

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 885**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2007 PCT/AU2007/000362**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2007 WO07106949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2007 E 07718609 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2004805**

54 Título: **Método de cultivo de células tenocitos**

30 Prioridad:

**23.03.2006 AU 2006901495**

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

**10.04.2018**

73 Titular/es:

**ORTHOCELL LTD (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 2 662 885 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 cultivo de células tenocitos

5 Campo

La presente invención se refiere a un método de cultivo de tenocitos. En particular, la presente invención se refiere a un método de cultivo de tenocitos para producir un cultivo sustancialmente puro de tenocitos usando un medio selectivo.

10

Antecedentes

15 El cultivo celular es una técnica que presenta numerosas aplicaciones; sin embargo, algunas células, tales como tenocitos, hepatocitos, osteoblastos, mioblastos y cardiomiocitos pueden ser difíciles y/o tardan en cultivarse y/o tienden a mostrar un fenotipo inestable y desdiferenciarse en cultivo. El uso de tenocitos cultivados tendría aplicación, entre otros, en la reparación de tendones y ligamentos dañados.

20 Un ejemplo común de daño a un tendón es un desgarro en el tendón del manguito rotador. Esto resulta generalmente de la actividad general y muestra una alta presentación clínica. La pérdida de la integridad del tendón del manguito rotador resulta en mediciones deterioradas de fuerza y un intervalo de movimiento y función reducidos. Aunque la reparación quirúrgica de los desgarros del tendón del manguito rotador logra altos niveles de mejora funcional y satisfacción del paciente, algunas reparaciones de tendones, especialmente de desgarros grandes y retraídos, no logran curarse o posteriormente vuelven a desgarrarse después de la cirugía. La cirugía de revisión para la reparación fallida del manguito rotador tiene muy poco éxito en comparación con el tratamiento primario.

25

El principio fundamental de la reparación del tendón es prevenir la apoptosis de los tenocitos y restaurar los tenocitos normales dentro del tendón dañado, pero esto requiere el desarrollo de tenocitos fenotípicamente estables cultivados *in vitro*. Sin embargo, se requieren grandes cantidades de tenocitos para la regeneración de un tendón o ligamento. Además, los tenocitos deben ser de un fenotipo lo más cercano posible a los tenocitos encontrados en el cuerpo. Idealmente, los tenocitos cultivados son autólogos para el sujeto que requiere la reparación del tendón.

30

35 Actualmente, no existen métodos adecuados de cultivo de tenocitos con un grado suficiente de uniformidad que puedan usarse para reparar daños en tendones o ligamentos. Muchos de los procedimientos descritos en la literatura implican el cultivo de tendones intactos o, en el mejor de los casos, de tendones picados, en presencia de factores de crecimiento tales como los factores de crecimiento tipo insulina I o II (IGF-I o IGF-II) (véase, por ejemplo, Dahlgren *et al.*, 2001, *AJVR*, 62(10): 1557-1562; Kang y Kang, 1999, *Yonsei Med. J.*, 40(1): 26-29; Abrahamsson, 1996, *J. Ortho. Res.*, 15: 256-262; Abrahamsson y Lohmander, 1996, *J. Ortho. Res.*, 14: 370-376; Abrahamsson *et al.*, 1991, *Ortho. Res. Soc.*, 9: 495-502 y 503-515. y Anitua *et al.*, 2005, *J. Ortho. Res.*, 23: 281-286). Si bien estos métodos demuestran una mejora del crecimiento de células "tipo tendón" o "derivadas de tendones", está bien establecido que los tendones no comprenden únicamente tenocitos. De hecho, la mayoría de las células en los tendones son fibroblastos junto con células endoteliales, células sinoviales y algunos condrocitos. En consecuencia, los métodos conocidos de cultivo de células de tendón no dan como resultado cultivos puros de tenocitos, sino una población mixta de células que comprende fibroblastos, células endoteliales y un número pequeño de tenocitos. Es bien sabido que los tenocitos son células de crecimiento lento y, como tales, a menudo sobrecrecen con otras células presentes en cultivo. Esto significa que los métodos de la técnica anterior de cultivo de células derivadas de tendones producen generalmente tenocitos insuficientes para su uso en procedimientos de reparación de tejidos.

40

45

En consecuencia, existe la necesidad de un método de cultivo de células tenocitos suficientes para permitir su uso en procedimientos de reparación de tejidos.

50

Sumario

55 En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona un medio de cultivo de tenocitos que comprende insulina o un derivado funcional. El medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0006 % en p/v de insulina. El medio de cultivo comprende además aproximadamente 0,0002 % en p/v de betametasona.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo de tenocitos consiste esencialmente en insulina y betametasona. En estos medios, los expertos en la materia apreciarán que los ingredientes no esenciales del medio de cultivo incluyan suero, antibióticos y cualquier otro suplemento de cultivo típico conocido en la técnica.

60

En consecuencia, el medio de cultivo del primer y segundo aspectos puede comprender además suero, tal como suero bovino fetal (SBF). El medio de cultivo puede comprender aproximadamente 15 % en v/v de suero.

65 El medio de cultivo del primer aspecto puede comprender además un antibiótico. En algunas realizaciones, el antibiótico se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en ampicilina, carbenicilina, penicilina, anfotericina, nistatina, polimixina-B, gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin, una tetraciclina, un macrólido,

linomicina, tiamutina y cloranfenicol. El medio de cultivo puede comprender 1 % en v/v de antibiótico.

El medio de cultivo del primer aspecto puede comprender además L-prolina y en algunas realizaciones comprende 0,0006 % en p/v de L-prolina.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método de cultivo de un tenocito, que comprende la etapa de incubación del tenocito en un medio de cultivo del primer aspecto de la invención. En algunas realizaciones, el tenocito se cultiva en 10 % de CO<sub>2</sub>. En otras realizaciones, el tenocito está en un cultivo 2-D. En otras realizaciones, el tenocito se ha extraído del tejido de tendón y/o de ligamento usando tripsina y colagenasa.

En algunas realizaciones, el método de cultivo de tenocitos de la presente invención da como resultado un cultivo sustancialmente puro de tenocitos (p. ej., al menos 80 %, preferentemente 90 %, más preferentemente al menos 95 % de todas las células presentes son tenocitos).

