%)
Building 191, Murdoch University, South Street
Murdoch WA 6150, AU**

72 Inventor/es:

ZHENG, MING HAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 660 204 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de reparación tisular

5 Campo

La presente invención se refiere a un método de producción de una matriz implantable para la reparación de tejido. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para utilizar condrocitos de mamífero autólogos y un soporte implantable para la producción de una matriz implantable para la reparación de defectos tisulares.

10

Introducción

15 Existe una demanda creciente de nuevas estrategias de tratamiento para reparar daño tisular debido a las limitaciones de los regímenes de tratamiento convencionales y al envejecimiento de la población. Actualmente, las terapias basadas en células representan el estado de la técnica para el tratamiento de defectos en tejidos y órganos. Estas terapias implican la introducción de células progenitoras, preferentemente células madre, en el sitio del defecto, lo que estimula las poblaciones de células endógenas y aumenta la tasa de regeneración y reparación tisulares. Estas células a menudo son de naturaleza autóloga, se aíslan del paciente que necesita tratamiento y se expanden *in vitro* antes de devolverlas al paciente en el sitio del defecto.

20

Después de que las células explantadas se expanden, es una práctica común que las células se cultiven durante unos 4 a 10 días adicionales en un soporte o armazón. La composición de célula/armazón se implanta después en el sitio del defecto tisular. Un armazón se utiliza junto con células autólogas por tres razones principales: (1) para proporcionar un entorno que refleje la matriz extracelular, lo que se cree que facilita el crecimiento celular; (2) para estimular la formación de la arquitectura tisular; y (3) para proporcionar resistencia mecánica al tejido recién formado una vez implantado.

25

30 Sin embargo, hay una serie de problemas con los métodos actuales. En primer lugar, es ampliamente sabido que las células cultivadas *in vitro* durante períodos prolongados de tiempo se diferencian, lo que disminuye la capacidad de las células para proliferar y reparar tejido *in vivo*. En segundo lugar, el cultivo de células *in vitro* expone a las células a materiales extraños que pueden contener partículas contaminantes (tal como virus o bacterias) o productos químicos. Estos contaminantes, si no se detectan antes de la implantación, tienen el potencial de provocar enfermedad y morbilidad significativas. Adicionalmente, el riesgo de que las células se contaminen aumenta con la duración del tiempo en que las células se cultivan. Por último, las células cultivadas sobre armazones raramente penetran más de 500 µm desde la superficie externa, debido a la falta de nutrientes y de oxígeno. Como tal, a pesar de los esfuerzos para estimular la formación de la arquitectura tisular, no se pueden formar tejidos de espesor completo *in vitro*.

35

40 Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de identificar mejores modos de utilizar células y armazones en la reparación de tejidos.

40

Sumario

45 Los inventores han desarrollado un nuevo enfoque para la reparación de tejidos, que comprende la aplicación de células a un soporte implantable menos de 1 hora y 20 minutos antes de la implantación.

45

50 Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención proporciona un método de producción de una matriz implantable que comprende las etapas de: (a) proporcionar un soporte implantable que comprende colágeno reticulado o no reticulado, y una muestra de condrocitos de mamífero autólogos; y (b) aplicar dicha muestra de condrocitos de mamífero autólogos a la superficie de dicho soporte para producir dicha matriz implantable; en el que las células se dejan incubar durante entre aproximadamente 20 minutos a 1 hora y 20 minutos antes de la implantación de la matriz; en el que dicho soporte implantable comprende una membrana.

50

55 Es importante que las células no se cultiven *in vitro* con el soporte implantable antes de la implantación, sino que simplemente se les deje suficiente tiempo para adherirse al soporte implantable antes de la implantación.

55

60 Se apreciará que el tejido que necesita reparación puede ser cualquier tejido encontrado en un animal mamífero, incluyendo, pero sin limitación, epitelio, tejido conectivo o músculo. En algunas realizaciones el tejido es cartilago. De forma similar, se entenderá que las células utilizadas en los métodos de la invención como se describe en el presente documento, se pueden aislar a partir de cualquier tejido encontrado en un animal mamífero.

60

Las células se pueden aislar de cualquier animal mamífero incluyendo, pero sin limitación, una oveja, una vaca, un cerdo, un caballo, un perro, un gato o un humano. En otras realizaciones, las células se aíslan de un ser humano. En aún otras realizaciones, las células se aíslan del sujeto animal que necesita tratamiento.

65

En una realización, los condrocitos de mamífero son condrocitos humanos.

El soporte implantable puede ser cualquier tipo de soporte implantable utilizado para reparar tejidos. El soporte implantable comprende una membrana.

5 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la etapa de recubrir la matriz implantable, después de que los condrocitos de mamífero se hayan adherido, con un sellador de células antes de la implantación. El sellador de células puede ser cualquier adhesivo quirúrgico de tejidos. En algunas realizaciones, el sellador de células es un sellador de fibrina.

