(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 772**

(51) Int. Cl.:

***A61K 35/12*** (2015.01)
***C12N 5/00*** (2006.01)
***A61P 43/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2005** **E 08155645 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 1970068**

(54) Título: **Reparación de tejidos mediante el uso de las células multipotentes**

(30) Prioridad:

**18.03.2004 EP 04075885**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**24.07.2018**

(73) Titular/es:

**CARTIREGEN B.V. (100.0%)**
**Westdam 3 E**
**3441 GA Woerden, NL**

(72) Inventor/es:

**HENDRIKS, JEANINE ANNA ALPHONSE;**
**DE BRUIJN, MARK EWART y**
**RIESLE, JENS UWE**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 676 772 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

Reparación de tejidos mediante el uso de las células multipotentes

La invención se refiere al campo de la ciencia médica, particularmente a la tecnología dirigida a la reparación de los defectos en los tejidos vivos, preferentemente humanos.

Las células primarias son células altamente especializadas presentes en los diversos tipos específicos de tejidos en un organismo. Están implicadas en mantener, reparar y apoyar la función de dicho tejido.

En la mayoría de las situaciones donde se produce un defecto en el tejido vivo, se desencadena una reacción intrínseca o extrínseca. Las células primarias que están presentes en el tejido dañado pueden producir crecimiento específico y otros factores que se secretarán a los alrededores del defecto. Esto tiene como objetivo desencadenar la proliferación de las células aún viables mediante las cuales el defecto puede llenarse. Después, si es necesario, las células pueden diferenciarse en el tipo de célula necesario para producir y mantener el tejido especializado completamente funcional.

En muchos casos, sin embargo, la reacción de reparación del cuerpo no es o no conduce completamente a un tejido funcional. Esto puede deberse a una variedad de razones, como el tamaño del defecto, la escasa disponibilidad de células primarias en el lugar del defecto para apoyar la función de reparación o la falta de influjo de células multipotentes, que pueden diferenciarse al tipo de célula necesario, por ejemplo, a través del flujo sanguíneo.

El cartílago articular cubre los extremos de los huesos largos de las articulaciones sinoviales y consiste en aproximadamente el 30 % de las proteínas de la matriz extracelular y aproximadamente el 70 % de agua. Los condrocitos son el único tipo de célula que se encuentra en el cartílago articular normal, pero contribuyen con menos del 2 % del peso en húmedo en el tejido adulto sano humano. La matriz extracelular consiste predominantemente en moléculas de proteoglicano específicas del cartílago con glicosaminoglicano sulfatado altamente cargado negativamente (cadenas laterales de GAG, así como fibrillas de colágeno tipo II. Las cadenas laterales de GAG son capaces de unirse a moléculas de agua, secuestrando agua y generando una presión interna de hinchamiento dentro de la matriz del cartílago. Estas propiedades similares al hidrogel son esenciales para los patrones de flujo de fluido intersticial observados dentro de la matriz durante la carga funcional del cartílago, momento en el cual el agua sale del tejido a una cantidad que permite que las cadenas GAG cargadas negativamente se repelan entre sí. Tras liberar la carga de compresión, el agua se embebe nuevamente en la matriz de tejido. La red colagenosa, junto con el GAG unido al agua, permite que el cartílago articular resista grandes cargas de compresión que le dan al tejido su función única en las articulaciones sinoviales: articulación suave y sin dolor, extensión de la carga aplicada sobre el hueso subcondral y absorción de los golpes mecánicos.

La matriz madura del cartílago articular no está vascularizada ni enervada, y contiene condrocitos en cantidades bajas que no se dividen después de la madurez esquelética. Es en parte por esta razón que el cartílago articular no se repara espontáneamente o solo de forma muy limitada. Los enfoques actuales para la reparación del cartílago dependen de la eliminación de restos de tejido, el acceso al sistema de curación de heridas del hueso mediante la penetración de la placa ósea subcondral, y el trasplante de tejidos y las terapias en base a células. Las terapias clínicas actuales se limitan a terapias en base a células autólogas, como el implante de condrocitos autólogos (ACI) y la mosaicoplastia (conocidos además como injertos osteocondrales autólogos). Debido a los graves inconvenientes, ambas terapias actualmente solo pueden abordar una parte limitada del mercado de la reparación de cartílagos.

Para la mosaicoplastia, una desventaja importante es la limitación a pequeños defectos debido a la disponibilidad limitada del tejido del donante para el trasplante. Para el ACI, los inconvenientes incluyen la necesidad de realizar dos operaciones quirúrgicas, los altos costos debido al cultivo necesario de células in *vitro*, y la pérdida del fenotipo de las células del cartílago. Las células del cartílago se desdiferencian tras la expansión celular, que es parte del proceso del ACI. Por lo tanto, estas necesitan varios meses después de la cirugía antes de que recuperen su fenotipo original. Solo entonces puede comenzar la verdadera reparación del cartílago.

Recientemente, se ha desarrollado una segunda generación del ACI que implica condrocitos autólogos en una matriz de biomateriales. Esta técnica resuelve algunos de los problemas del ACI, particularmente el procedimiento quirúrgico largo y abierto que se requería en el ACI. Sin embargo, quedan tres inconvenientes importantes: deben llevarse a cabo dos procedimientos quirúrgicos, los costos elevados y la rehabilitación prolongada.

Como consecuencia, existe una necesidad de mejoras adicionales en el campo de la reparación de los defectos de los tejidos, particularmente para los defectos que no se reparan o no se reparan suficientemente de forma espontánea.

De acuerdo con la invención, se ha descubierto que la diferenciación de las células multipotentes puede inducirse mediante su exposición a células primarias. Este efecto se ha observado incluso cuando las células primarias se diluyen con las células multipotentes en gran medida. Incluso en un número muy bajo de células primarias en relación con el número de células multipotentes, aún tiene lugar la diferenciación de las células multipotentes en un linaje específico. De hecho, se ha descubierto que la reparación de los tejidos avanza más rápidamente cuando se usa una población de células primarias y multipotentes que comprenden el 75 % en volumen de células multipotentes, que cuando se usa una población de solo células primarias.

En base a este hallazgo, se ha desarrollado un método para reparar los defectos de tejidos que es altamente rentable y no presenta las desventajas esbozadas anteriormente para los métodos de la técnica anterior. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Particularmente, un uso para reparar un defecto del tejido de acuerdo con la invención preferentemente ya no requiere múltiples procedimientos quirúrgicos. En un procedimiento, pueden cosecharse tanto las células primarias como las multipotentes y pueden aplicarse al defecto de tejidos durante el mismo procedimiento. Como consecuencia, el tratamiento de un paciente necesita menos recursos en términos de tiempo en las instalaciones operativas y en términos de personal médico. Esto hará posible tratar a un mayor número de pacientes por año con el mismo personal médico y en las mismas instalaciones quirúrgicas que antes. Además, el hecho de que solo un procedimiento quirúrgico sea suficiente reducirá significativamente el dolor y el sufrimiento que enfrentan los pacientes, así como el riesgo de infecciones y otras complicaciones durante la cirugía, y al mismo tiempo acelerará el procedimiento de recuperación y rehabilitación.

Se debe señalar que, en principio, se conoce del uso de células multipotentes, como las células madre mesenquimales, para la reparación de tejidos. Puede hacerse referencia en este sentido a Mary Murphy y otros, Arthritis & Rheumatism, 48(12), diciembre de 2003, páginas 3464-3474, y Körbling y otros, N. Engl. J. Med., 349(6), agosto de 2003, páginas 570-582. Los estudios descritos en estos artículos exploran el papel que las células madre implantadas pueden jugar en la reparación o la regeneración de los tejidos mediante el suministro de una preparación de células madre a un defecto. En estos estudios, sin embargo, las células madre se implantaron por sí mismas, es decir, sin células primarias.