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método de producción de una matriz o armazón de soporte sembrado con células tenocitos que comprende las etapas que consisten en (i) proporción de una matriz o armazón de soporte útil para la reparación de tejidos, (ii) aislado de un tejido que contiene tenocitos, lavado y picado del mismo para formar explantes, (iii) cultivo de dichos explantes en presencia de un medio de cultivo de tenocitos que comprende aproximadamente 0,0006 % en p/v de insulina y aproximadamente 0,0002 % de betametasona para producir tenocitos libres, en el que al menos el 90 % de las células presentes en el cultivo son tenocitos y (iv) puesta en contacto de dicha matriz o armazón de soporte con células tenocitos de la etapa (iii) durante un tiempo suficiente para permitir que dichas células tenocitos se adhieran a dicha matriz o armazón.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de una amplificación por RT-PCR e ilustra que los tenocitos mantienen su fenotipo *in vitro* cuando se detectaron ambas bandas de colágeno I y III. Las bandas 1, 3 y 5 son tejido de tendón, mientras que las bandas 2, 4 y 6 son procedentes del cultivo de tenocitos *in vitro*. Las bandas 1 y 2 representan ARNm de colágeno tipo I.

Descripción detallada

Antes de describir las realizaciones preferentes en detalle, queda entendido que la terminología usada en la presente memoria tiene el fin de describir únicamente realizaciones particulares de la invención y no tiene por objeto ser limitante.

Ha de observarse que como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen una referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "una célula" incluye una pluralidad de células y "una molécula" se refiere a una pluralidad de moléculas, y así sucesivamente. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

En una realización, la presente invención proporciona un medio de cultivo de células tenocitos. Las expresiones "medio de cultivo de células tenocitos" y "medio de cultivo" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a una solución de nutrientes usada para el crecimiento selectivo de células tenocitos. Si bien el medio de cultivo de la presente invención comprende componentes específicos como se describe *supra* e *infra*, otros ingredientes no esenciales también se incluyen y estos dependerán de la fuente animal de los tenocitos o del tejido que contiene tenocitos y las condiciones de cultivo usadas, p. ej., densidad celular y/o uso final. El medio de cultivo de tenocitos comprende generalmente una mezcla de materiales orgánicos e inorgánicos y proporciona normalmente al menos un componente de una o más de las siguientes categorías:

- 1) una fuente de energía, usualmente en forma de un carbohidrato tal como glucosa;
- 2) todos los aminoácidos esenciales, y generalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína;
- 3) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos en bajas concentraciones;
- 4) ácidos grasos libres; y
- 5) oligoelementos, en el que los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos o elementos de origen natural que normalmente se requieren en concentraciones muy bajas, generalmente en el intervalo micromolar.

El medio de cultivo puede suplementarse opcionalmente con uno o más componentes de cualquiera de las siguientes categorías:

- 1) hormonas y otros factores de crecimiento, por ejemplo, transferrina y factor de crecimiento epidérmico;
- 2) sales y tampones, por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato;
- 3) nucleósidos y bases tales como adenosina y timidina, hipoxantina; y
- 4) hidrolizados de proteínas y tejidos.

Normalmente, el medio de cultivo comprende un medio de cultivo comercialmente disponible, tal como medio basal de Eagle (BME), medio BGJb, medio BMOC-3 de Brinster, medio de CMRL, medio independiente de CO<sub>2</sub>, medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), mezclas de nutrientes F-10, mezclas de nutrientes F-12, medios esenciales mínimos de Glasgow, opción Zn<sup>++</sup> de MEM mejorado (modificación de Richter), medios de Dulbecco modificados por Iscove, medios L-15 de Leibovitz, medios 5A de McCoy (modificados), medio MCDB 131, medio NCTC-109, medio esencial mínimo (MEM), medio de Eagle modificado (MEM), medios de suero reducidos Opti-MEM® I, medios RPMI 1640, medios MB 752/1 de Waymouth, medios E de Williams y medio 199.

El medio de cultivo de tenocitos de la invención comprende insulina o un derivado funcional de la misma. La insulina es una hormona que, en su forma natural, es producida por el páncreas. Sin embargo, la insulina usada en el medio de la invención puede ser sintética, tal como insulina recombinante o de origen natural.

Un "derivado funcional" de la insulina es una molécula como la descrita por Chan *et al.*, 2000, "*Insulin through the ages: Phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone*" (*American Zoologist*, accesible en [http://www.findarticles.com/p/articles/mi\\_qa3746/is\\_200004/ai\\_n8899929](http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa3746/is_200004/ai_n8899929) que tiene la actividad de insulina, a saber, la capacidad de cultivar tenocitos e incluye fragmentos biológicamente activos, variantes y derivados de insulina.

En alguna realización, un "derivado funcional" de insulina o un fragmento o variante de la misma tiene uno o varios residuos de aminoácidos sustituidos con homólogos de aminoácidos de origen natural o sintéticos de los 20 aminoácidos estándar. Los ejemplos de tales homólogos son 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, homoserina, ornitina, β-alanina y ácido 4-aminobutanoico, β-alanina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-aminobutírico, homoserina, citrulina y similares.

Se puede preparar un derivado funcional de insulina usando polietilenglicol (PEG) según el método de Sehon y colaboradores (Wie *et al.*, *supra*) para producir una molécula de insulina conjugada con PEG. Además, se puede agregar PEG durante la síntesis química de insulina. Otros métodos de preparación de un derivado de insulina o un fragmento de la misma incluyen reducción/alquilación (Tarr, *Methods of Protein Microcharacterization*, J. E. Silver ed., Humana Press, Clifton N.J. 155-194 (1986)); acilación (Tarr, *supra*); acoplamiento químico a un vehículo apropiado (Mishell y Shiigi, eds., *Selected Methods in Cellular Immunology*, W H Freeman, San Francisco, Calif. (1980), patente de Estados Unidos n.º 4.939.239; o tratamiento con formalina suave (Marsh, 1971, *Int. Arch. of Allergy and Appl. Immunol.*, 41: 199-215).