10 Se apreciará que el fin de la invención es implantar la matriz que comprende un armazón implantable y las células adheridas tan pronto como las células se hayan adherido al soporte, es decir, la matriz no se cultiva *in vitro* antes de la implantación. Por consiguiente, las células pueden aplicarse al soporte hasta aproximadamente 1 hora y 20 minutos antes de implantar la matriz implantable. Por ejemplo, las células pueden aplicarse al soporte entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora y 10 minutos antes de la implantación; entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora antes de la implantación o entre aproximadamente 40 minutos y aproximadamente 50 minutos antes de la implantación. En algunas realizaciones, las células se aplican al soporte aproximadamente 40 minutos antes de la implantación.

15 En una realización específica, el soporte implantable se calienta a entre 35 °C y 37 °C antes de aplicar los condrocitos de mamífero.

20 Los expertos en la materia apreciarán que el fin del tiempo corto (incubación) entre la aplicación o siembra de células en el soporte implantable y la implantación de la matriz producida (menos de 2 horas) es reducir la muerte celular de las células primarias que normalmente acompaña a un cultivo prolongado.

25 Por lo tanto, un método para aumentar la viabilidad de las células para la implantación comprende aplicar una muestra de células en un soporte implantable e implantar dicho soporte dentro de las 2 horas posteriores a la aplicación de las células en el mismo.

30 Las células implantadas pueden tener una viabilidad mayor al 90 % o mayor al 95 %. Las células implantadas pueden tener una viabilidad mayor al 99 % inmediatamente antes de la implantación.

35 Se apreciará que, debido a que las células de la presente invención tienen una alta viabilidad, las células también tendrán una expresión inferior de indicadores de apoptosis. En algunas realizaciones, los indicadores de apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en MMP-1, MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, IL-1, c-fos, c-jun, Oct3/4 y Sox2. En algunas realizaciones, los condrocitos de mamífero se suspenden en suero del propio sujeto antes de aplicarse al soporte implantable.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1: Comparación de la expresión génica en células humanas cultivadas con (barras oscuras) y sin (barras claras) un armazón de colágeno (* = p <0,05).
Figura 2: Adhesión celular dependiente del tiempo en un armazón de colágeno (* = p <0,05).

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

45 Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a los métodos ejemplificados de forma particular y puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares de la invención solamente y no se pretende que sea limitante, lo que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. Las publicaciones mencionadas en el presente documento se citan con el fin de describir y divulgar los protocolos y reactivos que se informan en las publicaciones, y que podrían utilizarse en relación con la invención. No debe interpretarse que nada en el presente documento sea un reconocimiento de que la invención no tenga derecho a antedatar tal divulgación en virtud de una invención anterior.

55 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de cultivo celular, biología celular y cirugía ortopédica, que están dentro de las habilidades en la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Coligan *et al.*, 1999 "Current protocols in Protein Science" Volumen I y II (John Wiley & Sons Inc.); Ross *et al.*, 1995 "Histology: Text and Atlas", 3ª Ed., (Williams & Wilkins); Kruse & Patterson (eds.) 1977 "Tissue Culture" (Academic Press); Canale (ed.) 2003 "Campbell's Operative Orthopaedics" 10ª ed. (St. Louis, Mo. : MD Consult LLC) y Alberts *et al.* 2000 "Molecular Biology of the Cell" (Garland Science).

60 Debe apreciarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto estipule claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células, y una referencia a "un soporte implantable" es una referencia a uno o más soportes implantables, y etcétera. A menos que se defina otra

cosa, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que el experto en la materia a la cual pertenece la presente invención entiende comúnmente.

5 Aunque para practicar o probar la presente invención se puede usar cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los materiales y métodos preferentes.

10 El término "tejido", como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de células de mamífero que están agrupadas y se especializan en la realización de una función particular. Las células pueden ser del mismo tipo, por ejemplo, tejido nervioso que comprende solo células nerviosas, o de muchos tipos distintos, por ejemplo tejido conectivo que comprende células tales como fibroblastos y adipocitos, así como poblaciones transitorias de células tales como mastocitos, macrófagos, monocitos, linfocitos, plasmocitos y eosinófilos. El tejido epitelial (epitelio), el tejido conectivo y el tejido muscular comprenden células que tienen características fenotípicas comunes entre especies. Por ejemplo, los epitelios de todas las especies de mamíferos generalmente comprenden una única capa de células que se mantienen unidas por uniones ocluyentes llamadas uniones estrechas. De forma más importante, todas las células en el epitelio de cualquier especie de mamífero tienen características de crecimiento similares.

15 El tejido conjuntivo comprende varias células, que son comunes para todas las especies de mamíferos. Por ejemplo, las células del tejido conjuntivo incluyen glóbulos sanguíneos (eritrocitos y leucocitos (leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos y linfocitos)), megacariocitos, fibroblastos (incluyendo condroblastos y osteoblastos), macrófagos, mastocitos, plasmocitos, adipocitos y osteoclastos. Los ejemplos de tejidos conjuntivos son los tendones, el cartílago y los ligamentos. El hueso y la sangre son ejemplos de tejidos conjuntivos especializados. El tejido muscular también comprende células (fibras) que tienen un ancestro común y, por lo tanto, una morfología, fisiología y características fenotípicas comunes.

