

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 706**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/EP2015/065782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005543**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15739536 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3167291**

54 Título: **Identidad y pureza de biopsias tisulares**

30 Prioridad:

11.07.2014 DE 102014213571

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

12.03.2019

73 Titular/es:

**TETEC TISSUE ENGINEERING TECHNOLOGIES
AG (100.0%)
Aspenhaustrasse 18
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:

**BENZ, KARIN;
FREUDIGMANN, CHRISTIAN;
GAISSMAIER, CHRISTOPH;
HECKY, JOCHEN y
MOLLENHAUER, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 703 706 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

Identidad y pureza de biopsias tisulares

Campo de aplicación y estado de la técnica

5 [0001] La invención se refiere a un método para la detección *in vitro* y/o a la determinación *in vitro* de la pureza de tejido cartilaginoso, un método para la producción de un cultivo de células de cartílago, un método para la producción de un implante cargado de células de cartílago, la utilización de fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa así como la utilización de un kit.

10 [0002] Para la realización de un trasplante de condrocitos asistido por matriz (MACT, por sus siglas en inglés) es necesario, que puedan realizarse indicaciones cuantitativas de la identidad y la pureza del tejido cartilaginoso utilizado así como de las células de cartílago utilizadas (condrocitos), que deben introducirse en los implantes o matrices previstos para la implantación.

[0003] Hasta ahora se realiza la detección de la identidad del tejido cartilaginoso utilizado sobre el lugar de toma de muestra. Sin embargo, este procedimiento anatómico carece de una prueba de la toma correcta y no permite una cuantificación del material de tejido tomado con respecto a la pureza frente a tejido conjuntivo y hueso.

15 [0004] En caso de un tejido cartilaginoso tomado en una articulación de rodilla humana o animal, no puede excluirse, por ejemplo, una contaminación con tejido conjuntivo, como por ejemplo sinovia y/o hueso subcondral. Además, la identidad del tejido cartilaginoso es cuestionable en los casos en los cuales la naturaleza de la biopsia no permite una asignación anatómica unívoca.

20 [0005] Fundamentalmente, la identidad, así como la pureza, de biopsias de cartílago puede examinarse inmunohistológicamente. Además de problemas en la viabilidad práctica bajo condiciones de sala limpia, las investigaciones inmunohistológicas tienen sin embargo la desventaja de que siempre son evaluables solo segmentos pequeños del cartílago preparado, puesto que los preparados de cortes histológicos presentan típicamente un espesor < 10 µm. Por lo tanto, no es posible una detección exhaustiva de la pureza y la identidad que comprenda todo el preparado.

25 [0006] La validación de biopsias regeneradas a través de la detección un telopéptido C-terminal de colágeno de tipo I así como un epítipo α1(II)-CB11B se conocen (Sally C. Dickinson et al.: "Quantitative Outcome Measures of Cartilage Repair in Patients Treated by Tissue Engineering", Tissue Engineering volumen 11, nº 1/2, 2005 y Anthony P. Hollander et al.: "Quantitative analysis of repair tissue biopsies following chondrocyte implantation", Tissue Engineering of Cartilage and Bone. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 249) p. 218-233).

30 [0007] Además, se conoce la evaluación de colágeno de los tipos I y II en vista de su aptitud como marcador bioquímico para la evaluación de la calidad mecánica de tejido cartilaginoso regenerado (Daniel J. Kelly et al.: "Biochemical markers of the mechanical quality of engineered hyaline cartilage", J Mater Sci: Mater Med (2007) 18: 273-281).

35 [0008] De WO 94/14070 A1 se conoce un método para la determinación de la degradación del cartílago, en el cual se utilizan anticuerpos monoclonales para la detección de epítipos α1(II)-CB11B.

Objetivo y solución

40 [0009] Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto proporcionar un método para la detección *in vitro* y/o la determinación *in vitro* de la pureza de tejido cartilaginoso, que evite las desventajas conocidas del estado de la técnica. El método debe permitir en particular una determinación de la identidad indudable así como, al mismo tiempo, una determinación de la pureza de tejido cartilaginoso. Además, es un objeto de la invención proporcionar un método para la producción de un cultivo de células de cartílago, así como un método para la producción de un implante cargado de células de cartílago. Además, es un objeto de la invención proporcionar la utilización de fragmentos de colágeno resistentes a la proteasa, así como la utilización de un kit para la realización del método citado anteriormente.

45 [0010] Estos objetos se consiguen mediante procedimientos según las reivindicaciones 1, 13 y 14, así como por una utilización según la reivindicación 15. Se definen formas de realización preferidas en las reivindicaciones dependientes 2 a 12. La redacción de todas las reivindicaciones se incorpora en la presente por referencia

explícita en el contenido de la presente descripción. Otras propuestas de soluciones se divulgan en la descripción.

5 [0011] La invención se refiere según un primer aspecto a un método para la detección *in vitro*, es decir, para la identificación *in vitro*, de tejido cartilaginoso y/o la determinación *in vitro* de la pureza de tejido cartilaginoso. El tejido cartilaginoso es tejido cartilaginoso preferiblemente hialino, particularmente articular. El método comprende los pasos siguientes:

- a) tratar una muestra de tejido con una proteasa y
- b) examinar las muestras de tejido tratadas con proteasa para la presencia de fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa y/o de fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa.

10 [0012] En otras palabras, las muestras de tejido tratadas con proteasa, es decir, digeridas con proteasa, se examinan al realizar el paso b) para fragmentos de colágeno resistentes a la proteasa, es decir, estables frente a una proteasa, que se liberan mediante la degradación de colágeno tipo II y/o mediante la degradación de colágeno tipo I.

15 [0013] Al realizar el paso a) se licúa generalmente la muestra de tejido, de modo que los fragmentos de colágeno mencionados anteriormente se liberan por lo general en una muestra de tejido licuada.

20 [0014] El colágeno tipo II representa en general el colágeno principal del tejido cartilaginoso. Este tipo de colágeno no se halla en el tejido conjuntivo, como por ejemplo la sinovia o el tejido óseo, como por ejemplo el tejido óseo subcondral. Tanto el tejido conectivo como también el óseo pueden actuar como tejido extraño contaminante, por ejemplo, en biopsias articulares. Los tejidos óseo y conectivo contienen respectivamente colágeno tipo I como colágeno principal, que a su vez no existe en el tejido cartilaginoso.

25 [0015] La invención se basa pues sobre el conocimiento sorprendente de que los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa permiten la determinación de la identidad, así como de la pureza del tejido cartilaginoso. Se ha podido constatar particularmente a este respecto, que la cantidad de fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa liberados es proporcional a la cantidad de cartílago contenida en la muestra y la cantidad de fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa liberados es proporcional a la cantidad de tejido extraño contenida en la muestra. Esto permite a su vez no solo una mera identificación de tejido cartilaginoso, sino también, en presencia de tejido extraño, una identificación cuantitativa de tejido cartilaginoso, es decir, una determinación del grado de pureza del tejido cartilaginoso detectado o identificado en la muestra.

30 [0016] Si se determina en el marco del procedimiento según la invención, que la muestra de tejido examinada según el paso b) contiene fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa, se puede clasificar la muestra como tejido cartilaginoso. Si se constata a su vez que la muestra de tejido no contiene ningún fragmento de colágeno tipo I resistente a la proteasa, la muestra examinada se trata de tejido cartilaginoso puro. En otras palabras, la detección de fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa en ausencia simultánea de fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa identifica tejido cartilaginoso puro. Puesto que el tejido cartilaginoso consiste solo en un tipo celular, es decir, los llamados condrocitos (células de cartílago) (Mollenhauer J, Kuettner KE: Articular Cartilage. En: Principles of Orthopaedic Practice. 2ª Edición. Eds: R. Dee, L.C. Hurst, M.A. Gruber, Stephen A. Kottmeier. Nueva York, McGraw Hill, 1997), el método según la invención permite, además, a través de una identificación exitosa de tejido cartilaginoso, una identificación clara de condrocitos.

35 [0017] Si se determina en el marco del procedimiento según la invención, que la muestra de tejido examinada según el paso b), además de fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa, contiene también fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa, se puede asociar así la muestra con un tejido cartilaginoso contaminado con células extrañas y/o tejido extraño. Además, se puede determinar el grado de pureza de la muestra en relación con el tejido cartilaginoso a través de las cantidades liberadas de fragmentos de colágeno tipo II y colágeno tipo I resistentes a la proteasa. Como células extrañas entran en consideración principalmente fibroblastos, células endoteliales y/u osteoblastos. Como tejidos extraños se toman en consideración el tejido óseo y el conectivo ya mencionados.

40 [0018] Si se determina finalmente, en el marco del procedimiento según la invención, que la muestra de tejido examinada según el paso b) no contiene ningún fragmento de colágeno tipo II resistente a la proteasa, se puede excluir la presencia de tejido cartilaginoso.