La solicitud de la patente internacional núm. WO 03/078609 describe un método para inducir la diferenciación de células madre en un linaje celular específico. A diferencia de la presente invención, el método descrito siempre necesita de una etapa de cultivo de células madre en presencia de una muestra de tejido en un medio adecuado. En el método descrito en dicha solicitud de patente internacional, las células madre se diferencian en un linaje celular preferentemente se escoge del grupo de linajes de células respiratorias, prostáticas, pancreáticas, mamarias, renales, intestinales, neurales, esqueléticas, vasculares, hepáticas, hematopoyéticas, musculares o cardíacas. No se describe la diferenciación de células madre en condrocitos para formar el tejido cartilaginoso. Además, no se describe nada acerca de las relaciones adecuadas entre las células madre y las células en la muestra de tejido.

El documento núm. WO 00/27999 describe la producción de las células específicas del linaje linfoide mediante el cocultivo de las células progenitoras hematopoyéticas con las células estromales linforreticulares en una matriz sólida porosa. El documento no enseña nada sobre la reparación del tejido, o las relaciones específicas de células primarias a células multipotentes como se reivindica en la presente.

El documento núm. WO 02/46401se refiere principalmente a la inducción de inmunotolerancia para el trasplante. Este documento no proporciona ninguna guía sobre la relación específica de células primarias a células multipotentes como se reivindica en la presente.

De acuerdo con la invención, el término "células multipotentes" pretende referirse a células que aún pueden diferenciarse en varios tipos especializados de elementos tisulares. Los ejemplos de células multipotentes son las células madre, que incluyen células madre embrionarias, células progenitoras, células madre mesenquimales, células de la médula ósea o células satélite. De acuerdo con la invención, se considera además que los fibroblastos están abarcados por el término de células multipotentes, ya que tienen la capacidad de diferenciarse en otros tipos de células. Las células de la médula ósea se usan preferentemente.

De acuerdo con la invención, el término "células primarias" se refiere a células que son células especializadas y que han perdido la capacidad de una diferenciación adicional en (otro) tipo de célula. Existen numerosos ejemplos de diferentes tipos de células primarias en el cuerpo humano o animal. De acuerdo con la invención, se prefiere usar células nerviosas, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, cardiomiocitos, miocitos, células de Schwann o células uroteliales como células primarias. En una modalidad muy preferida, la invención se dirige a un método de reparación del cartílago y las células primarias son condrocitos.

La invención implica la cosecha de una muestra de células multipotentes y de una muestra de células primarias. Típicamente, estas muestras se obtendrán en un procedimiento referido como una biopsia. Este procedimiento se conoce *en sí mismo* y puede adaptarse al tipo específico de tejido del que se toma la muestra de células. A modo de ejemplo, una biopsia del tejido de cartílago, que contiene condrocitos, de al menos 100 mg (que implica de 5 a 6 biopsias con un diámetro de 4 mm) puede tomarse de, preferentemente, una zona de una rodilla lesionada, de baja carga no implicada, durante la artroscopia y recogerse en un tubo que contenga un medio adecuado, o someterse directamente a un protocolo de aislamiento de células peroperativas. Las autopsias de médula ósea pueden obtenerse del hueso pélvico (cresta ilíaca) o de la parte proximal o distal del fémur. Todas las biopsias preferentemente se toman de un área donde, o cerca de donde se realizará la cirugía prevista. Cuando se crean aberturas en el hueso como parte del procedimiento, puede insertarse una aguja de biopsia de calibre 8 y pueden aspirarse 2-50 cc de médula ósea. Preferentemente, la aguja y la jeringa que se usaron se enjuagan previamente mediante el uso de una solución de heparina al 1 % para evitar la coagulación de la médula. En caso de que se use la médula ósea completa, esta se aspira preferentemente sin heparina.

Después de la aspiración, la médula ósea puede inyectarse en condiciones estériles en un tubo heparinizado, por ejemplo, por cada 10 mL de médula ósea.

En una modalidad alternativa, una biopsia, particularmente una biopsia de células multipotentes, implica tener disponibles células multipotentes durante la cirugía en el sitio del defecto. De acuerdo con esta modalidad, las células multipotentes que se usan están presentes en o cerca del defecto del tejido. De manera favorable, esta modalidad no requiere aislar las células multipotentes del cuerpo del paciente; simplemente se ponen a disposición de las células primarias en el sitio del defecto. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante el reclutamiento de células multipotentes *in situ* mediante la penetración de la placa ósea subcondral, o mediante la aplicación de atrayentes químicos para atraer células multipotentes de origen sinovial al defecto.

El tipo y la fuente de las células primarias se escogerán en dependencia del tipo de tejido que se pretende reparar. Preferentemente, las células primarias son un tipo de célula que se produce naturalmente en el tejido que será reparado. En una modalidad altamente preferida, los condrocitos se cosechan para la reparación de defectos del cartílago. El tipo y la fuente de las células multipotentes se escogen además en dependencia del tipo de tejido que se pretende reparar.

La siguiente descripción general proporciona ejemplos de cómo pueden seleccionarse los tipos celulares de células primarias y multipotentes con el fin de reparar un tipo específico de tejido.

| Reparación del tejido | Fuente de células primarias | Fuente de células multipotentes |
|---|---|---|
| Hueso | osteoblastos del hueso trabecular en el hueso largo, hueso pélvico, clavícula, compacto, hueso subcondral | Médula ósea, células madre mesenquimales, células madre de es decir grasa, músculo esquelético, células progenitoras, células del cordón umbilical, fibroblastos, células del estroma de médula ósea humana, células de origen vascular, |
| Cartílago | Condrocitos derivados de nariz, rodilla o articulación de la cadera, codo, oreja, cartílago del tobillo o tráquea, condrón aislado | |
| Hígado | Hepatocitos del hígado | |
| Corazón, Válvulas cardíacas | Cardiomiocitos del músculo del corazón, miofibroblastos vasculares forman tejido vascular en el corazón | |
| Músculo | Miocitos del músculo liso | células sinoviales, fibroblastos dérmicos y células madre del folículo piloso, y células del periostio o pericondrio |
| Nervio | Células de Schwann, células neuronales de tubos epineurales | |
| Vejiga | Células uroteliales del tracto urinario | |
| Intestino | Células del yeyuno, duodeno | |
| Ligamentos y Tendones | Células de ligamentos cruzados o tendón | |
| Cabello | Células del folículo piloso, como las células de papilas dérmicas, células de envoltura de raíz externa o epiteliales de matriz | |

En una modalidad preferida, las células cosechadas se aíslan de las muestras obtenidas en la biopsia. Esto puede hacerse para las células en un fluido mediante clasificación de flujo magnético, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), filtración en columna, centrifugación, separación con percoll o unión al plástico para el cultivo de tejidos. Para las células en el tejido esto puede hacerse mediante la trituración, es decir, la dispersión de las células mediante la acción de bombeo suave, seguido por disección y digestión enzimática del tejido, y el aislamiento mediante filtración en columna, centrifugación, separación en membranas o separación en gel. Los ejemplos adecuados de enzimas a usar en este sentido, incluyen colagenasa, dispasa, tripsina, elastasa, hialuronidasa y papaína.

Es posible usar células cosechadas sin aislarlas. Por ejemplo, las fracciones de médula ósea o la médula ósea entera pueden usarse directamente para proporcionar las células multipotentes. Además, puede usarse tejido picado o triturado (chips de tejido) sin aislamiento de células adicional como componente de las células primarias.