20 Por consiguiente, como se usa en el presente documento, el término "tejido" se refiere a cualquier colección de células dentro de un animal mamífero que requiera reparación.

25 Partes blandas, como se usa en el presente documento, se refiere en general a estructuras extraesqueléticas que se encuentran en todo el cuerpo e incluyen, pero limitación, tejido cartilaginoso, tejido de menisco, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido de disco intervertebral, tejido periodontal, tejido cutáneo, tejido vascular, tejido muscular, tejido de aponeurosis, tejido perióstico, tejido ocular, tejido pericárdico, tejido pulmonar, tejido sinovial, tejido nervioso, tejido renal, médula ósea, tejido genitourinario, tejido intestinal, tejido hepático, tejido pancreático, tejido esplénico o tejido adiposo, y combinaciones de los mismos.

30 Afección (o lesión o enfermedad) de las partes blandas es una expresión inclusiva que abarca las afecciones, trastornos o enfermedades agudas y crónicas de las partes blandas. Por ejemplo, la expresión abarca afecciones provocadas por una enfermedad o traumatismo, o fracaso del tejido para desarrollarse normalmente. Los ejemplos de afecciones de partes blandas incluyen, pero sin limitación, hernias, daño del suelo de la pelvis, desgarramiento o rotura de un tendón o ligamento, herida superficial (por ejemplo, cicatrices, heridas traumáticas, heridas isquémicas, heridas diabéticas, quemaduras graves, úlceras cutáneas (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como las asociadas con la extirpación de cánceres de piel); afecciones vasculares (por ejemplo, vasculopatía tal como arteriopatía periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad carotídea y flebopatía; lesión vascular, desarrollo vascular incorrecto) y miopatías (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurógenas y miógenas, y distrofias musculares tales como la distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de la cintura y extremidades, distrofia facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia musculares oculofaríngeas, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss).

35 La presente invención se dirige a un método de producción de una matriz implantable para la reparación de cartílago. El término "cartílago" se refiere a un tipo de tejido conjuntivo que contiene condrocitos o células similares a condrocitos (que tienen muchas, pero no todas, características de los condrocitos) y material intercelular (por ejemplo, colágeno de los Tipo I, II, IX y XI), proteoglucanos (por ejemplo, sulfato de condroitina, sulfato de queratina y proteoglucanos de dermatán sulfato) y otras proteínas. El cartílago incluye cartílago articular y no articular.

40 El "cartílago articular", también denominado cartílago hialino, se refiere a un tejido conjuntivo avascular, no mineralizado, que cubre las superficies articulares de los huesos en las articulaciones y sirve como una interfaz de reducción de la fricción entre dos superficies óseas opuestas. El cartílago articular permite el movimiento en las articulaciones sin contacto directo entre huesos. El cartílago articular no tiene tendencia a la osificación. La superficie del cartílago parece lisa y perlada macroscópicamente, y es finamente granular a gran aumento. El cartílago articular obtiene nutrientes en parte de los vasos de la membrana sinovial vecina y en parte de los vasos del hueso que cubre. El cartílago articular está asociado con la presencia de colágeno de Tipo II y Tipo IX, y de diversos proteoglucanos bien caracterizados, y con la ausencia de colágeno de Tipo X, que está asociado con la formación de hueso endocondral. Para una descripción detallada de la microestructura del cartílago articular, véase, por ejemplo, Aydelotte y Kuettner, *Conn. Tiss. Res.*, 18, pág. 205 (1988); Zanetti *et al.*, *J. Cell Biol.*, 101, pág. 53 (1985); y Poole *et al.*, *J. Anat.*, 138, pág. 13 (1984).

"Cartílago no articular" se refiere a cartílago que no cubre las superficies articulares e incluye fibrocartílago (que incluye fibrocartílago interarticular, disco fibrocartilaginoso, fibrocartílago conjuntivo y fibrocartílago circunferencial) y cartílago elástico. En el fibrocartílago, la red de micropolisacáridos está entrelazada con haces de colágeno prominentes y los condrocitos están dispersos más ampliamente que en el cartílago hialino o articular. El fibrocartílago interarticular se encuentra en las articulaciones que están expuestas a una conmoción y están sujetas a movimientos frecuentes, por ejemplo, el menisco de la rodilla. Los ejemplos de tales articulaciones incluyen, pero sin limitación, las articulaciones temporomandibular, estemoclavicular, acromioclavicular, de la muñeca y de la rodilla. Las articulaciones cartilaginosas secundarias están formadas por discos de fibrocartílago. Tales discos fibrocartilaginosos, que se adhieren estrechamente a ambas superficies opuestas, constan de anillos concéntricos de tejido fibroso, con láminas cartilaginosas interpuestas. Un ejemplo de tal disco fibrocartilaginoso es el disco intervertebral de la columna vertebral. El fibrocartílago conjuntivo se interpone entre las superficies óseas de las articulaciones, lo que permite una leve movilidad entre los cuerpos de las vértebras y entre los huesos del pubis. El fibrocartílago circunferencial rodea el margen de algunas de las cavidades articulares, tal como la cavidad acetabular de la cadera y la cavidad glenoidea del hombro.