- 5 [0019] Como ventaja particular se enfatiza que el método según la invención permite una identificación específica de muestras de tejido, que, debido a su grado de pureza en relación con tejido cartilaginoso, son adecuadas de manera particular como material de partida para un cultivo exitoso de células de cartílago y particularmente para un implante exitoso de células de cartílago, preferiblemente un trasplante de condrocitos asistido por matriz (MACT).
- [0020] En una forma de realización preferida, el método según la invención se prevee para la detección *in vitro* de tejido cartilaginoso y para la determinación *in vitro* de la pureza del tejido cartilaginoso.
- 10 [0021] Preferiblemente, al realizar el paso b), la muestra de tejido tratada con proteasa se examina tanto para fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa como también para fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa.
- [0022] En otra forma de realización, la muestra de tejido es una biopsia de tejido humano o animal, preferiblemente humano, o un fragmento de una tal biopsia de tejido.
- 15 [0023] En otra forma de realización, la muestra de tejido es una biopsia de cartílago o un fragmento de la misma. A los efectos de la presente invención, la expresión "biopsia de tejido" no debe comprender solo biopsias que consisten exclusivamente en tejido cartilaginoso, es decir, en tejido cartilaginoso puro, sino también biopsias que, además de tejido cartilaginoso, contienen otros tipos de tejido, particularmente tejido conjuntivo, como por ejemplo sinovia, y/o tejido óseo, como por ejemplo tejido óseo subcondral, y/o, además de células de cartílago, otros tipos celulares, como por ejemplo fibroblastos, células endoteliales y/u osteoblastos.
- 20 [0024] En otra forma de realización, la muestra de tejido es una biopsia articular, particularmente biopsia articular de rodilla, o un fragmento de la misma.
- [0025] En otra forma de realización, la muestra de tejido se limpia mecánicamente antes de realizar el paso a), particularmente con ayuda de un bisturí.
- 25 [0026] En otra forma de realización, antes de realizar el paso a), se elimina de la muestra de tejido el tejido conjuntivo (como, por ejemplo, sinovia), tejido cartilaginoso superficial, tejido cartilaginoso mineralizado y/o tejido óseo, particularmente tejido óseo subcondral. Una tal limpieza puede ser ventajosa cuando la muestra de tejido se proporciona partiendo de una denominada biopsia por punción de cartílago-hueso, particularmente como se describe en el párrafo siguiente.
- 30 [0027] En otra forma de realización, la biopsia de tejido es un fragmento de tejido, particularmente un fragmento de tejido cartilaginoso, de una biopsia por punción de cartílago-hueso. Por lo general, la biopsia por punción es cilíndrica y preferiblemente tomada de una articulación de rodilla humana o animal. Una tal biopsia por punción posee una estructura anatómica típica, que se compone de una capa de cartílago superficial, una capa de cartílago mineralizada subyacente, una capa de cartílago subyacente a la capa de cartílago intermedia, así como una capa de hueso subcondral subyacente a la capa de cartílago mineralizada (véase también la figura 1). Preferiblemente, el fragmento de tejido proviene de la capa de cartílago intermedia de la biopsia por punción de cartílago-hueso.
- 35 [0028] En otra forma de realización, la muestra de tejido se trata con la proteasa durante un período de 12 h a 24 h, particularmente de 14 h a 24 h, preferiblemente de 19 h a 24 h.
- [0029] En otra forma de realización, la proteasa es colagenasa, preferiblemente colagenasa bacteriana. Una proteasa adecuada está disponible comercialmente, por ejemplo, bajo el nombre Liberase (Roche).
- 40 [0030] En una forma de realización ventajosa se obtiene una solución (denominada solución de digestión) al realizar el paso a). Esto tiene la ventaja de que es posible una distribución homogénea de los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa, por lo cual una alícuota de una tal solución representa una sección transversal representativa de la muestra de tejido examinada. De este modo, a diferencia de las investigaciones inmunohistológicas, es posible una detección exhaustiva de la pureza y la identidad.
- 45 [0031] Los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa son, en otra forma de realización, fragmentos de colágeno entrecruzados. En otras palabras, los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa pueden presentar entrecruzamientos. Opcionalmente, los entrecruzamientos pueden estar libres de enlaces peptídicos.

- 5 [0032] Los entrecruzamientos pueden ser particularmente seleccionados del grupo que comprende entrecruzamientos de alisina, entrecruzamientos de hidroxialisina, entrecruzamientos de deshidro-hidroxilisina-norleucina, entrecruzamientos de deshidro-lisina-norleucina, entrecruzamientos de hidroxil-lisina-5-cetonorleucina, entrecruzamientos de dihidroxi-lisina-norleucina, entrecruzamientos de histidina-hidroxilisina-norleucina, entrecruzamientos de hidroxilisilpiridinolina, entrecruzamientos de lisilpiridinolina, entrecruzamientos de piridinio, entrecruzamientos de 3-hidroxipiridinio, entrecruzamientos de histidinohidroximerodesmosina y combinaciones de los mismos.
- 10 [0033] En una forma de realización preferida, los entrecruzamientos se seleccionan del grupo que comprende entrecruzamientos de hidroxilisilpiridinolina, entrecruzamientos de lisilpiridinolina, entrecruzamientos de piridinio, entrecruzamientos de 3-hidroxipiridinio y combinaciones de los mismos.
- [0034] Los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa presentan, en otra forma de realización, de 2 a 15 residuos aminoácidos, particularmente de 3 a 10 residuos aminoácidos, preferiblemente de 4 a 8 residuos aminoácidos.
- 15 [0035] Preferiblemente, los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno N-terminales y/o C-terminales.
- [0036] Para facilitar una discriminación inmunológica (baja reactividad cruzada) y con ello una detección sin problemas de los fragmentos de colágeno resistentes a la proteasa, los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno C-terminales y los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno N-terminales o a la inversa.
- 20 [0037] En una forma de realización particularmente preferida, los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son telopéptidos C-terminales y preferiblemente entrecruzados, es decir, telopéptidos de colágeno tipo II denominados C-terminales y preferiblemente entrecruzados (CTX-II), o fragmentos de los mismos, es decir, fragmentos de telopéptidos de colágeno tipo II C-terminales y preferiblemente entrecruzados (fragmentos CTX-II). Los telopéptidos/ fragmentos de telopéptidos C-terminales pueden presentar particularmente la secuencia de aminoácidos EKGDPDP o una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º: 1 según la lista de secuencias adjunta. Respecto a los posibles entrecruzamientos, se hace referencia a las formas de realización precedentes.
- 25 [0038] En otra forma de realización preferida, los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son telopéptidos N-terminales y preferiblemente entrecruzados, es decir, telopéptidos de colágeno tipo I denominados N-terminales y preferiblemente entrecruzados (NTX-I) o fragmentos de los mismos, es decir, fragmentos de telopéptidos de colágeno tipo I N-terminales y preferiblemente entrecruzados (fragmentos NTX-I). Los telopéptidos/fragmentos de telopéptidos N-terminales pueden presentar particularmente la secuencia de aminoácidos TGVEGPKGDT (UniProtKB/Swiss-Prot: P02452.5) o una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º: 2 según lista de secuencias adjunta. Respecto a los posibles entrecruzamientos, se hace referencia igualmente a las formas de realización precedentes.
- 30 [0039] La composición y estructura de los telopéptidos o fragmentos de telopéptidos C-terminales y N-terminales mencionados en los dos párrafos precedentes son conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplo, se señalan las siguientes referencias: von Poole AR. "Immunochemical markers of joint inflammation, skeleton damage and repair: where are we now?" (Ann Rheum Dis. 1994 Jan; 53(1): 3-5), Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E. "Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage" (Ann Rheum Dis. 2001 Jun; 60(6): 619-26), Herrmann M, Seibel MJ. "The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I" (a comparative review. Clin Chim Acta. 2008 Jul 17; 292(2): 57-75; Christgaue et al. Bone 2001; Garnero et al. "Association of Baseline Levels of Marker of Bone and Cartilage Degradation are associated with Longterm Progression of Joint Damage in Patients with Early Rheumatoid Arthritis: The Cobra Study" (Arthritis Rheum. 2002a 46(11): 2847-56); Garnero et al. "Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis" (Arthritis Rheum. 2002b 46(10): 2613-24); Christgau et al. "Collagen type II C-telopeptide fragments as an Index of cartilage degradation". Bone 2001; 29: 209-215) doi: 10.1016/j.cca.2008.03.020 Epub 2008 Mar 27 y Review. Erratum in: Clin Chim Acta. 2008 Nov; 397(1-2): 103. El contenido de las referencias
- 35 40 45 50 anteriormente enumeradas con relación a los telopéptidos o fragmentos de telopéptidos C-terminales y N-terminales descritos en las mismas se incorpora por referencia explícita al contenido de la presente descripción.
- [0040] En una forma de realización preferida, el paso b) del procedimiento según la invención comprende una detección cuantitativa de los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa, es decir, una determinación de la cantidad contenida en la muestra de tejido de estos fragmentos de colágeno.

[0041] Preferiblemente, el grado de pureza de la muestra de tejido en relación con el tejido cartilaginoso contenido en el mismo se determina a través de las proporciones porcentuales de fragmentos de colágeno tipo II y/o tipo I resistentes a la proteasa.

5 [0042] En otra forma de realización, para la realización del paso b), la muestra de tejido tratada con proteasa se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se dirige específicamente contra fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa. De este modo, es posible una detección, particularmente una detección cuantitativa, de fragmentos de colágeno de este tipo en la muestra de tejido, que está preferiblemente licuada.

10 [0043] En otra forma de realización, para la realización del paso b), la muestra de tejido tratada con proteasa se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se dirige específicamente contra fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa. De este modo, es posible una detección, particularmente una detección cuantitativa, de fragmentos de colágeno de este tipo en la muestra de tejido, que está preferiblemente licuada.

15 [0044] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos utilizados pueden ser policlonales o monoclonales. La producción de anticuerpos de este tipo ocurre según procedimientos estándar, que son conocidos por el experto en la materia y que son descritos particularmente por Harlow y Lane 1988 y Köhler y Milstein 1975 en "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" (Nature 1975, 256 (5517): 495-7), así como por Campbell, A. M. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Band 13 (1986).

20 [0045] En una forma de realización adicional, la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa se detecta mediante una técnica inmunológica, en particular se detecta cuantitativamente. La técnica inmunológica preferiblemente se selecciona del grupo que comprende la técnica ELISA, técnicas inmunoenzimáticas, técnicas de inmunofluorescencia, técnicas radioinmunológicas, técnicas inmunoquímicas y técnicas proteómicas. A este respecto, se trata de técnicas médicas suficientemente establecidas y validadas, particularmente también certificadas por la CE.

25 [0046] Se prefiere la utilización de un ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Engvall, E. Meth Enzymol., 70, (1981)) según la invención. El ELISA tiene, por un lado, la ventaja de que es un método sencillo desde el punto de vista técnico de un laboratorio. Por otra parte, es una ventaja que mediante un ELISA el límite de detección alcanzable se encuentra claramente por debajo de la sensibilidad requerida para la realización del procedimiento según la invención. Así, por ejemplo, se pueden procesar mediante el procedimiento según la
30 invención 100 mg de tejido, lo que corresponde a una cantidad de muestra típica, en 14 ml de una solución de digestión. Puesto que el cartílago contiene aproximadamente el 25 % del peso húmedo en colágeno, esto significa aprox. 25 mg de productos de degradación del colágeno. De estos, los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa, particularmente los telopéptidos CTX-II o NTX-I previamente mencionados o sus fragmentos, constituyen aproximadamente del 0,1 al 1 % de esta cantidad, por lo tanto,
35 aprox. de 25 a 250 mg. Por lo tanto, diluidos en 14 ml, son aproximadamente de 2 a 20 µg/ml. Sin embargo, los límites de detección de un ELISA están típicamente en el rango de nanogramos/mililitro inferior a intermedio. Así surge una precisión de detección que es de 100 a 1000 veces superior al límite técnico necesario.