De acuerdo con la invención, las poblaciones de células multipotentes y primarias obtenidas se combinan *in vitro, in vivo* o *in situ* para inducir la diferenciación de las células multipotentes. Tanto las células multipotentes como las primarias pueden combinarse entre sí con o sin componentes del tejido que podrían rodearlas en su ambiente natural. Ejemplos de tales componentes incluyen la médula ósea y la sangre. De manera favorable, las células multipotentes se diferenciarán en el tipo de célula de las células primarias. Sorprendentemente, se ha encontrado que solo un pequeño número de células primarias, que se relacionan con el número de células multipotentes, son necesarias para lograr el efecto deseado de inducción. La relación entre el número de células en la población de células primarias y el número de células en la población de células multipotentes, cuyas dos poblaciones deben combinarse, es de 1:200 a 2:3, preferentemente de 1:100 a 1:3, y con mayor preferencia de 1:50 a 1:5.

En J. Thorac. Cardiovasc. Surg., junio de 2003, 125(6), páginas 1470-1480, y J. Thorac. Cardiovasc. Surg., agosto de 2002, 50(8), páginas 321-324, Fukuhara *y otros* han descrito que las células del estroma de la médula ósea pueden entrar en el linaje cardíaco *in vitro* cuando se cocultivan junto con los cardiomiocitos en una relación de 1:1 durante siete días. Sorprendentemente, de acuerdo con la invención se ha encontrado que un número mucho menor de células primarias se relaciona con el número de células multipotentes suficientes para inducir la diferenciación de las células multipotentes. Además, de acuerdo con la invención, el cocultivo *in vitro* de las poblaciones celulares combinadas no es necesario. De hecho, se prefiere que las poblaciones celulares combinadas se apliquen a un defecto de tejido sin cultivo *in vitro*, ya sea antes o después de combinar las dos poblaciones de células.

Los enfoques convencionales para la ingeniería de tejidos que inicia a partir de células multipotentes se basan en factores químicos, tales como factores de crecimiento, para estimular y lograr la diferenciación de las células multipotentes. En estos enfoques, las células multipotentes se someten a la acción de los factores químicos en *in vitro* para implantarse solo después de la diferenciación. Como ya se mencionó, de acuerdo con esto no es necesario el cultivo *in vitro*. En su lugar las células multipotentes cosechadas pueden aplicarse a un defecto de tejido en estado indiferenciado. De acuerdo con la invención, además, no es necesario el uso de factores químicos para lograr la diferenciación de células multipotentes. No obstante, la diferenciación puede mejorarse adicionalmente mediante el uso de dichos factores, que se abarcan, además en la invención. Algunos ejemplos de factores químicos que pueden usarse incluyen factores de adhesión celular tales como la vitronectina, tenascina, péptidos RGD, hialuronano, laminina, pronectina, o fibronectina o fragmentos de estos, por ejemplo, arginina-glicina-aspartato, y citoquinas u otros factores estimulantes de células liberables como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), hormona de crecimiento (GH), actividad estimulante de multiplicación (MSA), factor derivado de cartílago (CDF), proteínas morfogénicas óseas (BMP), factor-5 de diferenciación de crecimiento (GDF-5), dexametasona (dex) u otros factores osteogénicos, factores antiangiogénicos (angiostatina), y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Para la inducción de la diferenciación de células multipotentes en condrocitos, se ha encontrado que el uso de la fibronectina es particularmente ventajoso. Se conoce en general que la fibronectina inhibe la condrogénesis (West, C.M., R. Lanza, J. Rosenbloom, M. Lowe, H. Holtzer, y N. Avdalovic, Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts. Cell, 1979. 17(3): p. 491-501, Pennypacker, J.P., J.R. Hassell, K.M. Yamada, y R.M. Pratt, The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. Exp Cell Res, 1979. 121(2): p. 411-5). En contraste y sorprendentemente, ahora se ha descubierto que la fibronectina mejora la formación del cartílago (Figura 4) en un método de acuerdo con la invención. Sin querer estar sujeto a la teoría, se postula que una de las causas de esta mejora de la formación del cartílago puede ser que la fibronectina permite a los condrocitos mantener su morfología redonda.

Antes o después de combinar las poblaciones de células primarias y multipotentes, pueden sembrarse en un andamio biocompatible. Preferentemente, las poblaciones se combinan de una manera adecuada para asegurar una distribución homogénea de los dos tipos de células sobre la población celular combinada. En este sentido, se prefiere que las poblaciones se combinen antes de sembrarse en el andamio. Por otro lado, es factible, además, y bajo determinadas condiciones ventajosas, distribuir los dos tipos de células de forma compartimental sobre el andamio, de manera que los diferentes compartimentos comprendan predominantemente, o incluso exclusivamente células de un tipo celular.

La persona con experiencia en la técnica puede determinar fácilmente si es o no conveniente usar un andamio biocompatible en una determinada situación, en dependencia del tipo de tejido que necesite reparación y del tamaño del defecto. Particularmente para la reparación de defectos más grandes en los tejidos, tales como huesos o cartílagos, que tienen una mecánica, por ejemplo, baja carga, función, el uso de un andamio es beneficioso. La elección del material para el andamio dependerá del tipo de tejido implicado. Los ejemplos adecuados de materiales incluyen metales y aleaciones metálicas, cerámicas, (bio)vidrios y materiales poliméricos. Por supuesto, es importante que el material sea biocompatible, lo que significa que el material puede incorporarse en un cuerpo humano o animal sustancialmente sin respuestas inaceptables del humano o del animal.

Los materiales preferidos que se usan en la fabricación de un andamio son biocompatibles, biorreabsorbibles durante periodos de semanas o más, y generalmente fomentan la adhesión celular. El término "biorreabsorbible" se usa en la presente para indicar que el material se degrada en componentes que pueden reabsorberse en el cuerpo y que pueden biodegradarse adicionalmente. Los materiales biodegradables pueden degradarse mediante procesos biológicos activos como la división enzimática. Otras propiedades deseables de los materiales a usar en la fabricación de los dispositivos

descritos en la presente incluyen la solubilidad en un disolvente biológicamente aceptable que puede eliminarse a niveles seguros generalmente aceptables, y elasticidad y resistencia a la compresión y a la tracción.

Los polímeros naturales que son adecuados incluyen polisacáridos tales como celulosa, dextranos, quitina, quitosano, glicosaminoglicanos; ácido hialurónico o ésteres, sulfato de condroitina y heparina; y proteínas o proteinoides naturales o sintéticos tales como la elastina, colágeno, agarosa, alginato de calcio, fibronectina, fibrina, laminina, gelatina, albúmina, caseína, proteína de seda, proteoglicanos, Prolastina, Pronectina o BetaSilk. Pueden usarse además, mezclas de cualquier combinación de los polímeros, así como derivados modificados químicamente de los polímeros mencionados.

Los polímeros sintéticos que se han encontrado particularmente adecuados para fabricar un andamio incluyen copolímeros de polialquilenglicol y ésteres aromáticos y poli(alfa)ésteres, tales como: poli(ácido láctico) (PLA) y poli(ácido-co-glicólico-láctico-DL) (PLGA). Otros materiales adecuados incluyen: geles termorreversibles o fotocurables, tales como copolímeros plurónicos o de bloques de poli(D-lactida) y un dextrano injertado de poli(L-lactida), que comprende preferentemente un poliéster o una cadena principal de poli-α-aminoácido, y/o heparina, poli(épsilon - caprolactona) (PCL), polianhídridos, poliarilatos y polifosfaceno. Los polímeros sintéticos preferidos incluyen: poli(hidroxi alcanoatos), polidioxanona, ácidos poliamino, poli(ácido gamma-glutámico), poli(acetatos de vinilo), poli(alcoholes de vinilo), poli(etileniminas), poli(ortoésteres), polifosfoesteres, poli(tirosina-carbonatos), poli(etilenglicoles), poli(carbonato de trimetileno), poliiminocarbonatos, poli(oxietileno-polioxipropileno), poli(ácido alfa-hidroxi-carboxílico/polioxialquileno), poliacetales, poli(fumaratos de propileno), y carboximetilcelulosa.