Los términos "que repara" o "reparar", o equivalentes gramaticales de los mismos, se utilizan en el presente documento para incluir la reparación de un defecto tisular en un animal mamífero, preferentemente un ser humano. "Reparar" se refiere a la formación de tejido nuevo suficiente para rellenar, al menos de forma parcial, un hueco o discontinuidad estructural en un sitio de defecto tisular. Sin embargo, reparar no significa, o necesita de otra forma, un proceso de curación completa o un tratamiento, que sea el 100 % eficaz en restaurar un defecto tisular a su estado fisiológico/estructural/mecánico anterior al defecto.

El término "defecto tisular" o "sitio de defecto tisular" se refiere a una alteración del epitelio, tejido conjuntivo o muscular. Un defecto tisular da como resultado un tejido que funciona a un nivel subóptimo o que se encuentra en una condición subóptima. Por ejemplo, un defecto tisular puede ser un desgarramiento de espesor parcial o de espesor completo en un tendón o el resultado de muerte celular local debida a un infarto en el músculo cardíaco. Un defecto tisular puede adoptar la configuración de un "hueco", que se entiende que significa un defecto tridimensional tal como, por ejemplo, un hueco, cavidad, agujero u otra alteración sustancial en la integridad estructural del epitelio, tejido conjuntivo o muscular. En determinadas realizaciones, el defecto tisular es tal que es incapaz de una reparación endógena o espontánea. Un defecto tisular puede ser el resultado de un accidente, enfermedad y/o manipulación quirúrgica. Por ejemplo, los defectos del cartílago pueden ser el resultado de un traumatismo en una articulación, tal como un desplazamiento del tejido del menisco rasgado en la articulación. Los defectos tisulares también pueden ser el resultado de enfermedades degenerativas tales como la osteoartritis.

En el nivel más básico, la matriz implantable producida por el método de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para la implantación de células en el sitio del defecto tisular. Estas células estimulan a las poblaciones de células endógenas y aumentan la tasa de regeneración y reparación tisulares.

Las células de la presente invención se pueden aislar de un tejido en una diversidad de modos, todos los cuales son conocidos para los expertos en la materia. En algunas realizaciones, las células se pueden aislar a partir de un material de biopsia por métodos convencionales. Como se describe con mayor detalle a continuación, en algunas realizaciones, las células se aíslan por digestión enzimática.

De acuerdo con la invención, el tejido que contiene las células de interés se aísla de cualquier animal mamífero incluyendo, pero sin limitación, una oveja, una vaca, un cerdo, un perro, un gato, un caballo o un ser humano. En otras realizaciones, el tejido se aísla de un ser humano. Preferentemente, el tejido se aísla de la misma especie de animal mamífero que tiene el defecto tisular.

De acuerdo con la invención, el tejido es "autólogo", es decir, está aislado del cuerpo del sujeto que necesita tratamiento. Por ejemplo, a un animal mamífero con un desgarramiento de cartílago en la rodilla se le puede hacer una biopsia tomada de cualquier cartílago en su cuerpo, por ejemplo, la parte media superior externa de los cóndilos femorales.

Las células pueden obtenerse a partir de material de biopsia mediante un tratamiento apropiado del tejido que debe servir como fuente de las células. Los expertos en la materia conocen técnicas para el tratamiento de tejido para aislar células, véase, por ejemplo, Freshney "Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique" 2ª ed. (A. R. Liss Inc.). Por ejemplo, el tejido u órgano puede romperse de forma mecánica y/o tratarse con enzimas digestivas o agentes quelantes para debilitar las interacciones entre las células, haciendo posible obtener una suspensión de células individuales. Normalmente, el método incluirá una combinación de rotura mecánica, tratamiento enzimático y agentes quelantes. En una técnica, el tejido se pica y se trata de forma simultánea o posteriormente con cualquiera de una serie de enzimas digestivas, ya sea solas o en combinación. Los ejemplos de enzimas útiles en la disociación de células incluyen, pero sin limitación, tripsina, quimotripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, ADNasa, pronasa, dispasa y similares. En algunas realizaciones, para disociar células se utilizan composiciones enzimáticas que contienen una mezcla acuosa de colagenasa, que tiene una actividad de aproximadamente 43 nkat/ml a aproximadamente 51 nkat/ml y quimopapaína, que tiene una actividad de aproximadamente 0,22 nkat/ml a aproximadamente 0,44 nkat/ml, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.422.261. La rotura

mecánica también se puede llevar a cabo por, por ejemplo, el uso de mezcladores, tamices, homogeneizadores, celdas de presión o similares.