[0047] Según un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un cultivo de células de cartílago. El método comprende los pasos siguientes:

- 40 a) tratar una muestra de tejido cartilaginoso con una proteasa,
- b) examinar la muestra de tejido cartilaginoso tratada con proteasa para la presencia de fragmentos resistentes a la proteasa de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I y
- c) cultivar células de cartílago contenidas en la muestra de tejido cartilaginoso examinada.

[0048] En una forma de realización preferida, la muestra de tejido cartilaginoso es una biopsia de cartílago.

45 [0049] Particularmente la muestra de tejido cartilaginoso puede provenir de una biopsia articular, preferiblemente una biopsia articular de rodilla.

[0050] En otra forma de realización, se limpia mecánicamente la muestra de tejido cartilaginoso antes de realizar el paso a), particularmente con ayuda de un bisturí.

- [0051] En otra forma de realización, antes de realizar el paso a), se elimina de la muestra de tejido cartilaginoso el tejido conjuntivo (como, por ejemplo, sinovia), tejido cartilaginoso superficial, tejido cartilaginoso mineralizado y/o tejido óseo, particularmente tejido óseo subcondral. Una tal limpieza puede ser ventajosa particularmente cuando la muestra de tejido cartilaginoso proviene de una biopsia por punción de cartílago-hueso.
- 5 [0052] En otra forma de realización, la muestra de tejido cartilaginoso se trata con la proteasa durante un período de 12 h a 24 h, particularmente de 14 h a 24 h, preferiblemente de 19 h a 24 h.
- [0053] En una forma de realización preferida, el paso b) comprende una detección cuantitativa de los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa, es decir, una determinación de la cantidad contenida en la muestra de tejido cartilaginoso de estos fragmentos de colágeno.
- 10 [0054] Preferiblemente, el grado de pureza del tejido cartilaginoso se determina a través de las proporciones porcentuales de fragmentos de colágeno tipo II y/o tipo I resistentes a la proteasa.
- [0055] En otra forma de realización, para la realización del paso b), la muestra de tejido cartilaginoso tratada con proteasa se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se dirige específicamente contra fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa. Por ello es posible una detección, particularmente una detección cuantitativa, de fragmentos de colágeno de este tipo en la muestra de tejido cartilaginoso.
- 15 [0056] En otra forma de realización, para la realización del paso b), la muestra de tejido cartilaginoso tratada con proteasa se pone en contacto con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se dirige específicamente contra fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa. Por ello es posible una detección, particularmente una detección cuantitativa, de fragmentos de colágeno de este tipo en la muestra de tejido cartilaginoso.
- 20 [0057] Un cultivo inicial de las células de cartílago se realiza preferiblemente en un denominado cultivo en suspensión. Un cultivo en suspensión es un cultivo celular con células no adherentes. Las células permanecen en suspensión, puesto que no necesitan contacto directo con un sustrato.
- 25 [0058] Preferiblemente, las células de cartílago se cultivan durante un período de 1 a 3 días, particularmente de 2 días.
- [0059] Un tratamiento de la muestra de tejido cartilaginoso con proteasa en combinación con un cultivo en suspensión preferiblemente de varios días, particularmente de dos días, es especialmente ventajoso, ya que se ha demostrado que ni las células del hueso ni las células endoteliales sobreviven una fase de establecimiento del cultivo celular de ese tipo.
- 30 [0060] En otra forma de realización, se utiliza, para la realización del paso c), un llamado medio de expansión. Bajo un medio de expansión se entiende un medio de cultivo celular, que se utiliza para la proliferación celular. La utilización de un tal medio de expansión tiene la ventaja de que la velocidad de proliferación de fibroblastos y osteoblastos purificados no es más alta que la de las células de cartílago y de que también las células endoteliales purificadas mueren en un tal medio de proliferación.
- 35 [0061] Con respecto a otras características y ventajas del procedimiento, particularmente de los fragmentos de colágeno tipo II y/o I resistentes a la proteasa, de los anticuerpos, así como de las técnicas inmunológicas apropiadas para la realización del paso b), se hace referencia completamente a las formas de realización hechas en el marco del primer aspecto de la invención.
- 40 [0062] Según un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un implante cargado de células de cartílago, especialmente para la utilización en el trasplante de condrocitos asistido por matriz (MACT), incluyendo los pasos siguientes:
- a) tratar una muestra de tejido cartilaginoso con una proteasa,
- b) examinar la muestra de tejido cartilaginoso tratada con proteasa para la presencia de fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa,
- 45 c) cultivar células de cartílago contenidas en la muestra de tejido cartilaginoso examinada y

d) cargar un implante con las células de cartílago cultivadas.

[0063] Implantes adecuados para cargar con células de cartílago son particularmente los implantes que contienen colágeno.

5 [0064] Preferiblemente, para la realización del paso d), se utiliza un implante estratificado construido a partir de un componente membranoso, así como un componente esponjoso, donde el componente esponjoso posee preferiblemente poros columnares, que se orientan particularmente en perpendicular o esencialmente en perpendicular al componente membranoso. Poros de este tipo se pueden formar preferiblemente mediante liofilización unilateral. Preferiblemente, el componente membranoso es una membrana pericárdica y el
10 componente esponjoso es una esponja de colágeno. Un implante correspondiente es distribuido comercialmente por el solicitante, por ejemplo, bajo el nombre Novocart® Basic o Novocart® 3D. Con respecto a otras características y ventajas de un tal implante, se hace referencia además a EP 1 824 420 B1, cuya divulgación con respecto al implante descrito en la misma para la reparación de un defecto del cartílago se incorpora en la presente por referencia explícita en el contenido de la presente descripción.

15 [0065] Con respecto a otras características y ventajas del procedimiento, se hace referencia completamente a las formas de realización hechas en el marco de los aspectos de la invención precedentes.

[0066] Según un cuarto aspecto, la invención se refiere a la utilización de fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa para la detección *in vitro* de tejido cartilaginoso y/o a la determinación *in vitro* de la pureza de tejido cartilaginoso.

20 [0067] Con respecto a otras características y ventajas de la utilización, particularmente de los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa, también se hace referencia completamente a las formas de realización hechas en el marco de los aspectos de la invención precedentes.

[0068] Según un quinto aspecto, se divulga un kit, preferiblemente un kit inmunológico, para la realización de un procedimiento descrito en el marco de los aspectos de la invención precedentes.

25 [0069] El kit comprende al menos dos componentes, que son seleccionados del grupo que comprende anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados de enzima reportera-anticuerpo, conjugados de fragmentos de anticuerpos-enzima reportera, sustratos de enzimas, particularmente sustratos colorantes (cromógenos), placas de microtitulación, soluciones tampón, detergentes, estabilizadores de proteínas, conservantes y combinaciones de los mismos.

30 [0070] Las enzimas reporteras se pueden seleccionar del grupo que comprende peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa. Los sustratos colorantes se pueden seleccionar del grupo que comprende paranitrofenilfosfato y o-fenilendiamina.

[0071] Las soluciones tampón citadas arriba ya pueden contener aditivos habituales, como por ejemplo detergentes, estabilizadores de proteínas y/o conservantes.

35 [0072] Con respecto a otras características y ventajas se hace referencia completamente del mismo modo a las formas de realización hechas dentro del marco de los aspectos de la invención precedentes.

40 [0073] Otras características y ventajas de la invención resultan de las formas de realización descritas a continuación por medio de las figuras, descripción de las figuras de un ejemplo, así como de las reivindicaciones secundarias. A este respecto, las características individuales de la invención pueden realizarse solas o en combinación entre sí. Las formas de realización descritas sirven únicamente para la aclaración y para la mejor comprensión de la invención y no deben entenderse como limitantes de ningún modo.

Descripción breve de las figuras

[0074]

Fig. 1 muestra esquemáticamente la estructura anatómica de una punción de cartílago-hueso 10, que se toma de una articulación de rodilla de un paciente humano. La capa 12 es la denominada capa de cartílago superficial. La capa de cartílago intermedia 14 subyacente se proporciona para la provisión verdadera del tejido cartilaginoso, así como de las células de cartílago. Debajo se encuentra una capa de cartílago mineralizada 16 seguida de una capa de hueso subcondral 18 subyacente. Ya que el hueso y el

cartílago mineralizado generalmente no se pueden separar, se realiza una separación a lo largo de la línea discontinua, es decir, por la parte inferior de la capa de cartílago no mineralizada 14. La línea punteada muestra el transcurso del límite cartílago-hueso.

- Fig. 2 muestra esquemáticamente la curva estándar de un ELISA utilizado para la detección de CTX-II (Urine CartiLaps® ELISA). Sobre la ordenada se representa la densidad óptica (extinción) en un rango de longitud de onda de 450 nm a 630 nm. Sobre la abscisa se representa la concentración en mg/ml.
- Fig. 3 muestra esquemáticamente una curva estándar de un ELISA utilizado para la detección de NTX-I (OSTEOMARK® NTX-Serum ELISA). Sobre la ordenada se representa la densidad óptica (extinción) en un rango de longitud de onda de 450 nm a 630 nm. Sobre la abscisa se representa la concentración en nm de BCE (Bone Collagen Equivalents, equivalentes de colágeno óseo).
- Fig. 4 muestra esquemáticamente una representación logarítmica de la curva estándar normal en tampón, así como la curva estándar en presencia de solución de digestión para NTX-I (1:50 digestión de cartílago). Sobre la ordenada se indica la concentración medida en nM de BCE/mm. Sobre la abscisa se indica la concentración esperada en nM de BCE/mm. La representación logarítmica se eligió, para poder representar las concentraciones pequeñas adecuadamente.
- Fig. 5 muestra esquemáticamente la representación de la curva estándar normal en tampón, así como la curva estándar en presencia de solución de digestión para CTX-II (1:1000 digestión de sinovia). Sobre la ordenada se indica la concentración medida en ng/ml. Sobre la abscisa se indica la concentración esperada en ng/ml.
- Fig. 6 muestra esquemáticamente el resultado de la determinación de fragmentos de digestión sinovial en la digestión de cartílago. En este caso, "0 % digestión de cartílago" significa digestión de sinovia pura. Sobre la ordenada se indica la concentración de NTX-I en nM de BCE/mg de tejido. Sobre la abscisa se indica la proporción de digestión de cartílago en %.
- Fig. 7 muestra gráficamente el resultado de un experimento de contaminación, donde el tejido cartilaginoso se mezcló con tejido sinovial. Los pesos efectivos son: 100 % sinovia - 115,7 mg de cartílago, 66,6 % sinovia - 67,9 mg + 31,2 mg de cartílago, 50 % sinovia - 52,2 mg + 53,6 mg de cartílago y 33,3 % sinovia - 30,4 mg + 66,8 mg de cartílago. Sobre la ordenada se representa la concentración de NTX-I en nM de BCE/mg de tejido. Sobre la abscisa se representa el tejido cartilaginoso en %.
- Fig. 8 muestra un histograma para la distribución del peso de las muestras medidas de cartílago, sinovia y hueso.
- Fig. 9 muestra gráficamente las concentraciones de CTX-II en mezclas diversas de una digestión de sinovia y de cartílago. Sobre la ordenada se indica la concentración de CTX-II en [µg/ml]. Sobre la abscisa se indica la proporción de digestión de cartílago en [%].