En una modalidad altamente preferida, el andamio está formado por una clase específica de materiales poliméricos que tienen propiedades de hidrogel. Esta es la clase de copolímeros de un polialquilenglicol y un poliéster aromático. Preferentemente, estos copolímeros comprenden 40-80 % en peso, con mayor preferencia 50-70 % en peso del polialquilenglicol, y 60-20 % en peso, con mayor preferencia 50-30 % en peso del poliéster aromático. Un tipo preferido de copolímeros de acuerdo con la invención se forma por el grupo de copolímeros de bloque. Los polialquilenglicoles preferidos se seleccionan del grupo de polietilenglicol, polipropilenglicol y polibutilenglicol y los copolímeros de estos, como los poloxámeros. Un polialquilenglicol altamente preferido es el polietilenglicol. Los poliésteres preferidos se seleccionan del grupo de tereftalato de polietileno, tereftalato de polipropileno y tereftalato de polibutileno. Un poliéster altamente preferido es el tereftalato de polibutileno.

Preferentemente, el polialquilenglicol tiene un peso molecular promedio en peso de 150 a 10 000, con mayor preferencia de 200 a 1500. El poliéster aromático preferentemente tiene un peso molecular promedio en peso de 200 a 5000, con mayor preferencia de 250 a 4000. El peso molecular promedio en peso del copolímero preferentemente está entre 20 000 y 200 000, con mayor preferencia entre 50 000 y 120 000. El peso molecular promedio en peso puede medirse adecuadamente mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). Esta técnica, que se conoce en sí misma, puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de tetrahidrofurano como disolvente y poliestireno como estándar externo.

El andamio se construirá para lograr una estabilidad mecánica favorable y la proliferación y la diferenciación (ambas *in vivo*). Por supuesto, el andamio debería, además, tener el tamaño y la forma adecuados para el defecto que se reparará. Se prevé que se suministre un tamaño y forma estándar, o una combinación de tamaños y formas estándar a un cirujano que pueda moldear o adaptar la forma y el tamaño a las necesidades del defecto a tratar. Es posible además, que el andamio no tenga una forma particular, pero que permita inyectar las poblaciones combinadas de células primarias y multipotentes, por ejemplo, en forma de un gel inyectable. Las variables que pueden manipularse para lograr un efecto deseado son ,*entre otras* la macroestructura, composición química, microestructura que incluye porosidad, tamaño de poro (diámetro), modificaciones superficiales como tensioactivos y péptidos de adhesión celular, incorporación agentes bioactivos, propiedades de flujo (por ejemplo, canales que dirigen y controlan el flujo de fluido a través y dentro del andamio) y los elementos estructurales sobre o en el andamio.

A menudo, el andamio tendrá una estructura porosa o fibrosa para facilitar el transporte de nutrientes a las células sembradas en él, y de materiales de desecho a partir de las células sembradas sobre y/o en él. Una estructura porosa de un material polimérico puede obtenerse mediante cualquier método conocido, como la lixiviación de sales o la sinterización. En principio, puede usarse cualquier combinación de técnicas, como la inversión de fase, el secado por congelación y la lixiviación de sales. Es posible emplear además, un andamio que se fabrique de forma libre, proceso rápido de prototipado o impresión en 3D.

En una modalidad preferida, la superficie exterior del andamio se proporciona parcial o completamente con un recubrimiento cerámico. Preferentemente, el recubrimiento cerámico es un recubrimiento de fosfato de calcio, por ejemplo, un recubrimiento que comprende fosfato de octacalcio, una apatita, como hidroxiapatita o apatita de carbonato, una whitlockita, como fosfato α-tricálcico, fosfato β-tricálcico, fosfato de calcio y sodio o una combinación de estos. Es posible usar además, un andamio que es una estructura compuesta bifásica de un material cerámico y un material polimérico. Se ha encontrado que la presencia del material cerámico es altamente beneficiosa ya que puede usarse para imitar las propiedades del hueso.

La siembra de las poblaciones celulares puede llevarse a cabo de cualquier manera conocida, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de siembra, siembra estática, dinámica o de perfusión, o una combinación de estos.

Después de combinar las poblaciones de células primarias y multipotentes, se aplican al defecto. Una de las ventajas de la invención es que no está implicada la expansión a través del cultivo de las células *in vitro*. Las células primarias y multipotentes estarán disponibles para el sitio del defecto para inducir y apoyar la reacción de la reparación natural del cuerpo. Sin querer estar sujeto a la teoría, se cree que las células primarias producen y secretan factores específicos como respuesta a su entorno natural, cuyos factores mejorarán o inducirán la diferenciación de las células multipotentes en un linaje específico de tejido. Por lo tanto, mediante la aplicación de células primarias, la población de células multipotentes se proporciona con una 'fábrica' que establece una cascada natural de factores de crecimiento y otros implicados en la reparación del tejido.

Como ya se indicó anteriormente, se prefiere que las dos poblaciones de células se distribuyan de forma homogénea sustancialmente entre sí antes de la aplicación al defecto. Esto puede lograrse mediante la resuspensión de la mezcla de las dos poblaciones de células mediante rotación o decantación, preferentemente justo antes de la aplicación. En caso de que las poblaciones combinadas de células deban aplicarse al defecto junto con un andamio, preferentemente estas se combinan primero y luego se siembran en el andamio. El andamio que comprende las poblaciones combinadas de células puede aplicarse después al defecto.

La manera en que se aplicarán las poblaciones combinadas de células al defecto dependerá del tipo de tejido en el que existe el defecto y sobre si se usa o no un andamio. Los modos adecuados de aplicar las células incluyen puras (es decir, solo células), directas en gel o pegadas a tejidos para su aplicación en sitios que no necesitan estabilidad mecánica inmediata, o siembra en gel o pegada a tejido en un andamio para su aplicación en sitios que sí lo necesitan. La siembra de células en un andamio, o su aplicación al sitio de reparación de tejidos puede asistirse mediante el uso de un factor de agregación, como la fibronectina o la vitronectina. Las células pueden aplicarse además, bajo el periostio suturado sobre el defecto del tejido y cerrarse con pegamento de fibrina. Factores como el hialuronano, glicosaminoglicanos o inhibidores de la apoptosis celular pueden agregarse para mejorar la supervivencia celular después del implante, cuando se considere útil.

Se contempla opcionalmente proporcionar un estuche para llevar a cabo un método como el descrito anteriormente. El estuche proporciona preferentemente al personal médico todos los materiales y equipos necesarios para llevar a cabo el presente procedimiento para la reparación de tejidos. Por lo tanto, un estuche comprende medios para tomar una biopsia de una población de células primarias, medios para realizar una biopsia de una población de células multipotentes, y medios para aplicar una combinación de ambas poblaciones a un defecto de tejidos. En una modalidad preferida, el estuche comprende además, un andamio biocompatible, como se describió anteriormente, y medios para sembrar las poblaciones combinadas de células multipotentes y primarias en el andamio. Se prefiere además que el estuche comprenda medios para aislar las células a partir de una biopsia.

Los ejemplos de dispositivos o equipos para tomar una biopsia de una población de células multipotentes incluyen agujas y jeringas de aspiración, preferentemente, incluyen una aguja para biopsia de calibre 8 para las biopsias de médula ósea.