Debe observarse que la expresión "derivado funcional" no incluye moléculas tales como el factor de crecimiento tipo insulina I o II.

La insulina o el derivado funcional se puede incorporar en el medio de cultivo antes de añadir las células tenocitos a cultivar. Alternativamente, la insulina o el derivado funcional se puede añadir al medio a lo largo del cultivo, por ejemplo, cultivando las células en presencia de una capa de alimentación de células, tales como células beta, que secretan insulina o un derivado funcional.

Como se usa en la presente memoria, un "fragmento" es una porción de la proteína de insulina que retiene la función de la insulina y, en particular, la capacidad de soportar el crecimiento de células tenocitos en cultivo. Un fragmento de insulina puede tener al menos aproximadamente 10 residuos de aminoácidos de longitud, preferentemente aproximadamente 10-16 residuos de aminoácidos de longitud, y más preferentemente aproximadamente 10-20 residuos de aminoácidos de longitud.

Una "variante" de insulina es una molécula de insulina que tiene una o más sustituciones tales que la conformación secundaria de la misma permanece inalterada. Los ejemplos de tales sustituciones conservadoras incluyen aminoácidos que tienen sustancialmente la misma hidrofobicidad, tamaño y carga que el residuo de aminoácido original. Tales sustituciones son generalmente bien conocidas por los expertos en la materia de la química de proteínas o péptidos. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras incluyen prolina para glicina y viceversa; alanina o valina para glicina y viceversa; isoleucina para leucina y viceversa; histidina para lisina y viceversa; treonina para cisteína y viceversa; glutamina para asparagina y viceversa; y arginina para glutamato y viceversa.

Otro ejemplo de una variante de insulina es uno en el que los residuos de cisteína se han sustituido para minimizar la dimerización a través de enlaces disulfuro. Preferentemente, los residuos de cisteína se sustituyen con residuos de alanina, serina, treonina, leucina o ácido glutámico. Además, las cadenas laterales de aminoácidos de insulina o fragmento o derivado de las mismas pueden modificarse químicamente. Otra modificación es la ciclación de la insulina.

La cantidad de insulina o derivado funcional en el medio de la invención está normalmente en el intervalo de aproximadamente 0,00006 % a aproximadamente 0,1 % en p/v. En algunas realizaciones, la insulina o derivado funcional está en el intervalo de aproximadamente 0,0006 % a aproximadamente 0,01 % en p/v. En otras realizaciones, la insulina o derivado funcional está en el intervalo de aproximadamente 0,0006 % a aproximadamente 0,001 % en p/v. Los glucocorticoides son una clase de hormonas esteroideas caracterizadas por la capacidad de unirse al receptor de cortisol y desencadenar efectos similares, tales como afectar el metabolismo o

efectos antiinflamatorios o inmunosupresores. Los glucocorticoides pueden ser de origen natural (hormonas) o sintéticos (fármacos).

5 Los ejemplos de glucocorticoides sintéticos adecuados para su uso en la invención incluyen hidrocortisona, acetato de cortisona, predisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisonas, acetato de desoxicorticosterona (DOCA) y aldosterona.

10 Una molécula "tipo glucocorticoides" puede ser cualquier molécula que tenga una actividad de un glucocorticoide, concretamente la capacidad de cultivar tenocitos. Los ejemplos de moléculas tipo glucocorticoides adecuadas para su uso en la invención incluyen el antihepatocarcinógeno, rotenona (Youssef *et al.*, 2003, *J. Carcinogenesis* 2:2), rifampicina (Calleja *et al.*, 1998, *Nat. Med.*, 4:92-96), glicirrizina (un componente del regaliz) (Kuroyanagi y Sato, 1966, *Allergy*, 15:67-75) y witanolides (de la hierba *Withanthea somnifera*) (Grandhi *et al.*, 1994, *J. Ethnopharmacol.*, 44:131-135).

15 La betametasona es un glucocorticoide sintético que tiene la fórmula  $C_{22}H_{29}FO_5$ .

20 La cantidad de glucocorticoides o molécula tipo glucocorticoide en el medio de la invención está normalmente en el intervalo de aproximadamente 0,0002 % a aproximadamente 0,1 % en p/v. En algunas realizaciones, el glucocorticoide o la molécula tipo glucocorticoide está en el intervalo de aproximadamente 0,0002 % a aproximadamente 0,001 % en p/v. En otras realizaciones, el glucocorticoide o la molécula tipo glucocorticoide está en el intervalo de aproximadamente 0,0002 % a aproximadamente 0,001 % en p/v.

25 El medio puede comprender además suero. El suero puede ser de cualquier animal, pero normalmente es suero bovino. En algunas realizaciones, el suero es suero bovino fetal. La cantidad de suero en el medio puede estar comprendida entre aproximadamente 1 % y 30 % en v/v. En algunas realizaciones, la cantidad de suero en el medio está comprendida entre aproximadamente 5 % y 20 % en v/v. En otras realizaciones, la cantidad de suero en el medio está comprendida entre aproximadamente 10 % y 15 % en v/v.

30 El medio puede comprender adicionalmente uno o más antibióticos. Un antibiótico es una sustancia natural o sintética que destruye o inhibe el crecimiento de un microorganismo. Los ejemplos de antibióticos adecuados para su uso en un medio de la invención incluyen ampicilina, carbenicilina, penicilina, anfotericina, nistatina, polimixina-B, gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomina, una tetraciclina, un macrólido, linomicina, tiamutina y cloranfenicol.

35 El medio puede comprender entre aproximadamente 0,001 % y 5 % en v/v de antibiótico. En algunas realizaciones, la cantidad de antibiótico está comprendida entre aproximadamente 0,01 % y 0,05 % en v/v de antibiótico. En otras realizaciones, la cantidad de antibiótico es aproximadamente 1 % en v/v. L-prolina es el estereoisómero L de prolina, uno de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas animales. Sólo el estereoisómero L aparece en las proteínas de mamíferos.

40 El pH del medio puede ser cualquier pH que permita el crecimiento de las células a cultivar. En algunas realizaciones, el pH del medio de cultivo es de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 3,0. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 5,0 a 8,0. En otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 7,0 a 7,5. En otras realizaciones, el pH es aproximadamente 7,2.