5 La suspensión de células y agregados celulares resultantes se puede dividir adicionalmente en poblaciones de tipos celulares sustancialmente homogéneos. Esto se puede llevar a cabo utilizando técnicas convencionales para la separación de células que incluyen, por ejemplo, métodos de selección positiva (por ejemplo, expansión clonal y selección de tipos celulares específicos), selección negativa (por ejemplo, lisis de células no deseadas), separación basada en densidad específica en una solución con densidad, las propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y similares. Se conocen en la técnica otros métodos de selección y separación, véase, por ejemplo, Freshney "Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique" 2ª ed. (A. R. Liss Inc.).

15 En algunas realizaciones, una vez aisladas las células se aplican inmediatamente a un soporte implantable. Por consiguiente, el procedimiento de biopsia que aísla las células y el procedimiento de reparación que implica la implantación de las células aisladas en el sitio del defecto se pueden realizar de forma secuencial en una única cirugía.

20 Como alternativa, en otras realizaciones, las células aisladas se cultivan durante un corto período de tiempo para aumentar la cantidad de células antes de aplicarlas al soporte implantable. Los reactivos y métodos empleados para cultivar las células variarán, por supuesto, dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, si las células son células musculares, el medio de cultivo puede comprender la mezcla nutritiva de Ham F-10 con extracto de embrión de pollo al 0,5 % y suero de fetal ternera o suero de caballo al 20 % (vol/vol). Como alternativa, si las células son células epiteliales, el medio de cultivo puede comprender medio de Eagle modificado por Dulbecco mezclado con medio F12 de Ham con suero fetal de ternera aproximadamente al 5 %. Sin embargo, un experto en la técnica sabría cómo elegir el medio de cultivo celular apropiado para el tipo celular a cultivar. Además, también se pueden emplear diversos aditivos para medios, incluyendo antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, complementos nutritivos, vitaminas, minerales y similares. De nuevo, un experto en la materia sabría qué aditivos se necesitan para cultivar un tipo celular particular.

30 El período de tiempo durante el que se cultivan las células también variará. El tiempo de cultivo puede ser dependiente del tipo de células que se cultivan y de la cantidad de células necesaria, así como de factores logísticos, tal como cuándo se necesitan las células. Sin embargo, es un aspecto importante de la invención que las células no se cultivan durante un período de tiempo lo suficientemente prolongado como para afectar la diferenciación celular o el fenotipo celular. Preferentemente, las células aisladas se cultivan durante no más de aproximadamente 10 días. Sin embargo, las células pueden cultivarse durante entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 9 días; entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 8 días; entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 7 días; entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 6 días; o aproximadamente 5 días. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante aproximadamente 4 días.

40 También es un aspecto importante de la invención que las células no se cultivan con ningún tipo de soporte implantable, lo que induce la diferenciación celular y los cambios en el fenotipo celular.

45 El término "soporte implantable" se refiere a cualquier matriz o armazón que sea adecuado para su uso en la implantación de células con o sin un adhesivo. De acuerdo con la presente invención, el soporte implantable comprende una membrana.

50 El soporte implantable comprende colágeno reticulado o no reticulado. En algunas realizaciones, el soporte implantable está fabricado de un material semipermeable que puede incluir colágeno reticulado o no reticulado, preferentemente de tipo I en combinación con el tipo III o tipo II. El soporte implantable también puede incluir polipéptidos o proteínas obtenidas de fuentes naturales o mediante síntesis, tales como ácido hialurónico, submucosa del intestino delgado (SID), peritoneo, pericardio, ácidos polilácticos y ácidos relacionados, sangre (es decir, que es un tejido en circulación que incluye una porción líquida (plasma) con elementos sólidos de la sangre (eritrocitos, leucocitos, trombocitos) u otro material que sea biorreabsorbible. Los polímeros biorreabsorbibles, tal como la elastina, la fibrina, la laminina y la fibronectina, también son útiles en la presente invención. Los materiales de matriz de soporte o de armazón como se describen en la Publicación de Estados Unidos N.º 20020173806, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, también son útiles en la presente invención.

60 Preferentemente, el soporte implantable está, de forma inicial (es decir, antes del contacto con las células a implantar) libre de células intactas y preferentemente es reabsorbible dentro del animal mamífero. El soporte implantable puede tener una o varias superficies, tal como una superficie porosa, una superficie densa o una combinación de ambas. El soporte implantable también puede incluir superficies semipermeables, impermeables o completamente permeables. Se describen armazones de soporte que tienen una superficie porosa en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.569.172.

El soporte implantable puede ser autólogo o alogénico. En algunas realizaciones, se forma un soporte implantable autólogo adecuado a partir de sangre, como se ejemplifica en la patente de Estados Unidos N.º 6.368.298, concedida para Berretta, *et al.* el 9 de abril de 2002.

5 Un soporte implantable adecuado puede ser un armazón sólido, semisólido, de gel o de tipo gel, caracterizado por tener la capacidad de mantener una forma estable durante un período de tiempo para permitir la adherencia y/o el crecimiento de las células sobre el mismo. Los ejemplos de soportes implantables adecuados se describen en la Publicación de Estados Unidos N.º 20020173806.