Descripción de los experimentos

[0075]

1. Como materiales de partida para la digestión se usaron secciones de hueso separadas, así como secciones de cartílago limpiadas de punciones de cartílago-hueso de pacientes humanos. Además, se utilizó tejido sinovial puro, también de pacientes humanos. Todos los tejidos se procesaron del mismo modo y se usaron conforme al peso húmedo de las muestras de cartílago.
2. Ensayo de recuperación A
- Esta recuperación se realizó con ayuda de los estándares. En este caso se utilizaron los estándares diluidos 1:1 en la solución de digestión del tejido extraño (solución de digestión "heteróloga"): CTX-II en digestión de sinovia, NTX-I en digestión de cartílago. Debe indicarse que la presencia de digestión de tejido extraño no causa la extinción de los ensayos. La Fig. 2 demuestra que no se originó ninguna extinción o valores falsos positivos en este ensayo.
3. Ensayo de recuperación B
- En esta variante se examinó, cómo de bien se puede encontrar una cantidad definida del estándar en una solución de digestión homóloga. En este caso se diluyó la solución de digestión de modo que se pudiera medir su contenido original de CTX-II o NTX-I y como muestra paralela se midió una muestra estándar salpicada, es decir, mezclada, con 40 nm de BCE o 2,17 ng/ml de CTX-II, respectivamente. La tasa de recuperación se calculó entonces en tanto por ciento. A continuación, las estadísticas: la tasa de recuperación determinada así para CTX-II fue $90,1 \pm 1,4$, la de NTX-I fue $100,9 \pm 15,2\%$, véase la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: estadística de los datos de corte (datos pico)

Datos de corte	Tamaño	Media	Desviación típica	Desviación típica	I.C. de la media	I.C. de la media
Obtención de NTX-I mezclado (%)	12	100,87887	15,20866	4,39036	9,66312	
Datos de corte	Rango	Máx.	Mín.	Mín.	25%	75 %
Obtención de NTX-I mezclado (%)	56,38811	128,19811	71,81000	102,24872	89,47781	112,01241
Datos de corte	Tamaño	Media	Desviación típica	Desviación típica	I.C. de la media	I.C. de la media
Obtención de CTX-I mezclado (%)	16	8	90,09325	3,96857	1,40310	3,31781
Datos de corte	Rango	Máx.	Mín.	Mediana	25 %	75 %
Obtención de CTX-I mezclado (%)	12,22876	95,82523	83,59647	89,49629	87,80191	94,04336

4. Caracterización de la solución de digestión

Se determinó la precisión de detección de fragmentos sinoviales en la digestión de cartílago. Los ensayos de recuperación representados arriba se realizaron con los estándares suministrados en los kits de ensayo. La ventaja es una precisión alta, la desventaja, que la digestión con colagenasa durante la producción no genera necesariamente exactamente las mismas estructuras antigénicas. Por lo tanto, como otro paso de validación, se mezcló digestión de cartílago con proporciones crecientes de digestión de sinovia y se determinó, respectivamente, la proporción medible de NTX-I. El resultado se representa en la Fig. 6. En este caso, la recta de regresión corta la abscisa a aprox. 0,6 % del valor máximo de la digestión de sinovia pura. El coeficiente de regresión es 0,977 ($r^2=0,9538$). De esto se calcula un error de determinación de menos del 3%, que en el caso actual es evidentemente del 0,6 %.

En la próxima etapa no se mezclaron las digestiones, sino que se digirieron juntos tejido fresco de cartílago y de sinovia (véase la Fig. 7). Sin embargo, este procedimiento sufrió algunos problemas metrológicos. Así, el trozo de tejido tuvo que liberarse del peso húmedo del tampón excedente para la determinación. Además, la balanza tenía que ser estéril, para impedir una contaminación de la solución de digestión. Como consecuencia de estas medidas, la precisión de pesada fue claramente limitada y el análisis cualitativo resultante de ello, perjudicado. No obstante, con este método se podría generar una estimación aproximada, para determinar el límite de detección de una contaminación sinovial.

En las estadísticas siguientes se presentan los resultados de medición de una serie de productos de digestión de tejido. En este caso, cada célula es una medición múltiple de cada tejido de donante, donde se realizaron las mediciones múltiples de personas diferentes en dos balanzas diferentes. Los resultados de medición de CTX-II en sinovia y hueso, así como los resultados de medición de NTX-I en cartílago, no se representan, puesto que se mantuvieron siempre bajo el límite de detección del ELISA respectivo. Se midieron las cantidades de tejido absolutas de, en total, 76 muestras en el rango de aprox. de 20 mg a 320 mg (véase la Fig. 8), donde la digestión se realizó, respectivamente, en 14 ml (correspondiente a SAA). Los datos se representan en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: estadística de la determinación de entrecruzamientos en las digestiones de tejido Unidades: CTX-II: ng/ml, NTX-I: nM de equivalentes de colágeno óseo

Datos de corte	Tamaño	Valores faltantes		Media	Desviación típica	Desviación típica	I.C. de la media
		Máx.	Mín.				
Cartílago: CTX-II/mg	5	0	379,59929	66,50570	29,74225	82,57773	
Cartílago: CTX-II/mg	6	0	369,42578	140,50912	57,36261	147,45527	
Sinovia: NTX-I/mg	5	0	89,71775	40,76337	18,22993	50,61441	
Sinovia: NTX-I/mg	5	0	63,03821	9,99895	4,47167	12,41534	
Hueso: NTX-I/mg	2	0	20,49824	1,89793	1,34204	17,05225	
Hueso: NTX-I/mg	2	0	26,36596	2,46503	1,74304	22,14740	
Datos de corte	Rango	Máx.	Mín.	Mediana	25%	75%	
Cartílago: CTX-II/mg	185,63479	479,74332	294,10853	372,53333	329,08527	433,64628	
Cartílago: CTX-II/mg	396,62359	557,43614	160,81256	395,79715	237,48199	472,11394	
Sinovia: NTX-I/mg	93,13859	140,55245	47,41386	102,03846	47,92717	125,34797	
Sinovia: NTX-I/mg	26,12503	80,02303	53,89800	61,08371	56,07894	70,97473	
Hueso: NTX-I/mg	2,68408	21,84028	19,15620	20,49824	19,15620	21,84028	
Hueso: NTX-I/mg	3,48608	28,10900	24,62292	26,36596	24,62292	28,10900	

En total, todo ello dio como resultado, para el colágeno tipo II, un límite de detección para una muestra utilizada sin diluir, para lo que hacen falta al menos 25 µg de tejido cartilaginoso y, para el colágeno tipo I, 200 µg de tejido sinovial o 1 mg de tejido óseo. Ya que se disponen de aproximadamente 100 mg de peso húmedo como cantidad de partida media de material procesado, esto significa que siempre se podía determinar la identidad del tejido cartilaginoso. El consiguiente límite evaluable de la trazabilidad de contaminación con tejido extraño es, para tejido sinovial, del 0,2 % y, para huesos, aprox. del 1 %. Con pesos primarios mayores sube la precisión correspondientemente, puesto que aumenta la concentración medible en la solución de digestión hasta 3 veces (a causa de pesos de hasta 300 mg). La precisión de detección desciende a la inversa correspondientemente, cuando solo hay cantidades de tejido pequeñas para el procesado en los 14 ml de solución de digestión. A modo de ilustración: con respecto al cartílago en la Fig. 1, esto significa: este cartílago tenía en realidad aprox. 4 mm de alto, tenía por lo tanto, en 4 mm de sección transversal (el espesor del trépano) y 4 mm de altura (escala reconocible), un volumen de 48 mm³, por lo tanto, 48 mg. Con este peso, el límite de detección para la sinovia sería de 400 µg, lo que sería aproximadamente el 0,8 %. Esto sería, convertido en altura, menos de 40 µm de altura, por lo tanto, una fracción de la altura de la capa superficial. Una altura de 40 µm corresponde a aproximadamente la altura de la capa superior de células. En relación con el hueso, esto sería una capa de hueso de aproximadamente 200 µm de altura.

5. Determinación de las concentraciones de CTX-II en mezclas diversas de una digestión de sinovia y de cartílago

[0076] Una digestión de cartílago (muestra de producción) se mezcló con volúmenes crecientes de una digestión de sinovia. Las muestras tuvieron, según los experimentos preliminares, que medirse diluidos de forma diferente, de tal modo que estuvieran en el rango de los estándares (diluciones de 1:100 a 1:3000). Las diluciones de las muestras tuvieron además que hacerse en PBS, puesto que se suministraron solo 3 mm de estándar 07 (medio de disolución) por el fabricante. Para mejorar la precisión de la medición, las muestras se midieron mediante doble determinación. Además, se prediluyeron los productos de digestión de tejido puros, para no tener que pipetear ningún volumen inferior a 20 µl.

[0077] La determinación de las concentraciones de CTX-II se realizó mediante el kit de ELISA Urine CartiLaps® EIA (immunodiagnostic systems), así como del protocolo del fabricante correspondiente.

[0078] En general, se realizaron los pasos de incubación a 20°C en una pieza sobrepuesta incluida en un termomezclador para la termorregulación de placas de microtitulación (Eppendorf).

[0079] En primer lugar, se llevaron los componentes del kit a temperatura ambiente. Las muestras de digestión se descongelaron y se mezclaron con 5 mm de EDTA (diluido 1:100 con 0,5 M de EDTA) y se agitaron. Luego, las muestras se dejaron sedimentar 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se prepararon las diluciones de las muestras, así como una mezcla de solución patrón de estándar y tampón de ensayo. En los micropocillos de una placa de ELISA prerrecubierta con estreptavidina (12x8 micropocillos) se añadieron luego 100 µl de una solución tamponada con PBS que contiene un péptido sintético biotinilado (antígeno de CartiLaps) mediante una pipeta de precisión multicanal. La placa de ELISA se cubrió a continuación con cinta adhesiva y se incubó durante 30 minutos a 20 °C (estadísticamente).