45 El medio de cultivo de la invención puede prepararse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el medio puede prepararse disolviendo los ingredientes secos en agua y ajustando el líquido al pH deseado. Esto puede ser esterilizado por uno de los numerosos métodos tales como filtración o irradiación. Cualquier ingrediente líquido estéril se puede agregar al medio.

50 A continuación, se pueden añadir al medio de cultivo células tenocitos que se van a cultivar o tejido que contiene tenocitos. El término "tenocito", como se usa en la presente memoria, se refiere a las células husiformes, células fibroblásticas que se encuentran en los tendones de los animales. Los tenocitos tienen normalmente núcleos alargados y un citoplasma delgado y a menudo se encuentran situados sobre fibras de colágeno en los tendones.  
55 Los tenocitos se pueden identificar con frecuencia sobre la base de que producen colágeno tipo I y expresan el marcador "escleraxis". Las células tenocitos pueden aislarse de cualquier tejido que contenga tenocitos en una variedad de formas, todas las cuales son conocidas por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, las células tenocitos se pueden aislar a partir de un material de biopsia por métodos convencionales. Por ejemplo, un animal que requiere tratamiento o regeneración de un tendón puede tomarse una biopsia de cualquier tendón del  
60 cuerpo. Tales tendones incluyen, entre otros, el tendón del flexor radial del carpo y el tendón del calcáneo.

En algunas realizaciones, las células tenocitos o tejido que contiene tenocitos son "células o tejido autólogos", es decir, células o tejido que contiene tenocitos que se origina en el cuerpo del animal sujeto a tratar.

65 Como se usa en la presente memoria, un "animal" significa cualquier animal, tal como un ser humano o un mamífero de importancia económica y/o importancia social para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros que no sean

humanos (tales como gatos y perros), puercos (cerdos, guarros y jabalíes), rumiantes (tales como ganado, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos) y caballos. También se proporciona el tratamiento a aves, incluido el tratamiento a aves en peligro de extinción, las que se encuentran en zoológicos, así como aves de corral y, más en particular, aves domesticadas, p. ej., aves de corral, como pavos, gallinas, patos, gansos, pintadas, y similares, ya que también son de importancia económica para los humanos. De este modo, se proporciona el tratamiento para el ganado, que incluye, entre otros, puercos domesticados (cerdos y guarros), rumiantes, caballos, aves de corral y similares. El término no denota una edad en particular. Por lo tanto, tanto los sujetos adultos como los recién nacidos tienen por objeto ser cubiertos.

Los tenocitos se pueden cosechar o aislar de cualquier tejido que contenga tenocitos, p. ej., tendones. Un tendón es el tejido que conecta el músculo con el hueso en un animal. El tendón puede encontrarse en cualquier sitio anatómico de un animal y puede ser un tendón del manguito rotador, tendón supraespinoso, tendón subcapular, tendón pectoral mayor, tendón peroneo, tendón de Aquiles, tendón tibial anterior, ligamento cruzado anterior, ligamento cruzado posterior, tendón de la corva, ligamento lateral, ligamento medial, tendón rotuliano, tendón del bíceps y tendón del tríceps.

En algunas realizaciones, los tejidos del tendón, que se han aislado mediante biopsia, se lavan y se pican para formar explantes que se pueden cultivar en un cultivo celular para producir tenocitos libres. En algunas realizaciones, el tejido picado se somete a digestión enzimática y/o se somete a agentes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que se une o quelata  $Ca^{2+}$  del que depende la adhesión célula-célula. Los ejemplos de enzimas adecuadas para su uso incluyen una o más de colagenasa, tripsina y proteasas.

En un método preferente, se incubaba tejido de tendón picado hasta un tamaño que no supere 1 mm en presencia de 2,5 % en p/v de tripsina y 5,5 % en p/v de colagenasa en medio de cultivo tisular estándar sin rojo fenol durante al menos 3 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>.

En algunas realizaciones, después de la digestión enzimática, las células del material de biopsia se aíslan centrifugando la solución de biopsia y lavando el sedimento resultante con medio de crecimiento celular.

Alternativamente, los tenocitos se pueden separar entonces de los otros componentes del tendón por filtración a través de, por ejemplo, una malla tal como una malla de nylon estéril de 150 micrómetros. Otro enfoque se basa en la tendencia de algunos tipos de células a adherirse fuertemente al plástico o al vidrio, lo que les permite separarse de los componentes de un tendón que no se adhieren con tanta fuerza. Alternativamente, las células pueden separarse de otros componentes del tendón usando anticuerpos que se unen específicamente a la célula, por ejemplo, usando anticuerpos conjugados a una matriz o acoplados con un colorante fluorescente que luego puede separarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF).

Las células pueden luego añadirse al medio de cultivo de la presente invención e incubarse en condiciones adecuadas. En algunas realizaciones, después del aislamiento, las células se cultivan durante aproximadamente 3 días a aproximadamente cinco semanas, a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. El periodo de tiempo para el cultivo celular puede, por supuesto, variar.

Como se ha descrito *supra*, el medio de cultivo de la presente invención comprende aproximadamente 0,0006 % en p/v de insulina y aproximadamente 0,0002 % en p/v de betametasona. Los tenocitos son normalmente muy difíciles de cultivar en cultivos celulares y tienden a ser inestables y a desdiferenciarse. Sin embargo, el inventor ha descubierto que la insulina en particular permite que los tenocitos crezcan más establemente y se establezcan en cultivo incluso en presencia de otras células que incluyen condrocitos, fibroblastos y similares. En consecuencia, siempre que la insulina esté presente en el medio de la presente invención, entonces los tenocitos se pueden emplear selectivamente. Como se describe en otra parte, la insulina puede agregarse al medio exógenamente. Alternativamente, la insulina puede producirse de forma natural co-cultivando los tenocitos con células alimentadoras capaces de secretar insulina en el medio.