Los ejemplos de dispositivos o equipos para tomar una biopsia de una población de células primarias incluyen, en dependencia del tipo de células primarias, una cureta de anillo de diámetro pequeño (preferentemente, como máximo 6 mm), o una ranura de Notchplastia.

Los medios o instrumentos adecuados para aislar las células, es decir, las células multipotentes y primarias, a partir de una biopsia son *entre otras* enzimas, como la colagenasa, hialuronidasa, elastasa, papaína, tripsina o dispasa.

El estuche comprende además, preferentemente, medios para combinar y mezclar las poblaciones de células primarias y multipotentes. Para este fin, pueden estar presentes los instrumentos como un filtro de células, material de plástico para el procesamiento de las células, un sistema de filtro celular y una o más pipetas.

Los medios adecuados para sembrar las células en un andamio que pueden estar presentes en un estuche incluyen dispositivos simples de siembra tales como una cámara confinada o no confinada, o un sistema de perfusión.

Los ejemplos de medios para aplicar las poblaciones combinadas de células multipotentes y primarias, o el andamio con las poblaciones combinadas de células multipotentes y primarias sembradas sobre un defecto de tejido, que pueden estar presentes en un estuche incluyen pegamento tisular, geles, factores de agregación celular y una o más jeringas.

La invención ahora se explicará más aún mediante analogía a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 Inducción de diferenciación mediante la mezcla de condrocitos primarios y expandidos en ensayo de cultivo de gránulos en diferentes condiciones.

Los condrocitos se aislaron del cartílago bovino adulto de la tibia mediante la digestión con la colagenasa tipo II (Worthington). Las células aisladas se sembraron a una densidad de 3500 células/cm$^2$ y se subcultivaron para 3 pasajes en medio que contenía DMEM, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 1x, AsAP 0,2 mM, penicilina 100 U, 100 µg/mL de estreptomicina, prolina 0,4 mM y FBS al 10 % a 37 °C/ $CO_2$ al 5 %. Las células primarias y expandidas se cultivaron en ensayo de gránulos en las siguientes condiciones; los gránulos de células expandidas compartieron el medio con

gránulos de células primarias (A) el gránulo de células expandidas cultivado en medio acondicionado con gránulos de células primarias (B). Gránulos de una mezcla 50/50 de células primarias y expandidas(C). Control +; gránulos de células primarias (D) control -; gránulos de células expandidas (E). Después de 2 semanas en cultivo, los gránulos se fijaron con aldehído glutárico al 1,5 % en tampón de cacodilato (0,14 M/pH 7,2-7,4) para la tinción con safraninO, se embebieron y se congelaron en el compuesto de OCT (Tissue-Tek) para la inmunotinción o se congelaron a -80 °C para el ensayo cuantitativo de GAG y de ADN. Los glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) se tiñeron con safraninO y se contratiñeron con hematoxilina y verde rápido respectivamente para el núcleo y el citoplasma. Las criosecciones se fijaron con acetona y se tiñeron para el colágeno tipo II (1:100, DSHB II-II6B3) o el colágeno tipo I (1:1000, Ab-1, Calbiochem). El bloqueo se realizó con suero humano al 10 % y se usó un anticuerpo anti-ratón de cabra secundario (1:100, DAKO). La tinción se visualizó con solución DAB (DAKO) durante 10 minutos.

Los resultados de safraninO y colágeno tipo II muestran que las células del grupo C y D producen GAG específico del cartílago en todos los gránulos mientras que los gránulos del grupo A, B y E no producen en absoluto GAG. Los resultados inmunoquímicos muestran además, que solo las células en el anillo externo de un gránulo del grupo C y D expresan Colágeno tipo I, lo que confirma que la diferenciación de las células en el gránulo de células mixtas (C) está en niveles comparables como en el gránulo de células primarias. Mientras que la tinción de colágeno tipo I de los gránulos en los grupos A, B y E se encuentra en todos los gránulos, no puede encontrarse colágeno tipo II específico en los gránulos de estos grupos. Por lo tanto, se concluye que los condrocitos expandidos no se estimulan para diferenciarse, por lo tanto producen una matriz extracelular específica del cartílago, mediante el cultivo ya sea en medio compartido con células primarias o medio condicionado con células primarias. Sin embargo, cuando están en contacto célula a célula con las células primarias, estos resultados demuestran que la diferenciación se estimula y los GAG se producen en niveles comparables en los gránulos de células primarias mixtas y expandidas con respecto a sólo células primarias. Con estos resultados se demuestra que el contacto célula a célula induce la diferenciación.

Ejemplo 2 Diferenciación en gránulos que consiste en una mezcla de células primarias y expandidas en varias relaciones.

El experimento se diseñó para examinar la capacidad de diferenciación de diferentes relaciones de células primarias/expandidas en el ensayo de gránulos.

Los condrocitos se aislaron del cartílago bovino adulto de la tibia mediante la digestión con la colagenasa tipo II (Worthington). Las células aisladas se sembraron a una densidad de 3500 células/$cm^2$ y se subcultivaron durante 3 pases en medio que contenía DMEM, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 1x, AsAP 0,2 mM, penicilina 100 U, estreptomicina 100 µg/mL, prolina 0,4 mM y FBS al 10 % a 37 °C/ $CO_2$ 5 %. Los gránulos de una mezcla 50/50 de células primarias y expandidas se cultivaron en el medio descrito anteriormente. Después de 2 semanas en cultivo, los gránulos se fijaron con glutaraldehído 1,5 % en tampón de cacodilato (0,14 M/pH 7,2-7,4) para la tinción de safraninO, se incrustaron y se congelaron en compuesto de OCT (Tissue-Tek) para la inmunotinción o se congelaron a -80 °C para el ensayo cuantitativo de GAG y de ADN. Los glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) se tiñeron de rosa con safraninO y se contratiñeron con hematoxilina y de verde rápido respectivamente para el núcleo (marrón) y citoplasma (azul). Las criosecciones se fijaron con acetona y se tiñeron para el colágeno tipo II (1:100, DSHB II-II6B3) o el colágeno tipo I (1:1000, Ab-1, Calbiochem). El bloqueo se realizó con suero humano al 10 % y se usó un anticuerpo anti-ratón de cabra secundario (1:100, DAKO). La tinción se visualizó con solución DAB (DAKO) durante 10 minutos. Las muestras para el ensayo cuantitativo de GAG y de ADN se digirieron con 50 mg/mL de proteinasa K (SIGMA) durante >16 horas a 56 °C. El contenido de GAG se determinó espectrofotométricamente con tinción con cloruro de azul de 9-dimetilmetileno (DMMB) en tampón PBE (14,2 g/L de $Na_2HPO_4$ y 3,72 g/L de $Na_2EDTA$, pH 6,5) y el ensayo de ADN se realizó con el ensayo de ADN CyQuant de acuerdo con la descripción del fabricante.

Con referencia a la Figura 2 las células primarias/expandidas se mezclaron a las relaciones indicadas y se cultivaron en un ensayo de gránulos (500 000 células/gránulos) durante 2 semanas. Los resultados cualitativos de GAG y de colágeno tipo II demuestran que solo en gránulos con 0/100 células primarias/expandidas no pudo encontrarse GAG o colágeno tipo II, mientras que se demuestra que solo en gránulos con 100/0 células primarias/expandidas está presente el colágeno tipo II. Con estos resultados que con cantidades decrecientes de las células primarias se mantiene el nivel de diferenciación a lo largo de los gránulos (A). Además, los resultados cuantitativos de GAG/ADN (B) demuestran que cuando la cantidad de células primarias disminuye al 10 %, la diferenciación aún se mantiene a niveles comparables con las células primarias solo en el ensayo de cultivo de gránulos. Además, cuando el número de células primarias disminuye aún más al 2 %, la cantidad de GAG/ADN es aproximadamente 25 veces mayor de lo esperado a partir de la misma cantidad de células primarias solamente. Sorprendentemente, los resultados del número de células demuestran que solo cuando la cantidad de células primarias en el gránulo se eleva por encima del 25 %, se produce la proliferación.