[0080] Se preparó un tampón de lavado (10 ml de tampón de lavado concentrado (50x) + 490 ml de agua destilada). La placa de ELISA se lavó 5 veces con 250 µl de tampón de lavado. Luego se pipetearon 40 µl de estándares, controles y muestras en los micropocillos de la placa de ELISA. A continuación, se añadieron 100 µl de una solución tamponada con TRIS, que contiene un anticuerpo monoclonal listo para usar (anticuerpo primario), en cada micropocillo de la placa de ELISA mediante una pipeta de precisión multicanal. Entonces se cubrió la placa de ELISA de nuevo con cinta adhesiva y se incubó durante 21 ± 3 horas a 4 hasta 8 °C (estadísticamente). A continuación, la placa de ELISA se lavó de nuevo 5 veces con 250 µl de tampón de lavado. A continuación, a esto se añadió en cada micropocillo de la placa de ELISA 100 µl de una solución que contiene un anticuerpo conjugado con peroxidasa mediante una pipeta de precisión multicanal.

[0081] Luego se cubrió de nuevo la placa de ELISA con cinta adhesiva y se incubó durante 60 minutos a 20 °C (estadísticamente). A continuación, se lavó la placa de ELISA nuevamente 5 veces con 250 µl de tampón de lavado. Entonces se añadieron en cada micropocillo de la placa de ELISA 100 µL de una solución cromogénica (tetrametilbencidina (TMB) como sustrato) mediante una pipeta de precisión multicanal. A continuación, la placa de ELISA se cubrió de nuevo con cinta adhesiva y se incubó durante 15 minutos a 20 °C a oscuras (estadísticamente). Finalmente, en cada micropocillo de la placa de ELISA se añadieron 100 µl de una solución de parada (ácido sulfúrico 0,18 mol/l listo para usar) mediante una pipeta de precisión multicanal.

ES 2 703 706 T3

[0082] La medición de la absorción se realizó en un rango de 450 nm a 630 nm (lector de placas: ELX 808 de BioTek (R 530)) en el plazo de 2 horas.

[0083] El ajuste 4P de la serie estándar de CTX-II se evaluó mediante el software Gen5 1.01 de BioTek. Se calcularon las concentraciones de CTX-II de los controles, así como de las muestras.

5 [0084] Se pudieron lograr los resultados siguientes:
Estándar: bueno

[0085] La Abs. absoluta-altura es comparable con las indicaciones del protocolo del fabricante para Urine CartiLaps® EIA. El R^2 del ajuste es bueno con 0,999. Los estándares mostraron una regeneración (recuperación) de entre el 91 y el 104%. Los CV estaban entre el 1 y el 6%. Un estándar tuvo un CV (variación) del 14%.
10 Controles: buenos

[0086] Ambas muestras de control estaban en el rango del fabricante y mostraron CV buenos.
Muestras de digestión del experimento de contaminación: buenos

[0087] La decreciente proporción de volumen de la digestión de cartílago y la simultáneamente creciente proporción de volumen de la digestión de sinovia se pudieron representar claramente (véase la Fig. 9). Las gradaciones se extrajeron aún claramente a través de las medidas tomadas.
15

6. Determinación de las concentraciones de NTX-I en mezclas diversas de una digestión de cartílago y de sinovia

[0088] Una digestión de sinovia se mezcló con volúmenes ascendentes de una digestión de cartílago (muestra de producción). Las muestras tuvieron, según los experimentos preliminares, que medirse diluidos de forma diferente, de tal modo que estuvieran en el rango de los estándares (diluciones de 1:100 a 1:3000). Es obligatoria una dilución final de 1:5 del estándar y las muestras. Las muestras se midieron como un valor único.
20

[0089] Las muestras de un estudio BS (sueros) se midieron en doble determinación sin diluir. Es obligatoria una dilución final de 1:5 del estándar y las muestras.

[0090] La determinación de las concentraciones de NTX-I se realizó mediante el kit OSTEOMARK® NTx Serum (Wampole Laboratories, USA; Cat.#. 9021, Lote n.º 13050074), así como del protocolo del fabricante correspondiente.
25

[0091] En primer lugar, los componentes del kit se llevaron a temperatura ambiente. Las muestras de digestión ($V = 500 \mu\text{l}$) se mezclaron con $5 \mu\text{l}$ de 0,5 M de EDTA (5 mM EDTA). Las muestras de contaminación de digestión se prepararon y se diluyeron.

[0092] A continuación, se prepararon muestras diluidas mediante un medio de dilución de la muestra (2,5/1,25 nM de BCE). Luego se diluyeron 1:5 obligatoriamente los estándares, los controles y las muestras. A continuación, se diluyó un anticuerpo de ratón monoclonal purificado (contra NTx), que se conjugó con peroxidasa de rábano, con ayuda de un diluyente de anticuerpo conjugado ($12 \mu\text{l}$ de concentrado de conjugado (100x; CONJ) + 12 ml de medio de dilución del conjugado (CONJ DIL)). Luego se pipetearon $100 \mu\text{l}$ de estándares diluidos, controles, muestras y muestras diluidas en los micropocillos una placa de ELISA (12x8 micropocillos). La placa de ELISA se recubrió con antígeno NTx sintético adsorbido.
30
35

[0093] Luego se añadieron $100 \mu\text{l}$ de la solución de anticuerpo conjugado diluida (1x) en los micropocillos de la placa de ELISA mediante una pipeta de precisión multicanal. A continuación, la placa de ELISA se protegió con cinta adhesiva y se mezcló durante 20 s. a 500 rpm. La placa de ELISA se incubó luego a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 minutos (estadísticamente). Luego se preparó un tampón de lavado (15 ml de tampón de lavado concentrado (30x) + 435 ml de agua destilada, mezclado 5 minutos).
40

[0094] A continuación, el reactivo cromógeno (tetrametilbencidina) se diluyó ($200 \mu\text{l}$ de concentrado de cromógeno (100x) + 20 ml de sustrato tamponado (peróxido de hidrógeno)). La placa de ELISA se lavó 5 veces con $300 \mu\text{l}$ de tampón de lavado. A continuación, se añadieron $200 \mu\text{l}$ de la solución de cromógeno (1 vez) en los micropocillos de la placa de ELISA mediante una pipeta de precisión multicanal. Entonces, la placa de ELISA se protegió de nuevo con cinta adhesiva y se incubó a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos (estadísticamente). Luego se pipetearon en cada micropocillo de la placa de ELISA $100 \mu\text{l}$ de una solución de parada (ácido sulfúrico 1N), antes de que se incubara la placa de nuevo a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min.
45

ES 2 703 706 T3

[0095] A continuación, se determinaron los valores de extinción mediante un lector de microplacas (ELX 808 de BioTek (R 530)) en un rango de 450 nm a 630 nm.

[0096] Se determinó el ajuste 4P de la serie estándar NTX-I mediante el software Gen5 1.01 de BioTek. Se calcularon las concentraciones de NTX-I de las muestras.

5 [0097] A este respecto, se obtuvieron los resultados siguientes:

Criterios generales: buenos

Extinción intermedia del estándar 0 (0 BCE): debería ser: > 1,3; es: aprox. 2,3

Rango de extinción de los estándares (0 y 40 nM de BCE): debería ser: > 0,9; es: aprox. 1,5

Estándar: bueno

10 El ajuste es bueno ($R^2 = 0,999$), CV < 5%, regeneraciones (recuperaciones) 98 - 102% LLOQ:

[0098] El estándar no se pudo extender hacia abajo.

Controles: en orden

[0099] Ambas muestras de control estaban apenas por debajo del rango del fabricante (4 o 7%), sin embargo, claramente aún en el rango de confianza

15 Muestras de digestión: buenas

[0100] La decreciente proporción de volumen de la digestión de sinovia y la simultáneamente creciente proporción de volumen de la digestión de cartílago (muestra de producción) se pudieron representar claramente (véase la Fig. 6).

Muestras de suero: buenas

20 [0101] En 5 de 5 muestras medidas sin diluir, se pudo medir NTX-I de manera estable.

[0102] Los CV estaban entre el 1 y el 9%. La concentración de NTX-I fue de 14,4 nM de BCE ($\pm 2,7$) (rango: 10,9 hasta 19,3)

LISTADO DE SECUENCIAS

[0103]

25 <110> TETEC Tissue Engineering Technologies AG

<120> Identidad y pureza de biopsias tisulares

<130> P54161WO

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

30 <210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

35 <223> CTX-II

<400> 1

Glu Lys Gly Pro Asp Pro
1 5

<210> 2

ES 2 703 706 T3

<211> 10
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
5 <223> NTX-I

<400> 2

Thr	Gly	Val	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Thr
1				5					10

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación *in vitro* de tejido cartilaginoso y/o determinación *in vitro* de la pureza de tejido cartilaginoso, que comprende los pasos siguientes:
- 5 a) tratar una muestra de tejido con una proteasa y
b) examinar la muestra de tejido tratada con proteasa para la presencia de fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I, resistentes a la proteasa **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno C-terminales y los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno N-terminales o a la inversa.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** la muestra de tejido es una biopsia articular, particularmente una biopsia articular de rodilla.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que**, antes de la realización del paso a), se elimina de la muestra de tejido el tejido cartilaginoso superficial, el tejido cartilaginoso mineralizado y/o el tejido óseo, particularmente el tejido óseo subcondral.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** la muestra de tejido es un fragmento de tejido, particularmente un fragmento de tejido cartilaginoso, de una biopsia por punción de cartílago-hueso.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** la proteasa es colagenasa, preferiblemente colagenasa bacteriana.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno entrecruzados.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa presentan entrecruzamientos, que se seleccionan del grupo que consiste en entrecruzamientos de alisina, entrecruzamientos de hidroxialisina, entrecruzamientos de deshidro-hidroxilisina-norleucina, entrecruzamientos de deshidro-lisina-norleucina, entrecruzamientos de hidroxil-lisina-5-cetonorleucina, entrecruzamientos de dihidroxil-lisina-norleucina, entrecruzamientos de histidina-hidroxilisina-norleucina, entrecruzamientos de hidroxilisilpiridinolina, entrecruzamientos de lisilpiridinolina, entrecruzamientos de piridinio, entrecruzamientos de 3-hidroxipiridinio, entrecruzamientos de histidinohidroximerodesmosina y combinaciones de los mismos.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son telopéptidos de colágeno tipo II C-terminales entrecruzados (CTX-II) o fragmentos de los mismos.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son telopéptidos de colágeno tipo I N-terminales entrecruzados (NTX-I) o fragmentos de los mismos.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** en la realización del paso b), la muestra de tejido tratada con proteasa se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se dirige específicamente contra fragmentos resistentes a la proteasa de colágeno tipo II.
- 40 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** en la realización del paso b), la muestra de tejido tratada con proteasa se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se dirige específicamente contra fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa.
- 45 12. Método según la reivindicación 10 u 11, **caracterizado por el hecho de que** la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a los fragmentos resistentes a la proteasa se detecta mediante una técnica inmunológica, preferiblemente mediante la técnica ELISA.