De este modo, en el presente contexto, "células alimentadoras" o "alimentadores" son células que son capaces de excretar insulina de manera que las células tenocitos co-cultivadas son capaces de crecer según lo requerido por la presente invención. Si las células tenocitos se cultivan esencialmente sin alimentadores o en presencia de células alimentadoras, en algunas realizaciones, las células tenocitos alcanzan una densidad celular que requiere que se dividan en uno o más subcultivos. Cada ronda de subcultivo se conoce como pase. Cuando las células tenocitos se subcultivan, éstas se refieren por haberse sido sometidas a pases. A veces se hace referencia a una población específica de células tenocitos o se caracteriza por el número de veces que se han sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha pasado diez veces se puede referir como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de población durante el periodo de pase; por lo tanto, el número de duplicaciones de población de un cultivo es superior al número de pases. La expansión de células (es decir, el número de duplicaciones de población) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, que

incluyen, entre otros, densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento y tiempo entre pases.

5 Preferentemente, los métodos de la presente invención producen un cultivo o subcultivo de células tenocitos que son sustancialmente puros. La expresión "sustancialmente puro", como se usa en la presente memoria, significa que los tenocitos en cultivo son las células predominantes y otras células contaminantes tales como fibroblastos, condrocitos y similares se encuentran en un menor número. Preferentemente, al menos el 80 % de las células presentes en cultivo son tenocitos, más preferentemente el 90 %, incluso más preferentemente al menos el 95 % de todas las células presentes son tenocitos.

10 Una vez que se ha obtenido un número o volumen suficiente de tenocitos, pueden acumularse o almacenarse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, las células tenocitos pueden almacenarse convenientemente mediante criopreservación a  $-180^{\circ}\text{C}$ . Las células tenocitos de la invención se criopreservan fácilmente bajo una variedad de condiciones tales como las conocidas en la técnica.

15 Es importante destacar que, durante la fase de cultivo o después del pase o después de la criopreservación, es preferible que se evalúe el fenotipo de las células tenocitos. Existen numerosos métodos de evaluación del fenotipo de las células sometidas a cultivo celular. Un método es evaluar la morfología de las células cultivadas. Por ejemplo, los tenocitos son células husiformes con núcleos alargados y un citoplasma fino.

20 Otro método de evaluación del fenotipo de una célula cultivada es determinar si la célula expresa marcadores específicos para el tipo de célula. Por ejemplo, los tenocitos expresan un factor de transcripción, escleraxis, que es un marcador altamente específico para todos los tejidos conectivos que median la unión del músculo al hueso. Los tenocitos también expresan marcadores de diferenciación como colágeno tipo I, colágeno tipo III y decorina.

25 Resultará evidente para un experto en la materia que las células tenocitos de la presente invención se puedan incubar en una monocapa o en un cultivo tridimensional dependiendo de su uso final. Una "monocapa" es una capa única de células (bidimensional). Un cultivo tridimensional se refiere a un cultivo que tiene una profundidad, anchura y altura, tal como un cultivo que crece en una matriz o armazón.

30 De este modo, la presente invención también contempla composiciones que incluyen células tenocitos, preferentemente células tenocitos autólogas, sembradas sobre una matriz o armazón de soporte para su uso en la reparación y/o regeneración de tejidos. Por "siembra" se entiende que las células tenocitos se ponen en contacto con una matriz o armazón de soporte, y se adhieren (con o sin un adhesivo) a la matriz de soporte durante un periodo de tiempo antes del trasplante.

35 En algunas realizaciones de la invención, las células se retienen solamente en una superficie o un borde de, o a una profundidad especificada (como se describe en la presente memoria) de la matriz de soporte, es decir, las células se adhieren a una superficie o son adyacentes a la matriz de soporte.

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

45 La matriz o armazón de soporte puede estar en cualquier forma adecuada para la adherencia de tenocitos o células con o sin un adhesivo. A modo de ejemplo y no de limitación, la matriz o armazón de soporte puede estar en forma de una membrana, microperla, vellón, hilo o gel, y/o mezclas de los mismos. La matriz o armazón de soporte puede estar fabricado de cualquier material que tenga los atributos físicos o mecánicos requeridos para la implantación, tal como actuar como barrera hemostática. Una barrera hemostática inhibe la penetración de células y tejidos adjuntos en el área del defecto tratado.

50 La matriz o armazón de soporte está fabricado preferentemente de un material semipermeable que puede incluir colágeno reticulado o no reticulado, preferentemente tipo I en combinación con tipo III o tipo II. La matriz o armazón de soporte también puede incluir polipéptidos o proteínas obtenidas a partir de fuentes naturales o por síntesis, tales como ácido hialurónico, submucosa del intestino delgado (SID), peritoneo, pericardio, ácidos polilácticos y ácidos relacionados, sangre (es decir, que es un tejido circulante que incluye una porción fluida (plasma) con elementos formados suspendidos (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas) u otro material que sea biorreabsorbible. Los polímeros bioabsorbibles, tales como elastina, fibrina, laminina y fibronectina también son útiles en la presente invención. Los materiales de matriz o armazón de soporte se describen en la publicación de Estados Unidos n.º 20020173806.

60 Además, la matriz o armazón de soporte preferentemente está inicialmente (es decir, antes del contacto con las células a trasplantar) libre de células intactas y es reabsorbible en el sujeto animal.

65

La matriz o armazón de soporte puede tener una o varias superficies, tales como una superficie porosa, una superficie densa o una combinación de ambas. La matriz de soporte también puede incluir superficies semipermeables, impermeables o completamente permeables. Las matrices de soporte que tienen una superficie porosa se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.569.172.

5 La matriz de soporte es autóloga o alógena. En algunas realizaciones, se forma una matriz de soporte autóloga adecuada a partir de sangre, como se ejemplifica en la patente de Estados Unidos n.º 6.368.298, expedida a Berretta, *et al.* el 9 de abril de 2002.

10 Una matriz o armazón de soporte adecuado será un armazón sólido, semisólido, de gel o similar a un gel que se caracteriza por ser capaz de mantener una forma estable durante un periodo de tiempo para permitir la adherencia y/o crecimiento de las células sobre el mismo, antes del trasplante y después del trasplante, y para proporcionar un sistema similar al entorno natural de las células para optimizar el crecimiento celular. Los ejemplos de matrices de soporte adecuadas se desvelan en la publicación de Estados Unidos n.º 20020173806.