Con estos resultados, se demuestra que en una mezcla celular de condrocitos primarios/expandidos se estimula la diferenciación incluso cuando la cantidad de células primarias disminuye al 2 % de la población celular total. Los resultados cuantitativos de GAG/ADN en realidad demuestran que la cantidad de GAG en los gránulos que contenían 2 % de células primarias es aproximadamente 25 veces mayor de lo que puede esperarse a partir de la misma cantidad de células primarias solamente. Con estos datos se demuestra que la diferenciación se mejora fuertemente por una pequeña cantidad de células primarias en presencia de una gran cantidad de células desdiferenciadas como los condrocitos cultivados.

Ejemplo 3. Diferenciación de fibroblastos / condrocitos primarios y células de médula ósea / condrocitos primarios respectivamente en ensayo de gránulos.

El experimento se diseñó para evaluar la capacidad de diferenciación de los tipos de células multipotentes diferentes mezcladas con condrocitos primarios en el ensayo de gránulos. Los fibroblastos procedieron de una línea celular de fibroblastos 3T3 y se cultivaron en DMEM (BioWhitakker #BE12-604F) penicilina 100 U/mL, 100 µLg/mL de estreptomicina y FBS al 5 % y las células de médula ósea se aislaron de la biopsia de médula ósea humana y se cultivaron en αMEM (Gibco #22571-020) que contenía SFB al 10 %, penicilina 100 U/mL, 100 µg/mL de estreptomicina y AsAP 10 mM y 1 ng/mL de bFGF. Los condrocitos se aislaron a partir de una biopsia de cartílago articular humano de la rodilla. Después de mezclar los gránulos se cultivaron a 37 °C/ $CO_2$ al 5 % en medio que contenía DMEM (Gibco #41965-039), HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 1x, AsAP 0,2 mM, de penicilina 100 U, 100 µg/mL de estreptomicina, prolina 0,4 mM y FBS al 10 %. Con referencia a la Figura 3 las mezclas de células de 50 % de células primarias y 50 % de fibroblastos respectivamente o las células de médula ósea se centrifugaron para formar los gránulos y se cultivaron durante 3 semanas. Las secciones de los gránulos se tiñeron para Glicosaminoglicanos Sulfatados (GAG) con safraninO (rosa). Los resultados demuestran la producción de GAG en los gránulos cuando los condrocitos se mezclaron con fibroblastos-3T3 o las células de médula ósea pero no en los gránulos de fibroblastos o las células de médula ósea solamente. Lo que indica la estimulación de la diferenciación en un linaje de cartílago con fibroblastos o células de médula ósea (células multipotentes) cuando se mezcla con los condrocitos primarios.

Ejemplos 4 y 5. Diferenciación de la mezcla de células primarias/expandidas en andamio PEGT/PBT 300/55/45 in vivo.

El experimento se diseñó para examinar la capacidad de diferenciación de diferentes mezclas de células primarias/expandidas en un andamio poroso in vivo, ya sea en presencia o no de un factor implicado en la agregación de las células (fibronectina).

Los condrocitos se aislaron a partir de una biopsia de cartílago articular humano de la rodilla mediante digestión con colagenasa tipo II (Worthington). Las células aisladas se sembraron a una densidad de 3500 células/$cm^2$ y se subcultivaron para 3 pasajes en medio que contenía DMEM, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 1x, AsAP 0,2 mM, penicilina 100 U, 100 µg/mL de estreptomicina, prolina 0,4 mM y FBS al 10 % a 37 °C/ $CO_2$ al 5 %. Las células primarias se aislaron a partir de cartílago bovino maduro y se combinaron con células expandidas a las siguientes relaciones: 0/100, 100/0, y 2/98, 20/80 y 50/50. Las mezclas de células se incubaron durante 1 hora con 300 µg/mL de fibronectina para formar agregados y se sembraron dinámicamente en andamios porosos durante 24 horas en tubos Eppendorf con un filtro de intercambio de gases a 37 °C/ $CO_2$ al 5 % en medio de cultivo. Los andamios porosos se fabricaron de copolímeros segmentados de tereftalato (PEGT) de poli(etilenglicol) y poli(tereftalato de butileno) (PBT) con una relación en peso de 55/45 PEGT/PBT y un peso molecular de 300 para el PEG. Después de 7 días de cultivo estático en el medio de cultivo descrito anteriormente, los andamios sembrados se implantaron por vía subcutánea en ratones desnudos. Para cada grupo experimental se implantaron 8 andamios y para los controles 6. Después de 4 semanas se explantaron los andamios y se determinó la relación en peso del total y la mitad de uno de los andamios para el análisis cuantitativo de glicosamina glicano (GAG) y de ADN. La mitad del andamio se digirió con proteinasa K (SIGMA) 50 mg/mL durante > 16 horas a 56 °C. El contenido de GAG se determinó con tinción con cloruro de azul de 9-dimetilmetileno (DMMB) en tampón PBE (14.2 g/l de $Na_2HPO_4$ y 3,72 g/L de $Na_2EDTA$, pH 6,5) en un espectrofotómetro (540 nm) y el ensayo de ADN se realizó con el ensayo de ADN CyQuant de acuerdo con la descripción del fabricante.

Con referencia a la Figura 4, se sembraron mezclas de las células con relación 50/50 de células primarias / expandidas en andamios porosos (Mw PEG)/(p/p PEGT/PBT) 300/55/45. La mezcla de células no tratada se sembró en un andamio no tratado (*control*), la mezcla de células no tratada se sembró en el andamio recubierto con fibronectina (300 µg/mL)(*andamio recubierto de FN*) o la mezcla de células tratada con fibronectina (300 µg/mL) se sembró en andamios no tratados (*células agregadas con FN*). Los andamios se implantaron por vía subcutánea en ratones desnudos y después de 4 semanas se explantaron las muestras y se cuantificó la relación GAG/andamio. Los resultados demuestran que la agregación de células en presencia de la fibronectina aumenta la producción de GAG/ADN de la mezcla de células primarias/expandidas 50/50.

Con referencia a la Figura 5 se agregaron las mezclas de células con diferentes relaciones de células primarias/expandidas en presencia de 300 µg/mL de fibronectina y se sembraron en andamios porosos (Mw PEG)/(p/p PEGT/PBT) 300/55/45. Los andamios se implantaron por vía subcutánea en ratones desnudos y después de 4 semanas se explantaron las muestras y se cuantificó la relación GAG/andamio. Los resultados demuestran que en presencia del 20 % de células primarias el contenido de GAG/andamio es igual al de los andamios con el 100 % de las células primarias. Además cuando el 50 % de las células primarias se mezclan con el 50 % de células expandidas el contenido de GAG/andamio aumenta >1,5.

En la Figura 5, los µg de GAG/andamio se normaliza a una relación de 0/100 células al sustraer un valor constante. Los medios acondicionados por células primarias demostraron ser ineficaces para inducir la condrogénesis en las células multipotentes.

Se conoce en general que la fibronectina inhibe la condrogénesis. En contraste y sorprendentemente, se descubrió que la fibronectina mejora la formación del cartílago (Figura 4) en el sistema de inducción mencionado.

Para retener las células en el sitio defectuoso, particularmente para un procedimiento interoperatorio y autólogo, preferentemente, se toman o necesitan medidas específicas, es decir, mediante el uso de geles u otros medios para inmovilizar las células sin depender de la fijación celular sobre un sustrato que necesita un período de tiempo sustancial.