13. Método para la producción de un cultivo de células de cartílago, que comprende los pasos siguientes:

- 5
- a) tratar una muestra de tejido cartilaginoso con una proteasa,
 - b) examinar la muestra de tejido cartilaginoso tratada con proteasa para la presencia de fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa y
 - c) cultivar células de cartílago contenidas en la muestra de tejido cartilaginoso examinada, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno C-terminales y los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno N-terminales o a la inversa.

10 14. Método para la producción de un implante cargado de células de cartílago, especialmente para la utilización en el trasplante de condrocitos asistido por matriz (MACT), que comprende los pasos siguientes:

- 15
- a) tratar una muestra de tejido cartilaginoso con una proteasa,
 - b) examinar la muestra de tejido tratada con proteasa para la presencia de fragmentos de colágeno tipo II y/o de colágeno tipo I resistentes a la proteasa,
 - c) cultivar células de cartílago contenidas en la muestra de tejido de cartílago examinada y
 - d) cargar un implante con las células de cartílago cultivadas, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno C-terminales y los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno N-terminales o a la inversa.

20 15. Utilización de fragmentos de colágeno tipo II y/o colágeno tipo I resistentes a la proteasa para la detección *in vitro* de tejido cartilaginoso y/o a la determinación *in vitro* de la pureza de tejido cartilaginoso, **caracterizado por el hecho de que** los fragmentos de colágeno tipo II resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno C-terminales y los fragmentos de colágeno tipo I resistentes a la proteasa son fragmentos de colágeno N-terminales o a la inversa.