15 En algunas realizaciones, la matriz o armazón de soporte y/o células, individualmente o en combinación, puede combinarse con un adhesivo (p. ej., un pegamento biocompatible tal como cola de fibrina que puede ser autóloga o alógena) o medios de retención física o mecánica tales un pasador reabsorbible para ayudar a retener las estructuras de reparación según la presente invención en o sobre el sitio de trasplante.

20 Los ejemplos adicionales de matrices o armazones de soporte adecuados para el crecimiento de tenocitos incluyen Vitrogen™, una solución que contiene colágeno que se gelifica para formar una matriz poblada de células, y los armazones de tejido conectivo 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). Los armazones adecuados, como el de Hwang, son idealmente capaces de no solo soportar el crecimiento de los tenocitos, sino que también pueden transferirse a un animal para reemplazar el tejido del tendón o del ligamento dañado.

25 La matriz o armazón de soporte se puede cortar o formar en cualquier forma regular o irregular. En una realización preferente, la matriz o armazón de soporte se puede cortar para que se corresponda con la forma del defecto. La matriz de soporte puede tener una forma plana, redonda y/o cilíndrica. La forma de la matriz de soporte también puede moldearse para adaptarse a la forma de un defecto de tejido particular. Si la matriz de soporte es un material fibroso, o tiene las características de una fibra, la matriz de soporte se puede tejer en una forma deseada. Alternativamente, la matriz de soporte puede ser un gel, similar a un gel o un material no tejido.

30 En algunas realizaciones, una matriz o armazón de soporte de la presente invención se puede sembrar con múltiples tipos de células y tener diferentes tipos de células sobre y/o en y/o a lo largo y/o adyacentes a diferentes porciones de la matriz o armazón de soporte. A modo de ejemplo, una porción de la matriz de soporte puede incluir un primer tipo de célula (p. ej., tenocitos) y otra porción de la matriz puede incluir un segundo tipo de célula (p. ej., células musculares).

35 A modo de ejemplo adicional, si la matriz o soporte tiene forma de disco, con dos lados y un borde, un primer lado puede incluir un primer tipo de célula (p. ej., tenocito) y el segundo lado o borde puede incluir un segundo tipo de célula (p. ej., células musculares) sobre el mismo.

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

45 Después de que los tenocitos u otras células se siembren sobre la matriz o armazón de soporte, la matriz o armazón de soporte y las células se trasplantan al defecto del tejido, con las células orientadas a la superficie a tratar. En una realización, se asegura un parche de recubrimiento (p. ej.,

50 En algunas realizaciones, un parche de recubrimiento sirve para cubrir el defecto que evita además la infiltración de materiales no deseados, tales como fibroblastos o macrófagos, del entorno circundante. En una realización, el parche de recubrimiento puede ser cualquiera de las matrices de soporte descritas en la presente memoria, y/o puede incluir colágeno (tipo I/III), ácido hialurónico, fibrina y ácido poliláctico. Preferentemente, el parche de recubrimiento está libre de células y es reabsorbible, y puede ser semipermeable.

55 En una realización, la matriz o armazón de soporte y las células son inyectables al sitio de trasplante, con o sin un adhesivo o pegamento.

60 Una matriz o armazón de soporte sembrado de la presente invención también puede incluir diversos activos farmacológicos que incluyen, entre otros, antimicrobianos, antivirales, antibióticos, factores de crecimiento adecuados para el tipo de tejido a regenerar y/o reparar, moduladores de la coagulación sanguínea tales como heparina y similares, así como mezclas y capas compuestas de las mismas se pueden agregar al material de matriz

de soporte biodegradable biocompatible, antes de la impregnación en la matriz de soporte.

Una matriz o armazón de soporte sembrado de la presente invención también puede incluir factores de crecimiento tales como factores de crecimiento autólogos y no autólogos adecuados para el tipo de tejido a regenerar y/o reparar, que incluyen, entre otros, factor de crecimiento transformante (tal como TGF-beta-3), proteína morfogenética ósea (tal como BMP-2), PTHrP, osteoprotegrina (OPG), Indian Hedgehog, RANKL y factor de crecimiento similar a la insulina (Igf1), como se describe en la publicación de Estados Unidos n.º 20030144197.

Como se ha indicado *supra*, la presente invención también puede incluir pegamento biocompatible en contacto con un sustrato y/o material biodegradable y/o células. Dichos pegamentos o adhesivos biocompatibles pueden incluir un pegamento de fibrina orgánico (p. ej., adhesivo basado en fibrina Tisseel™ disponible de Baxter, Austria, o un pegamento de fibrina preparado en el quirófano usando muestras de sangre autólogas).

Como se ha descrito *supra*, los tenocitos cultivados pueden usarse para la regeneración y reconstrucción de tendones y/o ligamentos. La regeneración o reconstrucción del tendón y/o ligamento puede ser parcial o completa y puede proporcionar una recuperación parcial o completa del intervalo de movimiento del tendón o ligamento afectado. Por ejemplo, los defectos de los tendones se pueden reparar usando tenocitos cultivados según la invención y un método descrito por Cao *et al* 2002 (*Plast Reconstr Surg* 110:1280-1289) o Curtis *et al* 2005 (*European Cells and Materials* 9:50-57)

Las células de tenocitos cultivadas pueden usarse para la regeneración y/o reconstrucción de cualquier tendón y/o ligamento. Por ejemplo, las articulaciones del hombro, codo, rodilla y tobillo son las más comúnmente afectadas por lesiones de tendones o ligamentos. Por ende, las células cultivadas pueden usarse, entre otros, para la regeneración o reconstrucción del tendón del manguito del rotador, tendón del supraespinoso, tendón del subcapular, tendón del pectoral mayor, tendón peroneo, tendón de Aquiles, tendón del tibial anterior, ligamento cruzado anterior, ligamento cruzado posterior, tendón de la corva, ligamento lateral, ligamento medial, tendón rotuliano, tendón del bíceps y tendón del tríceps.

Los tenocitos cultivados también se pueden usar en el tratamiento o prevención de un trastorno de tendón o ligamento.