Para proteger las células de la poscirugía de carga conjunta, preferentemente, las células estarán rodeadas por un andamio o gel u otro medio que proporcione algún o un completo soporte mecánico. Para la reparación del cartílago, preferentemente, el andamio usado es funcional mecánicamente, es decir, muestra similitudes con las propiedades mecánicas del cartílago.

De estos resultados está claro que la capacidad de diferenciación de las mezclas de células primarias/expandidas de 20/80 en andamios porosos *in vivo* es igual a las células primarias solas.

En estos ejemplos, las células se trataron con la fibronectina para ilustrar que la diferenciación puede ser apoyada por la agregación de las células. Para agregar las células pueden usarse otros factores específicos del tejido como la vitronectina, laminina, hialuronano. El andamio escogido para este estudio es un ejemplo de un andamio adecuado para soportar las propiedades mecánicas de un tejido específico, en este caso el cartílago, inmediatamente después del implante. En este ejemplo, el andamio escogido se usa además, como un vehículo para aplicar una mezcla de las células en el defecto.

Reivindicaciones

1. Un método para inducir la diferenciación de células multipotentes a un tipo de célula deseado mediante la exposición de una población de células multipotentes a una población de células primarias del tipo celular deseado in vitro, en donde, la relación del número de células en la población de las células primarias y el número de células en la población de las células multipotentes es de 1:200 a 2:3.

2. Uso de una combinación de una población de células multipotentes y una población de células primarias para la fabricación de un medicamento para la reparación de los tejidos, en donde, la relación del número de células en la población de células primarias y el número de células en la población de células multipotentes es de 1:200 a 2:3.

3. Uso de una combinación de una población de células multipotentes y una población de células primarias para la fabricación de un medicamento para la reparación de los tejidos, en donde, la relación del número de células en la población de células primarias y número de células en la población de células multipotentes es de 1:200 a 2:3.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, o la composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde, las células primarias son de un tipo celular que se produce naturalmente en el tejido que necesita la reparación.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, o la composición de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde, las células primarias son células nerviosas, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, cardiomiocitos, miocitos, células de Schwann, células uroteliales, células del duodeno yeyuno, células de los ligamentos cruzados o los tendones o las células del folículo piloso.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3, o el método, el uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la población de células multipotentes y/o la población de células primarias se aisló a partir de una biopsia.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3, o el método, el uso o la composición de acuerdo con la reivindicación 4, 5 o 6, en donde las células multipotentes y las células primarias son células humanas.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3, o el método, el uso o la composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 7, en donde, las células multipotentes son células madre, células progenitoras, células madre mesenquimales, células de médula ósea, fibroblastos o células satélite.

9. El método, el uso o la composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde, las células multipotentes son células de médula ósea.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3, o el método, el uso o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde, la relación entre el número de las células en la población de células primarias y el número de las células en la población de células multipotentes es de 1:100 a 1:3.

11. El método, el uso o la composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde, la relación entre el número de las células en la población de células primarias y el número de las células en la población de células multipotentes es de 1:50 a 1:5.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3 o el método, el uso o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde, la población de células multipotentes y la población de células primarias se combinan sin haber sido cultivadas *in vitro.*

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3, o el método, el uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en donde, las poblaciones combinadas de células multipotentes y primarias no se han cocultivado *in vitro.*

14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, la composición de acuerdo con la reivindicación 3, o el método, el uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en donde, la población de células multipotentes y la población de células primarias se proporcionan en un andamio biocompatible.

15. El método, el uso o la composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde al andamio biocompatible se fabrica de un material seleccionado del grupo de metales y aleaciones metálicas, cerámicas, (bio)vidrios, materiales poliméricos naturales y sintéticos, y combinaciones de estos.

16. El método, el uso o la composición de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el andamio biocompatible se fabrica de un copolímero de un polietilenglicol y un tereftalato de polibutileno.

17. El método, el uso o la composición de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el andamio biocompatible se cubre parcial o completamente por un recubrimiento de fosfato de calcio.

18. El método, el uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde la población de células multipotentes y la población de células primarias se proporcionan en el andamio biocompatible sin haberse cultivado *in vitro.*

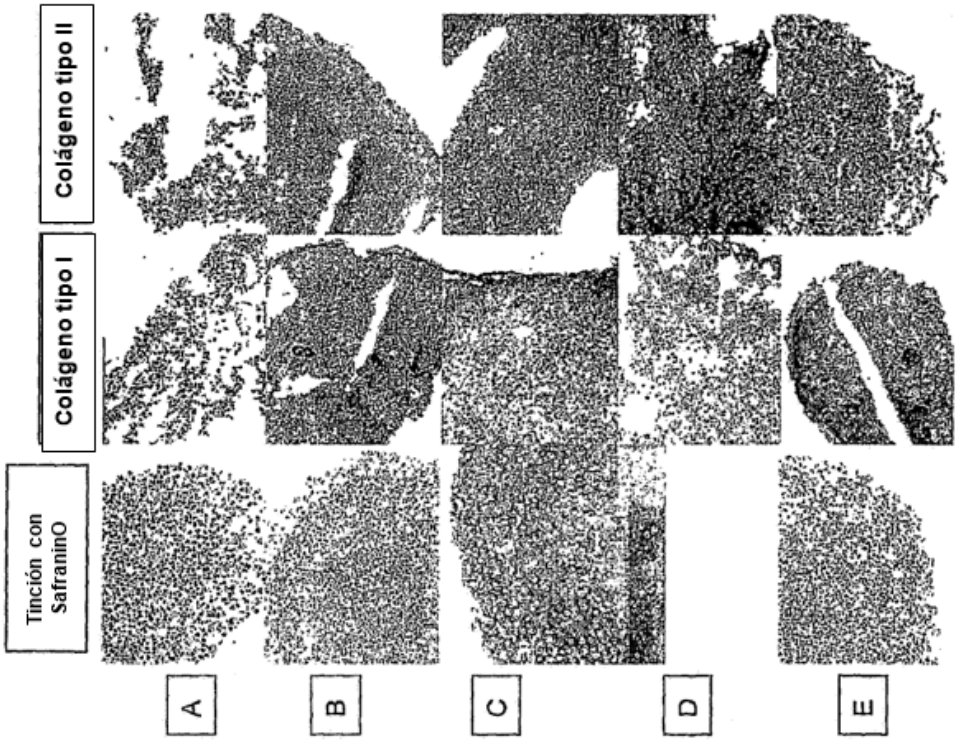
Tinción con SafraninO
Colágeno tipo I
Colágeno tipo II
A
B
C
D
E