10 Los ejemplos adicionales de soportes implantables adecuados para el cultivo de tenocitos incluyen Vitrogen™, una solución que contiene colágeno que gelifica para formar una matriz poblada de células, y los armazones de tejido conjuntivo de Hwang (solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20040267362), Kladaki *et al.* (solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20050177249), Giannetti (solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20040037812) y Binette *et al.* (solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20040078077).

15 El soporte implantable se puede cortar o formar con cualquier forma regular o irregular. En algunas realizaciones, el soporte implantable se puede cortar para que corresponda con la forma del desgarro. El soporte implantable puede ser de forma plana, redonda y/o cilíndrica. La forma del soporte implantable también puede moldearse para que se ajuste a la forma de un defecto particular que necesita reparación. Si el soporte implantable es un material fibroso o
20 tiene las características de una fibra, la matriz del soporte se puede tejer con una forma deseada. Como alternativa, el bioarmazón puede ser un material de gel, de tipo gel o no tejido.

En algunas realizaciones, el soporte implantable está compuesto por colágeno de tipo I/III obtenido de porcino, por ejemplo, ACI Matrix™. En otras realizaciones, el soporte implantable está compuesto por submucosa del intestino
25 delgado, por ejemplo Restore™.

La muestra de células aislada se aplica al soporte implantable para formar una "matriz implantable". A diferencia de los métodos convencionales, el método de la presente invención requiere que la muestra de células se aplique al
30 soporte implantable durante menos de 2 horas antes de usar la matriz implantable. Como se discute en otra parte, los métodos convencionales requieren que las células se cultiven con un soporte implantable durante varios días antes de la implantación. Sin embargo, los inventores de la presente invención han descubierto que puede conseguirse el 100 % de adhesión de las células a un soporte implantable en menos de 2 horas y que las células cultivadas con un soporte implantable, por ejemplo, un armazón de colágeno, tienen una viabilidad inferior que las células cultivadas sin un soporte implantable.

35 Por consiguiente, un método para aumentar la viabilidad de las células para la implantación es poner en contacto las células para la implantación con un soporte implantable menos de 1 hora y 20 minutos antes de que deban implantarse las células y el soporte.

40 Los métodos para medir la viabilidad de una población celular son bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede medirse la expresión de indicadores de apoptosis. La expresión "indicador de apoptosis", como se usa en el presente documento, se refiere a genes o a los productos correspondientes, que se expresan cuando una célula experimenta apoptosis. Como tal, una población de células con alta viabilidad tendrá menos expresión de
45 indicadores de apoptosis que una población de células con una menor viabilidad. Los ejemplos de indicadores de apoptosis incluyen metaloproteasas de matriz (por ejemplo, MMP-1, MMP-9, MMP-13), ADAMTS-4, IL-1, c-fos, c-jun, Oct3/4 y Sox2.

Otros métodos de la técnica anterior, tal como el divulgado en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2002/0155096 (en lo sucesivo en el presente documento "US 2002/0155096"), describen la aplicación de células madre en un armazón de forma directa o inmediatamente antes de la implantación. Sin embargo, el tiempo utilizado
50 en US 2002/0155096 es debido al uso de una matriz de alginato, que se debilita si se empapa en la solución de células durante un tiempo demasiado prolongado (Ejemplo 5, página 7). Por el contrario, el presente método requiere que las células se apliquen al soporte alrededor de al menos 20 minutos antes de la implantación, para permitir que se adhiera al soporte una cantidad suficiente de células. La aplicación de las células al soporte menos
55 de aproximadamente 7 minutos antes de la implantación puede dar como resultado que se pierda una gran cantidad de células del soporte tras la implantación, lo que puede dar como resultado una reparación tisular subóptima.

Antes de implantar la matriz implantable, la matriz puede recubrirse con un sellador de células. Los selladores celulares permiten que el armazón sembrado con células se fije a una zona que se está tratando, como un defecto
60 tisular. El sellador de células también podría estimular la proliferación y la migración de células en la zona del defecto (véase, por ejemplo, Kirilak y Zheng *et al.*, 2006, *Int. J. Mol. Med.*, 17(4):551-8, incorporado en el presente documento como referencia). Los selladores celulares pueden ser una diversidad de agentes naturales y sintéticos, e incluyen selladores de fibrina, adhesivos marinos, vellón de colágeno, esponjas de gelatina, derivados de cianoacrilato y polímeros de glucosa que incluyen derivados de dextrano. El sellador de células utilizado para la presente invención puede variar dependiendo del tejido que se está reparando. Por ejemplo, los cianoacrilatos son bacterioestáticos para muchas bacterias y, como tales, se utilizan frecuentemente en periodoncia y cirugía oral. La
65

albúmina bovina y el pegamento de glutaraldehído (BioGlue; CryoLife, Inc., Kennesaw, Georgia) están autorizados para su uso durante la reparación quirúrgica de la disección aórtica torácica aguda. El sellador de fibrina, también denominado "pegamento de fibrina" o "adhesivo tisular de fibrina", compuesto por fibrinógeno humano purificado, con virus inactivado, trombina humana y, en ocasiones, componentes añadidos, tales como el factor XIII humano con virus inactivado y la aprotinina bovina. Los selladores de fibrina se utilizan actualmente en una serie de especialidades quirúrgicas, incluyendo la cirugía cardiovascular, la cirugía torácica, la neurocirugía, la cirugía plástica y reparadora, y cirugía maxilofacial. En algunas realizaciones, el sellador de células es una combinación de polímeros de glucosa y polilisina, que potencia la unión celular y reduce el sangrado durante la cirugía.