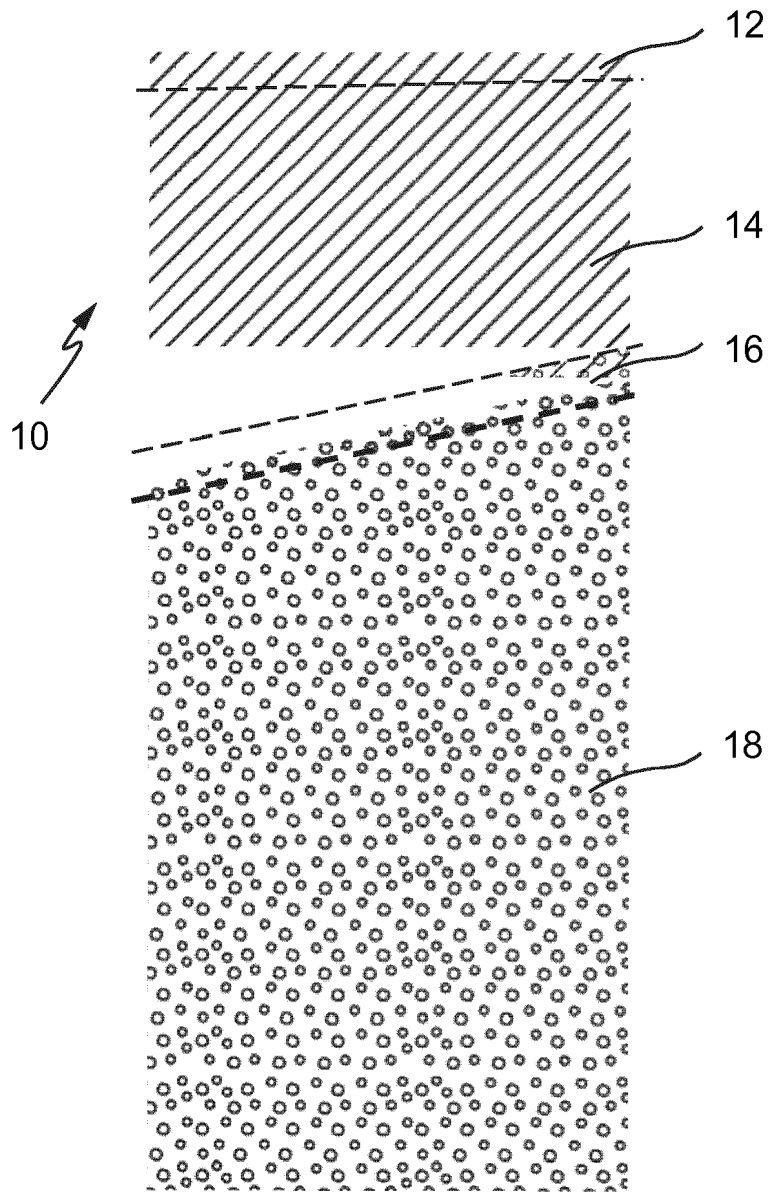


Fig. 1

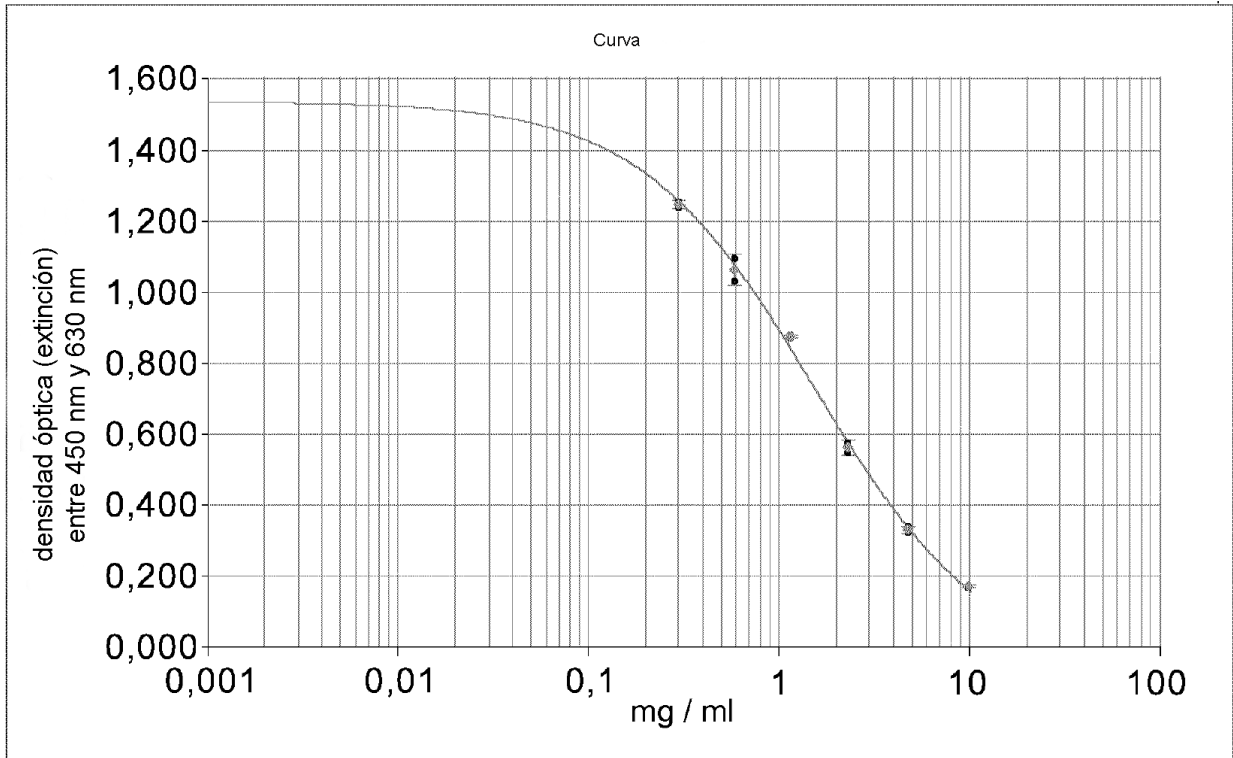


Fig. 2

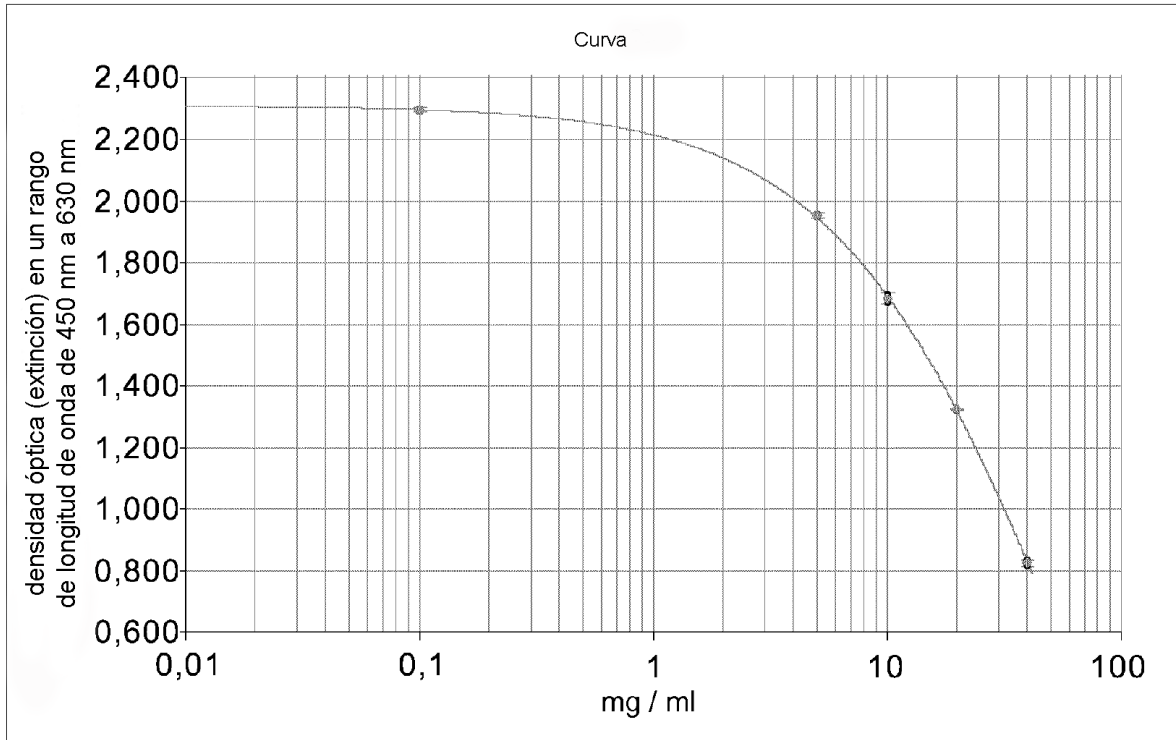


Fig. 3

Mezcla: NTX-I

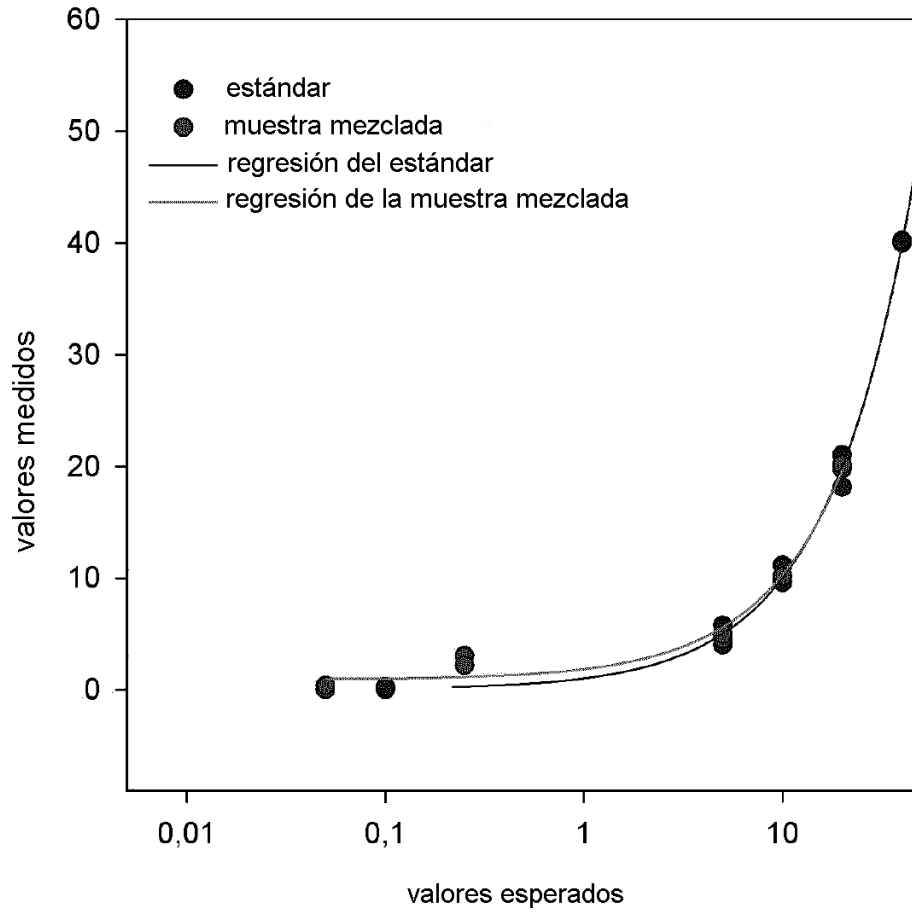


Fig. 4

Mezcla: CTX-II

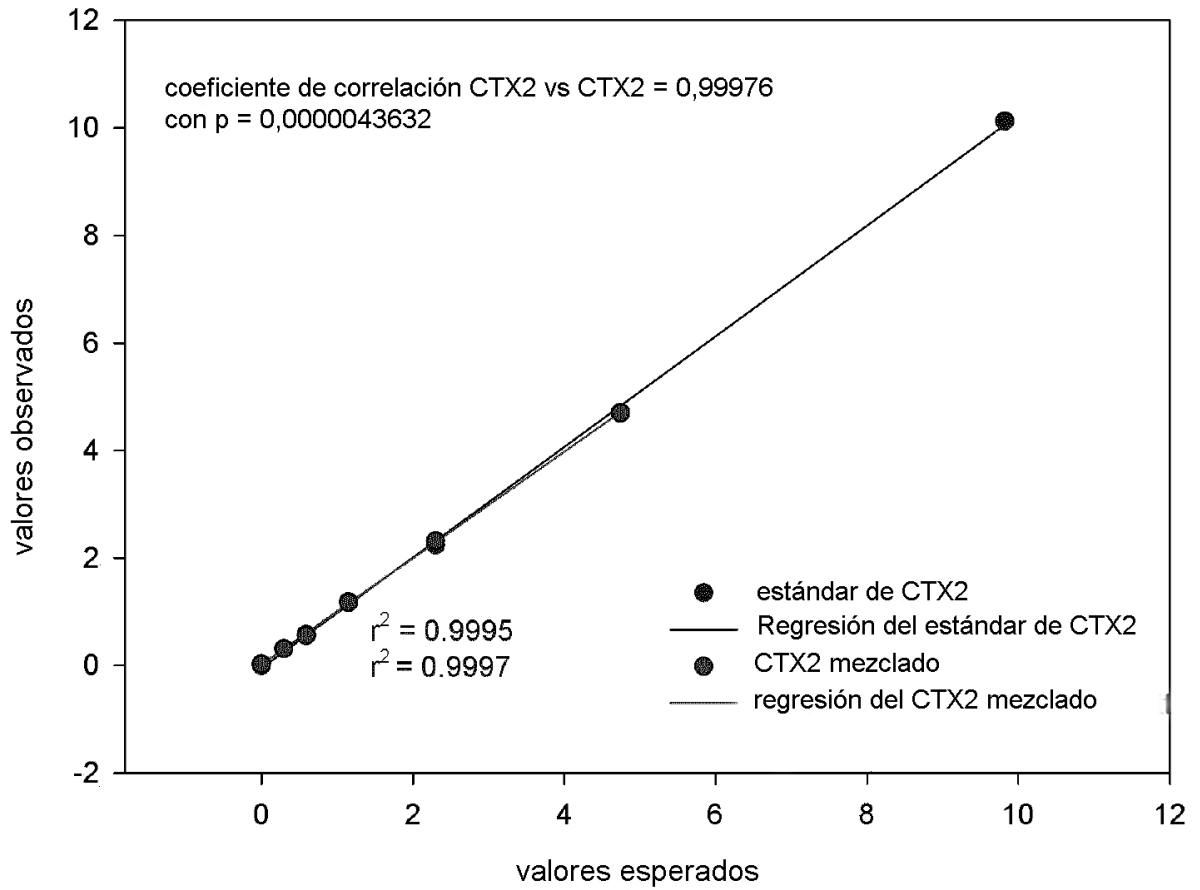


Fig. 5