Figura 1

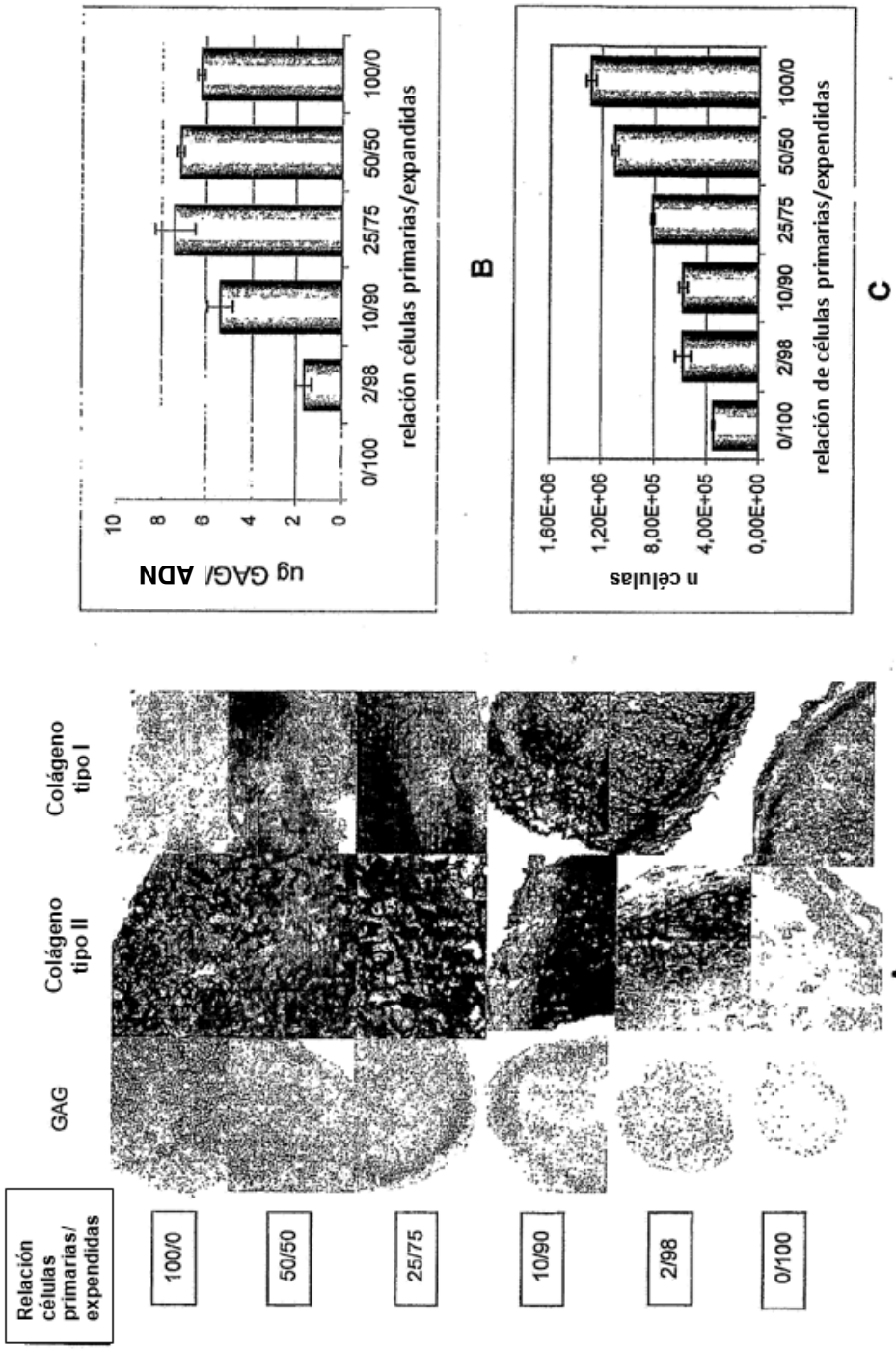
Relación células primarias/ expendidas
GAG
Colágeno tipo II
Colágeno tipo I
100/0
50/50
25/75
10/90
2/98
0/100
A
ug GAG/ ADN
10
8
6
4
2
0
0/100
2/98
10/90
25/75
50/50
100/0
relación células primarias/expandidas
B
n células
1,60E+06
1,20E+06
8,00E+05
4,00E+05
0,00E+00
0/100
2/98
10/90
25/75
50/50
100/0
relación de células primarias/expendidas
C

Figura 2

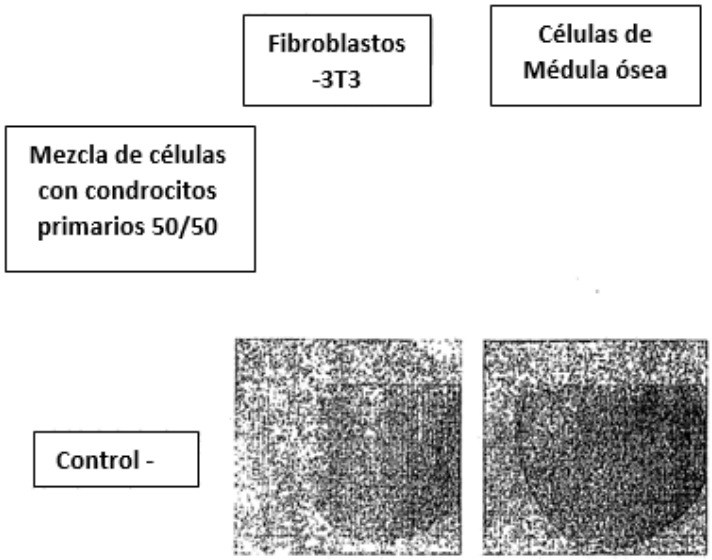
Fibroblastos -3T3
Células de Médula ósea
Mezcla de células con condrocitos primarios 50/50
Control -

Figura 3

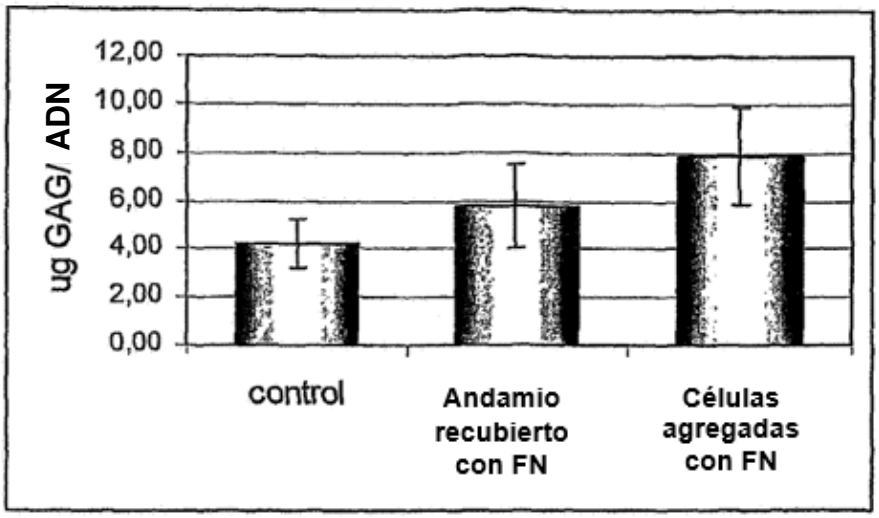


Figura 4

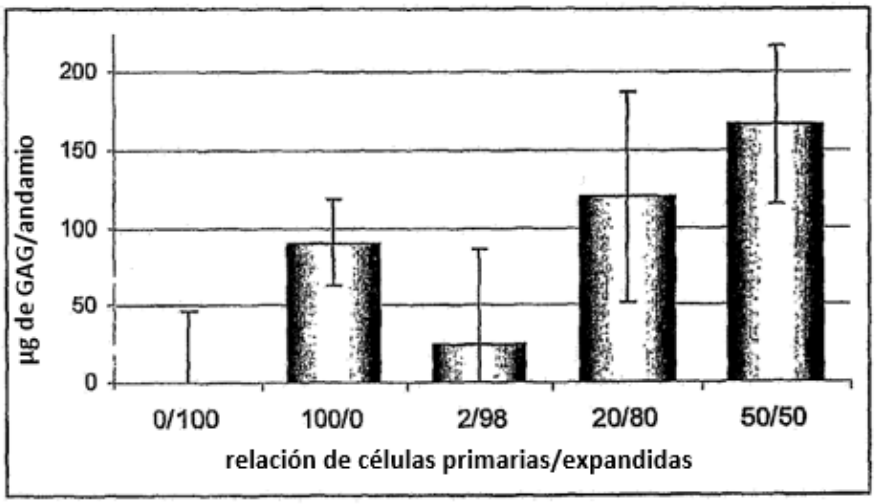


Figura 5