Una vez ensamblado, la matriz implantable puede asegurarse en su lugar mediante cualquier medio convencional conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, sutura, anclajes para sutura, dispositivos de fijación ósea y tornillos para huesos o de polímero biodegradable. En el caso en que se necesite un armazón sembrado con células para reparar un defecto no contenido del cartílago articular, se pueden utilizar tornillos biodegradables junto con pegamento de fibrina para asegurar la fijación del armazón al defecto.

Las composiciones como se divulgan en las realizaciones de la invención pueden ser parte de un kit. Normalmente, el kit también incluye instrucciones de uso.

A continuación se describirá adicionalmente la invención a modo de referencia solo a los siguientes ejemplos no limitantes. Debería entenderse, sin embargo, que los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no deben tomarse de ningún modo como una restricción sobre la generalidad de la invención descrita anteriormente.

EJEMPLO 1 TRATAMIENTO DE UN DEFECTO DEL CARTÍLAGO UTILIZANDO CÉLULAS AUTÓLOGAS CON UN SOPORTE IMPLANTABLE

Se escindió un trozo de cartílago de 100 g de la zona de la articulación que no soporta peso y se colocó en medio nutritivo sin suero. Cada biopsia, que contenía aproximadamente 100 a 200 mil células, se expandió *in vitro* hasta aproximadamente 10 millones de células mediante el método descrito en la patente (PCT/AU2007/000362 titulada "Método de cultivo de tenocitos" atribuida a Zheng). Después de conseguir una densidad celular aceptable, las células se reconstituyeron en el suero de los propios pacientes en un recipiente de vidrio sellado y se transportaron a un sitio para la implantación. A la llegada al quirófano, las células se vuelven a calentar a 37 °C y se inyectan sobre la superficie de un armazón utilizando una aguja de calibre 23. Un armazón utilizado típico fue uno como se describe anteriormente, que consiste en un colágeno con/sin recubrimiento de polilisina. Después de la inyección de las células sobre el armazón, las células se expandieron sobre el armazón y se dejaron incubar durante no más de 2 horas antes de la implantación. El tiempo controlado para la expansión celular permitió a las células unirse, pero no anclarse en el armazón, permitiendo de este modo una rápida migración de las células hacia la zona de defecto del cartílago después de haber implantado el armazón sembrado con células.

Como se muestra en la Figura 1, la expresión de varios genes en células humanas cultivadas con (barras oscuras) o sin (barras claras) un armazón de colágeno, es significativamente distinta (* = $p < 0,05$). En particular, las células cultivadas con el armazón producen menos colágeno de tipo I y tipo II, y más MMP-1, MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, IL-1, c-fos, c-jun, Oct3/4 y Sox2, que son indicadores de apoptosis. Estos resultados demuestran que las células cultivadas en un soporte implantable son menos viables que las células cultivadas sin un soporte implantable.

La Figura 2 muestra que se adhiere al armazón un número significativo de células al cabo de 7 minutos de entrar en contacto con el armazón. Puede conseguirse una adhesión del 100 % de las células al armazón al cabo de 40 minutos. A los 20 minutos, el 90 % de las células están adheridas al armazón. Por consiguiente, estos resultados demuestran que pueden conseguirse altos niveles de adherencia poniendo en contacto células con un soporte implantable menos de 2 horas antes de la implantación. Sin embargo, estos resultados también indican que las células deben ponerse en contacto con un soporte implantable al menos aproximadamente 7 minutos antes de la implantación, para permitir que un número suficiente de células se adhiera al armazón.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una matriz implantable que comprende las etapas de:
 - 5 (a) proporcionar un soporte implantable que comprende colágeno reticulado o no reticulado, y una muestra de condrocitos de mamífero autólogos; y
 - (b) aplicar dicha muestra de condrocitos de mamífero autólogos a la superficie de dicho soporte para producir dicha matriz implantable;
- 10 en el que las células se dejan incubar durante entre aproximadamente 20 minutos a 1 hora y 20 minutos antes de la implantación de la matriz; en el que dicho soporte implantable comprende una membrana.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los condrocitos de mamífero son condrocitos humanos.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los condrocitos de mamífero se dejan incubar durante aproximadamente 40 minutos antes de la implantación de la matriz.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente la etapa de recubrir la matriz implantable, después de que los condrocitos de mamífero se hayan adherido, con un sellador de células antes de la implantación.
- 20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el sellador de células es un sellador de fibrina.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el soporte implantable se calienta a entre 35 °C y 37 °C antes de aplicar los condrocitos de mamífero.
- 25 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los condrocitos de mamífero se suspenden en suero de los propios sujetos antes de aplicarlos al soporte implantable.