Determinación de fragmentos de digestión sinoviales en la digestión de cartílago

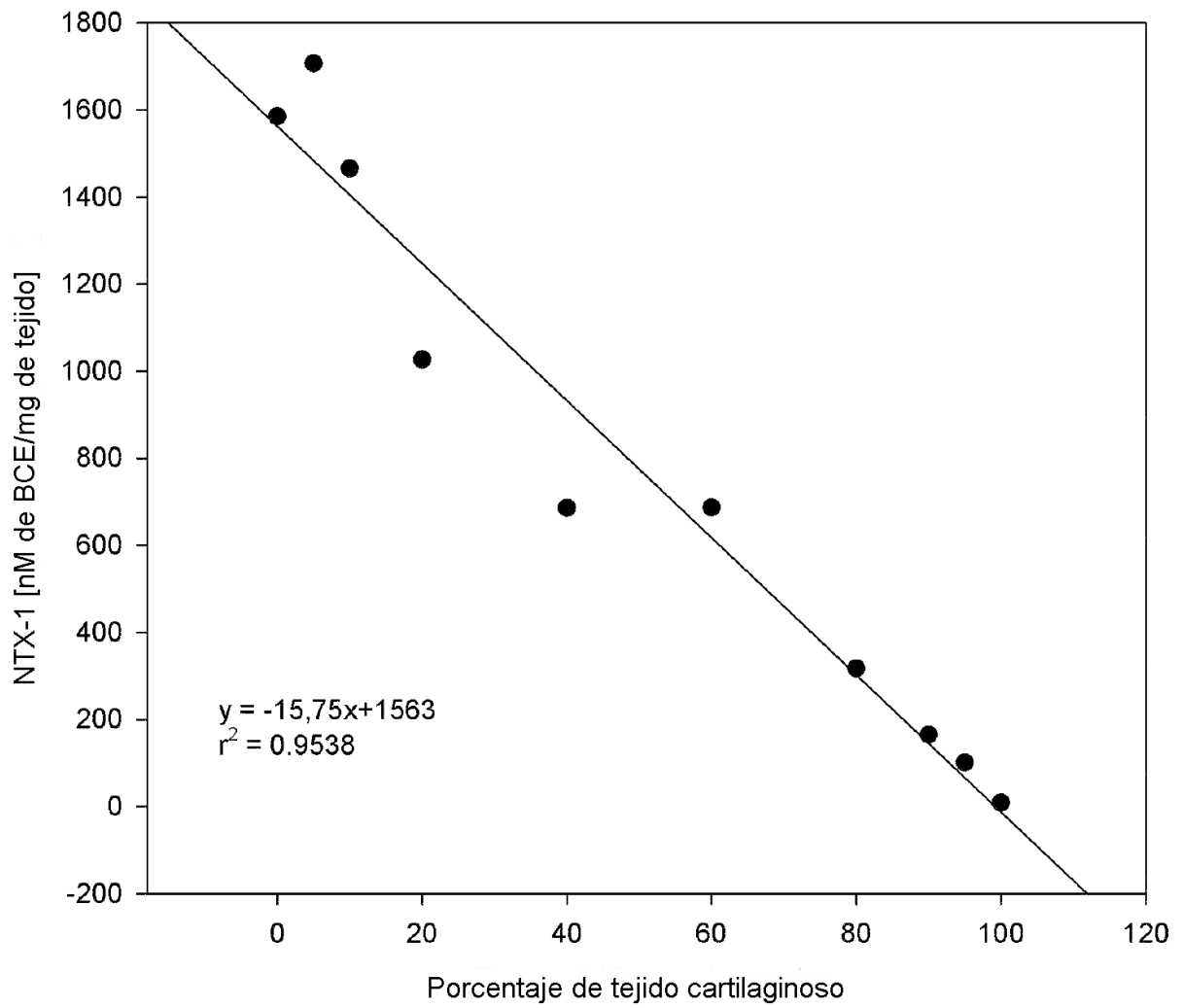


Fig. 6

Determinación de contaminación sinovial en tejido cartilaginoso

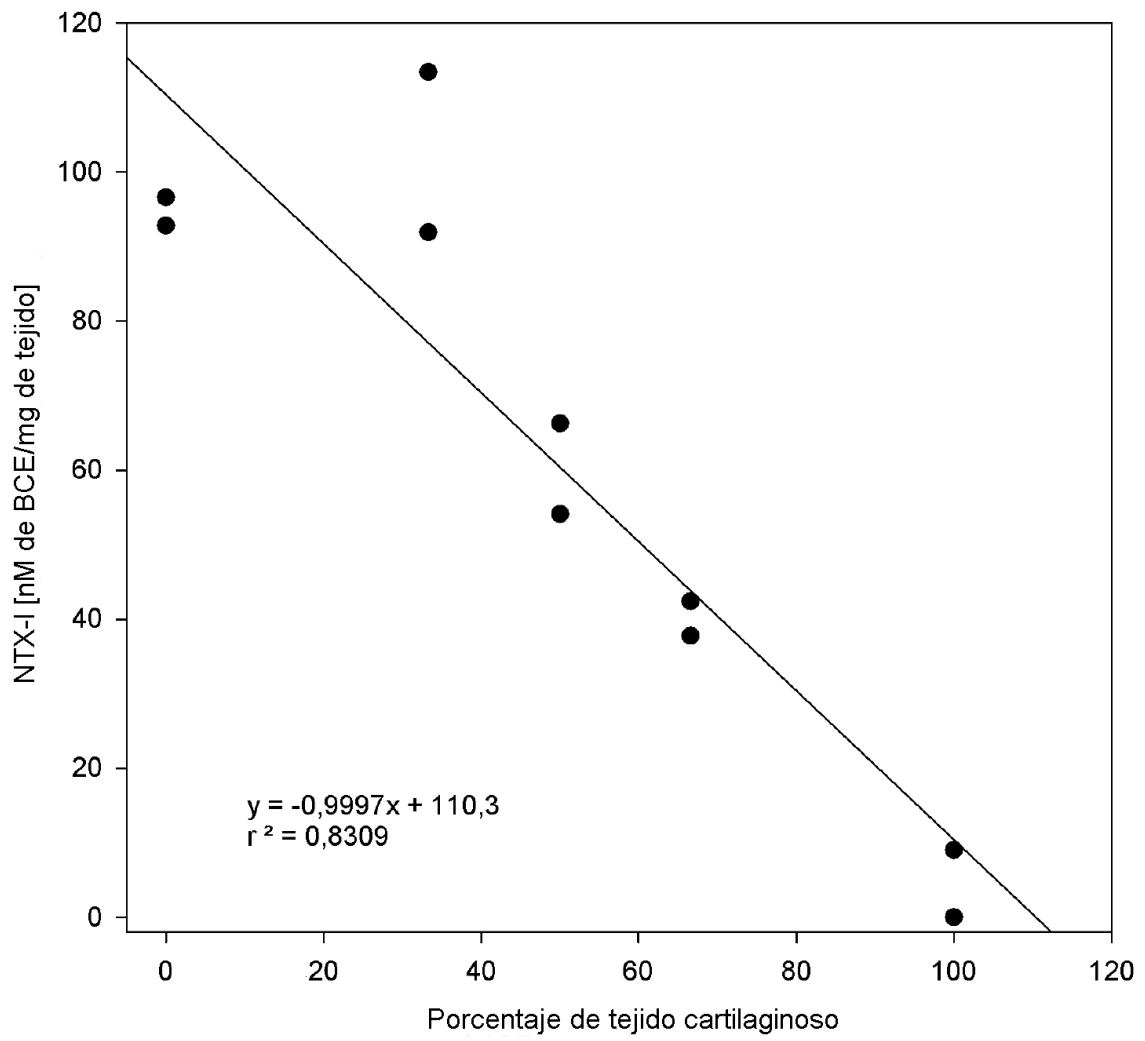


Fig. 7

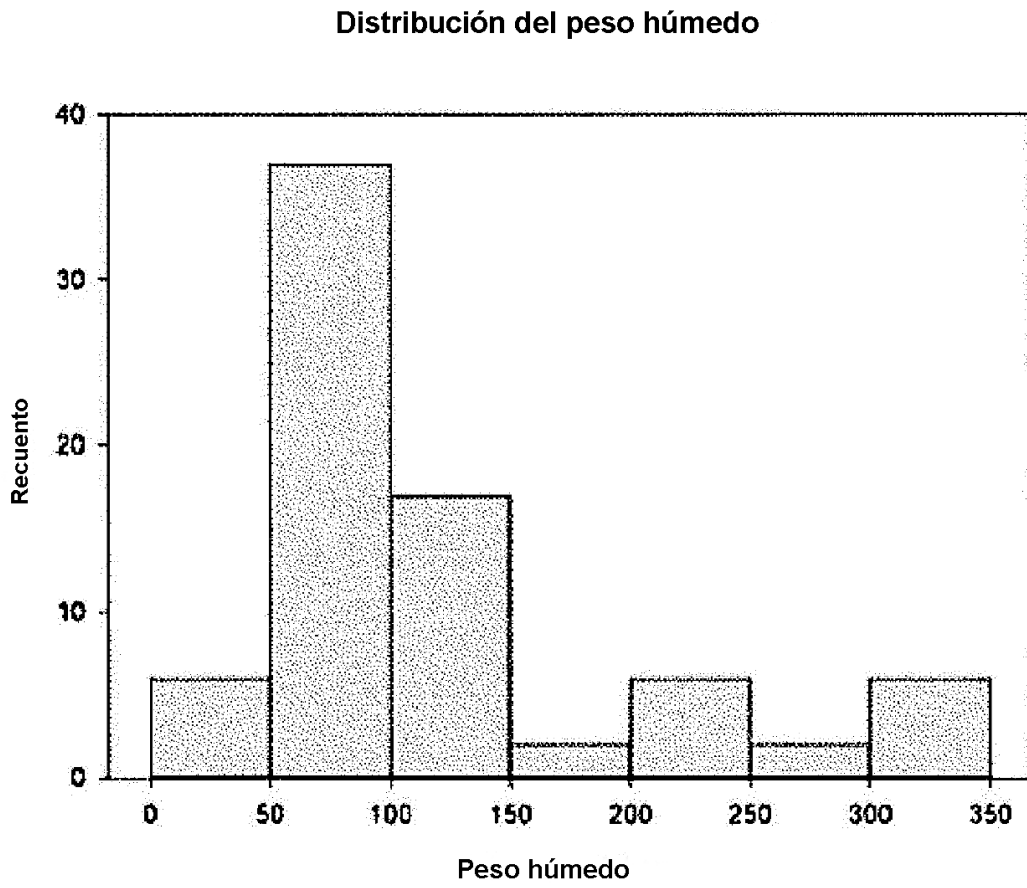


Fig. 8

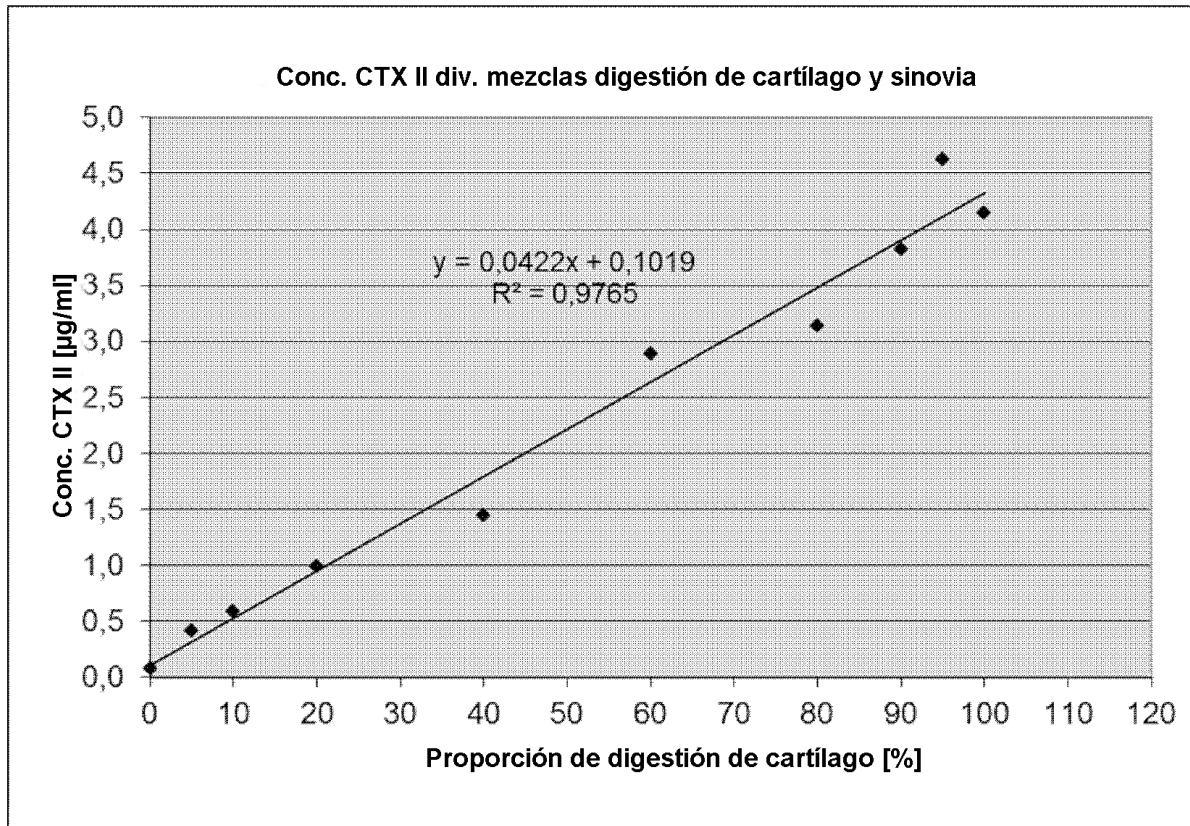


Fig. 9