"Tratar" o "tratamiento" o equivalentes gramaticales, como se usan en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de un trastorno de tendón o ligamento en un sujeto animal, preferentemente un ser humano, e incluye: (a) prevenir el trastorno del tendón o del ligamento en un sujeto que puede estar predispuesto al trastorno, pero aún no ha sido diagnosticado por tenerlo; (b) inhibir el trastorno del tendón o del ligamento, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar o mejorar los síntomas del tendón o ligamento, es decir, causar la regresión de los síntomas del trastorno. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente el trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa del trastorno.

Un "trastorno" se refiere a un estado anormal, tal como la estructura o función, de una parte de un cuerpo. Por lo tanto, un trastorno de tendón o ligamento se refiere, por ejemplo, a una estructura o función anormal del tendón o ligamento.

Los ejemplos de trastornos de los tendones incluyen tendinosis y tendinitis.

"Tendinosis" es un término que se refiere a la degeneración intratendinosa de un tendón debido a atrofia (envejecimiento, microtraumatismo, compromiso vascular). Histológicamente existe una degeneración intratendinosa no inflamatoria del colágeno con desorientación de la fibra, hipocelularidad, crecimiento hacia el interior vascular diseminado y, ocasionalmente, necrosis local o calcificación. Clínicamente, a menudo, existe un nódulo del tendón palpable que puede ser asintomático, pero también puede presentar un punto sensible. No existe hinchazón de una vaina del tendón.

"Tendinitis" se refiere a una distensión o desgarro de un tendón y es una degeneración sintomática del tendón con disrupción vascular y respuesta de reparación inflamatoria. Los síntomas son inflamatorios. Dependiendo de la etapa de la tendinitis (aguda, menos de dos semanas, subaguda, de cuatro a seis semanas y crónica, durante más de seis semanas), puede haber un hematoma o necrosis celular relacionada con la atrofia. Histológicamente existen tres subgrupos reconocidos: 1) puramente inflamatorio con hemorragia y desgarro agudos; 2) inflamación superpuesta a la degeneración preexistente; y 3) cambios de calcificación y tendinosis en condiciones crónicas.

Por "comprender" se entiende que incluye, entre otros, lo que sea que siga la palabra "que comprende". Por lo tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes. Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sea que siga a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que ningún otro elemento puede estar presente. Por "que consiste esencialmente en" se entiende incluir cualquier elemento enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos

enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

5 La invención se describirá ahora de manera adicional solamente a modo de referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Sin embargo, debe entenderse que los siguientes ejemplos son solo ilustrativos, y no deben tomarse de ninguna manera como una restricción sobre la generalidad de la invención descrita anteriormente. En particular, si bien la invención se describe en detalle en relación con el uso de insulina, se entenderá claramente que los hallazgos en la presente memoria no están limitados a la insulina *per se*, sino que también abarcan los derivados de insulina descritos *supra*.

#### Ejemplo 1 Recogida de tejido de tendón para cultivo

15 Se recogieron 50 g a 100 g de tejido de tendón normal del tendón rotuliano de un ser humano y un caballo mediante una biopsia con aguja. El tejido se almacenó en medio 199 libre de rojo de fenol (Invitrogen) que contenía 10 % en v/v de suero bovino fetal (SBF) durante no más de 72 horas a temperatura ambiente.

20 El tejido se lavó con medio 199 y se picó en un tamaño que no supera 1 mm y se digirió en 2,5 % en p/v de tripsina y 5,5 % en p/v de colagenasa en medio 199 sin rojo fenol durante al menos 3 horas a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO<sub>2</sub>.

25 La digestión del tendón se hizo pasar a través de un filtro con un tamaño de 45 µm para separar los tenocitos del resto de la digestión del tendón. Los tenocitos se usaron para contar células y se sembraron en un matraz de 25 cm<sup>2</sup> para cultivo.

#### Ejemplo 2 Cultivo de tenocitos

30 Los tenocitos preparados en el Ejemplo 1 se colocaron en un matraz de cultivo a una densidad comprendida entre 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> células/ml en una placa que contenía medio de cultivo. El medio de cultivo contenía medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen), 15 % en v/v de suero bovino fetal, 0,0006 % en p/v de insulina, 0,0002 % en p/v de betametasona, 0,5 % en p/v de penicilina, 0,5 % en p/v de estreptomina y 0,6 % de L-prolina a pH 7,0. Las células se incubaron en 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. El medio de cultivo se cambió cada tres días durante 3 a 5 semanas hasta que las células alcanzaron el número máximo de células en el quinto pase, normalmente 20 x 10<sup>7</sup> células.

#### Ejemplo 3 Caracterización de tenocitos humanos

40 La expresión de los marcadores de tenocitos, ARNm de colágeno de tipo I y tipo III, mediante los tenocitos cultivados en las condiciones descritas en el Ejemplo 2 se examinó para confirmar si los tenocitos mantenían su capacidad biosintética *in vitro*.

45 Se extrajo el ARN total tanto del tejido de tendón (control) como de los tenocitos cultivados en las condiciones descritas en el Ejemplo 2 usando un mini Kit RNAeasy (QIAGEN Australia). Se realizó RT-PCR para generar y amplificar ADNc de colágeno de tipo I y tipo III, así como ADN del gen constitutivo, GAPDH. La amplificación por PCR se realizó usando los siguientes pares de cebadores:

##### *Colágeno tipo I*

50 Sentido  
5'CTCGCTCACACCTTCTCTC 3' (SEQ ID NO: 1)

Antisentido  
5'TGTTCTGAGAGCGTGATTG 3' (SEQ ID NO: 2)

55 Para producir un tamaño de producto de 464 pb.

##### *Colágeno tipo III*

60 Sentido  
5'ACCAACCTTCTCCTGAAGCC 3' (SEQ ID NO: 3)

Antisentido  
5'CACCATTGAGACATTTTGA 3' (SEQ ID NO: 4)

65

## ES 2 662 885 T3

Para producir un tamaño de producto de 254 pb.

*Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH)*

5 Sentido  
5'TCACCATCTTCCAGGAGCGA 3' (SEQ ID NO: 5)

Antisentido  
10 5'CACAATGCCGAAGTGGTCGT 3' (SEQ ID NO: 6)

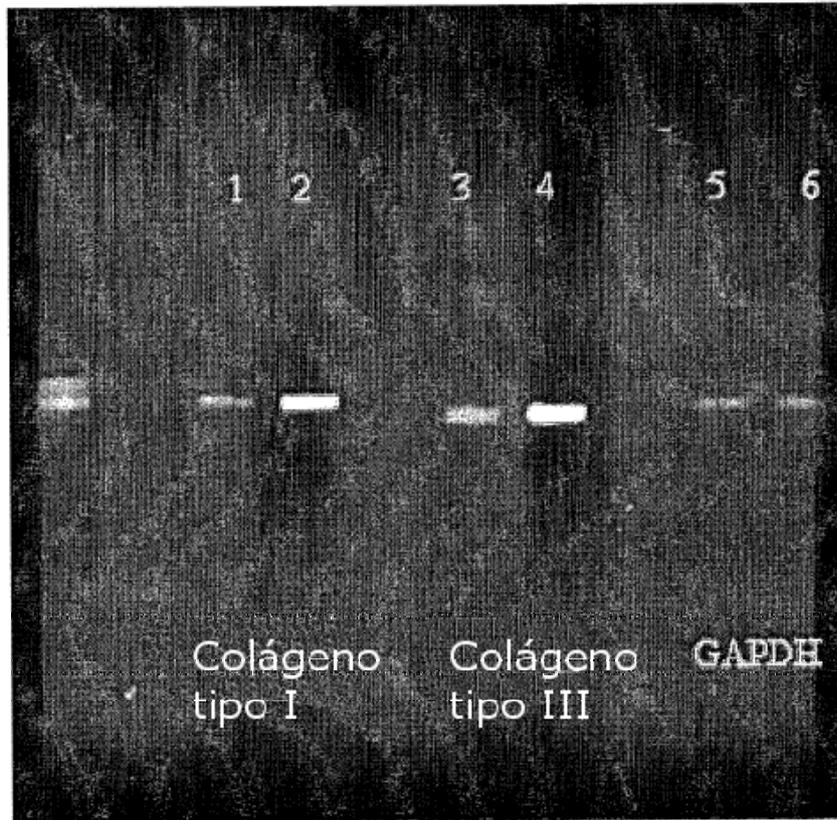
Para producir un tamaño de producto de 293 pb.

15 Se realizaron 30 ciclos de PCR en un termociclador en condiciones estándar, excepto que se utilizó un tiempo de recocido de 40 segundos y la hibridación usando los cebadores de colágeno de tipo I y III se llevó a cabo a 60 °C y los cebadores de GAPDH a 62 °C.

20 Las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis y los resultados se muestran en la Figura 1. Se puede observar que los tenocitos cultivados en un medio de la invención expresan ARNm de colágeno de tipo I y tipo III, al igual que el tejido de tendón.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un medio de cultivo de tenocitos que comprende aproximadamente 0,0006 % en p/v de insulina y aproximadamente 0,0002 % en p/v de betametasona, en el que dicho medio tiene la capacidad de expandir selectivamente tenocitos en cultivo.
2. Un medio de cultivo de tenocitos según la reivindicación 1, que comprende además de suero, uno o más antibióticos o L-prolina.
- 10 3. Un medio de cultivo de tenocitos según la reivindicación 2, en el que el suero es suero bovino fetal.
4. Un medio de cultivo de tenocitos según la reivindicación 2, en el que el antibiótico se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en ampicilina, carbenicilina, penicilina, anfotericina, nistatina, polimixina-B, gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomina, una tetraciclina, un macrólido, linomicina, tiamutina y cloranfenicol.
- 15 5. Un método de expansión selectiva de tenocitos en cultivo, que comprende la etapa que consiste en la incubación de un tenocito o un tejido que contiene un tenocito en un medio de cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un método de producción de un cultivo de tenocitos que comprende las etapas que consisten en:
- (i) lavado y picado de una muestra aislada de tejido que contiene tenocitos para formar explantes; y  
(ii) cultivo de dichos explantes en presencia de un medio de cultivo de tenocitos que comprende aproximadamente 0,0006 % en p/v de insulina y aproximadamente 0,0002 % de betametasona para producir tenocitos libres;
- 25 en el que al menos el 90 % de las células presentes en el cultivo son tenocitos.
7. Un método según la reivindicación 6, en el que al menos el 95 % de las células presentes en el cultivo son tenocitos.
- 30 8. Un método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el tejido que contiene tenocitos es tejido de tendón.
- 35 9. Un método según la reivindicación 8, en el que el tejido de tendón se pica hasta un tamaño que no supere 1 mm y se incuba en presencia de 2,5 % en p/v de tripsina y 5,5 % en p/v de colagenasa durante al menos 3 h a 37 °C.
- 40 10. Un método de producción de una matriz o armazón de soporte sembrado con células tenocitos que comprende las etapas que consisten en:
- (i) proporción de una matriz o armazón de soporte útil para la reparación de tejidos;  
(ii) lavado y picado de una muestra aislada de tejido que contiene tenocitos para formar explantes;  
(iii) cultivo de dichos explantes en presencia de un medio de cultivo de tenocitos que comprende aproximadamente 0,0006 % en p/v de insulina y aproximadamente 0,0002 % de betametasona para producir tenocitos libres, en el que al menos el 90 % de las células presentes en el cultivo son tenocitos; y  
(iv) puesta en contacto de dicha matriz o armazón de soporte con células tenocitos de la etapa (iii) durante un tiempo suficiente para permitir que dichas células tenocitos se adhieran a dicha matriz o armazón.
- 45 11. Un método según la reivindicación 10, en el que al menos el 95 % de las células presentes en el cultivo son tenocitos.
- 50 12. Un método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el tejido que contiene tenocitos es tejido de tendón.
- 55 13. Un método según la reivindicación 12, en el que el tejido de tendón se pica hasta un tamaño que no supere 1 mm y se incuba en presencia de 2,5 % en p/v de tripsina y 5,5 % en p/v de colagenasa durante al menos 3 h a 37 °C.



**FIGURA 1**