FIGURA 1A

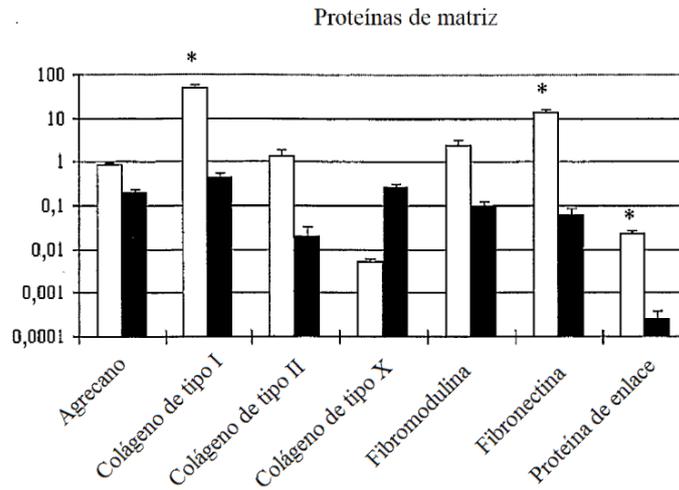


FIGURA 1B

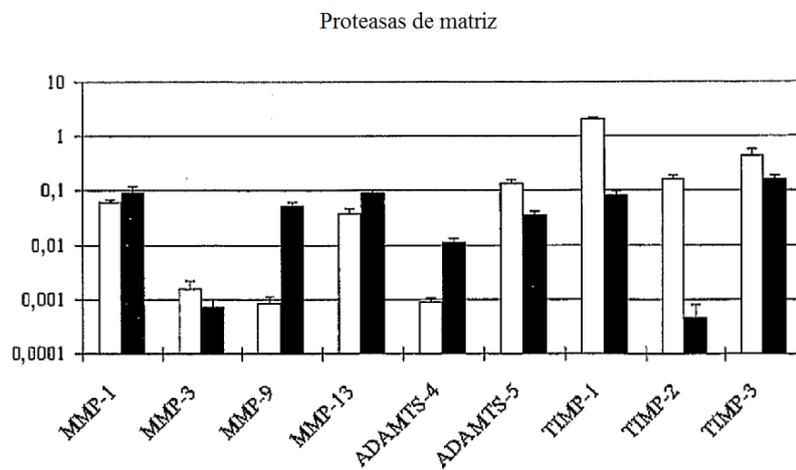


FIGURA 1C

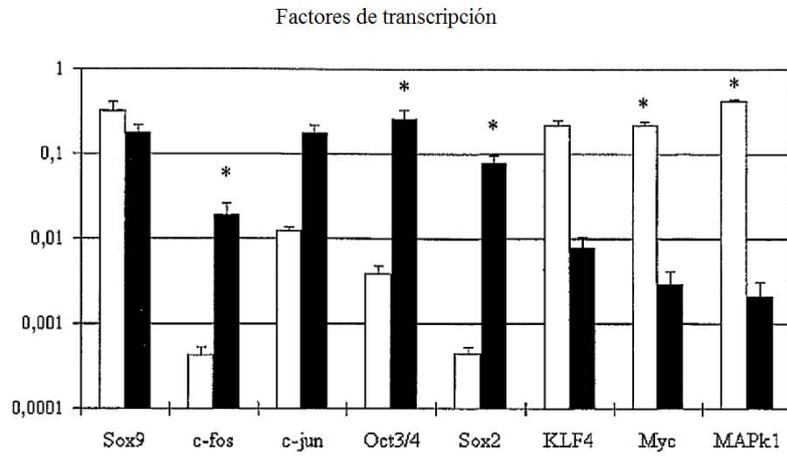


FIGURA 1D

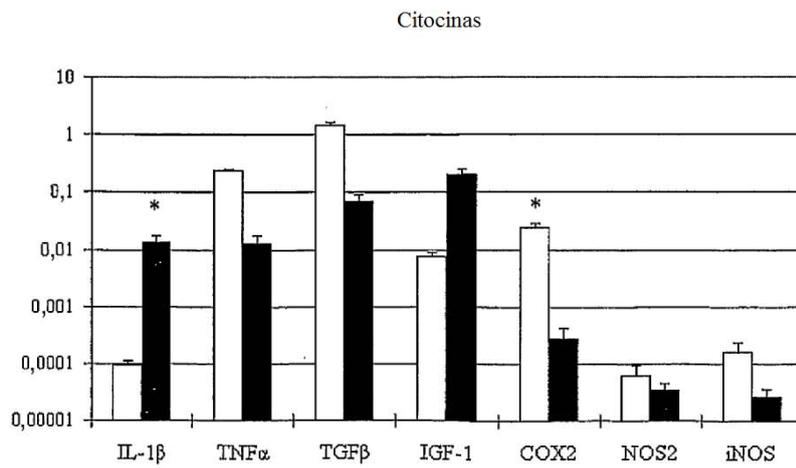


FIGURA 2

