

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 619**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2007 E 18174505 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3388091**

54 Título: **Reparación de tejido cartilaginoso**

30 Prioridad:

31.08.2006 EP 06076645

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

24.03.2021

73 Titular/es:

**CARTIREGEN B.V. (100.0%)
Breullaan 1 K
3971 NG Driebergen-Rijsenburg, NL**

72 Inventor/es:

**HENDRIKS, JEANINE ANNA ALPHONSE y
RIESLE, JENS UWE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 813 619 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 tejido cartilaginoso

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la ciencia médica. Más en particular, la invención se refiere a tecnología que apunta a reparar tejido cartilaginoso en un paciente que lo necesita.

Antecedentes de la invención

10 Los trastornos del cartílago son trastornos altamente debilitantes que incluyen, por ejemplo, traumatismo del cartílago articular, lesión de meniscos, trastornos de la condrogénesis y artritis. Actualmente, no hay disponibles terapias óptimas para tratar estos trastornos. Los sistemas vascular o linfático no inervan ni penetran el tejido cartilaginoso y se cree generalmente que debido a esta falta de vasculatura, el tejido cartilaginoso dañado no recibe estímulos suficientes o adecuados para provocar una respuesta de reparación. Por lo tanto, la reparación de las articulaciones artríticas requiere cirugía ortopédica para reemplazar las articulaciones desgastadas mediante una prótesis o mediante un injerto biológico. La artritis sola es un enorme problema médico y económico.

15 El cartílago hialino, la forma más abundante de cartílago, es liso vítreo, brillante y de color blanco azulado en apariencia, y de esta forma de cartílago, el más común es el cartílago articular. El cartílago articular cubre los extremos de los huesos largos de las articulaciones sinoviales. Se caracteriza por una organización estructural particular, que consiste en condrocitos que se incrustan en un material extracelular, que se denomina típicamente "matriz cartilaginosa", la cual, es una matriz extracelular rica en proteoglicanos, fibrillas de colágeno, otras proteínas y agua. Los condrocitos son el único tipo de célula que se encuentra en el cartílago articular normal, pero contribuyen menos del 2% del peso húmedo en el tejido cartilaginoso humano adulto sano.

20 La matriz extracelular del tejido cartilaginoso consiste predominantemente en moléculas de proteoglicanos específicas del cartílago con cadenas laterales de glucosaminoglucano sulfatado cargadas alta y negativamente (GAG), así como fibrillas de colágeno tipo II. Las cadenas laterales de GAG son capaces de unir moléculas de agua, secuestrando así agua y generando una presión interna de hinchamiento dentro de la matriz cartilaginosa. Estas propiedades semejantes al hidrogel son esenciales para los patrones de flujo de fluido intersticial que se observan dentro de la matriz durante la carga funcional del cartílago, momento en el que el agua sale del tejido en una cantidad que permite que las cadenas de GAG cargadas negativamente se repelen entre sí. Luego de liberar la carga de compresión, el agua se embebe nuevamente en la matriz de tejido. La red de colágeno, junto con el GAG que se une al agua, permite que el cartílago articular resista grandes cargas compresivas que le dan al tejido su función única en las articulaciones sinoviales: articulación suave y sin dolor, extensión de la carga que se aplica sobre el hueso subcondral y absorción de golpes mecánicos.

25 En el tejido cartilaginoso normal, los proteoglicanos dan la vuelta lenta pero continuamente, las moléculas degradadas se liberan del cartílago y se reemplazan mediante componentes recién sintetizados. Es el control coordinado de la síntesis y degradación de los componentes de la matriz mediante los condrocitos que mantienen el cartílago normal.

30 Los enfoques actuales para la reparación del cartílago se basan en 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 que se basan en células. Las terapias clínicas actuales se limitan a terapias que se basan en células autólogas, como el implante de condrocitos autólogos (ACI) y mosaicoplastia (que se conocen también como injertos osteocondrales autólogos). Debido a los inconvenientes graves, ambas terapias solo pueden abordar actualmente una parte limitada del mercado de reparación de cartílago.

35 Para la mosaicoplastia, una desventaja importante es la limitación a pequeños defectos debido a la disponibilidad limitada de tejido del donante para el trasplante. Para el ACI, los inconvenientes incluyen la necesidad de realizar dos operaciones quirúrgicas, una para extraer los condrocitos autólogos y la preparación del sitio de trasplante, y otra para la implantación de los condrocitos que se expanden *in vitro*. Aparte del hecho de los costes altos que implica, el proceso de ACI es largo ya que las células cartilaginosas se desdiferencian, o pierden su fenotipo, después de la expansión celular. Por lo tanto, se necesitan varios meses después del procedimiento de extracción quirúrgica para que las células recuperen su fenotipo original. Solo entonces puede comenzar la verdadera reparación del cartílago.

40 Recientemente, se ha desarrollado una segunda generación de ACI que involucra condrocitos autólogos en una matriz de biomateriales. Esta técnica resuelve algunos de los problemas de ACI, particularmente el procedimiento quirúrgico largo y abierto que se requería en el ACI. Sin embargo, quedan tres inconvenientes importantes: se deben llevar a cabo dos procedimientos quirúrgicos que implican altos costes y una rehabilitación prolongada.

45 M. Brittberg et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 367S, pág. S147-S155 (1999) divulga el uso de condrocitos autólogos, su aislamiento, expansión *in vitro* e implantación en un defecto del cartílago en altas densidades.

50 Por consiguiente, existe una necesidad de mejoras adicionales en el campo de la reparación de defectos de tejidos, en particular para defectos que no se reparan, o no se reparan suficientemente de forma espontánea.

Resumen de la Invención

La presente invención se refiere a un método para la separación electroforética de células de un tejido, comprendiendo el método:

- 5 a) seccionar un tejido para preparar fragmentos de dicho tejido, preincubando opcionalmente dichos fragmentos en una solución de digestión;
- b) sumergir los fragmentos de tejido predigeridos opcionalmente en una cantidad adecuadamente pequeña de un material de gel de electroforesis adecuado;
- 10 c) someter el gel de electroforesis cargado así con los fragmentos de tejido predigeridos opcionalmente a condiciones de electroforesis, con lo que se hace que las células migren fuera del gel de electroforesis a una solución acuosa adecuada que rodea el gel de electroforesis.

En una realización preferida de dicho método, el tejido es cartílago y las células son condrocitos.

Descripción de los dibujos

- 15 La Figura 1 muestra el resultado del experimento como se describe en el Ejemplo e indica el efecto de la dilución en el metabolismo de la matriz del cartílago (producción) de condrocitos primarios al final del período de cultivo de 3 semanas, en el que la producción de glicosaminoglicano (mg de glucosaminoglucano/mg de ADN) se indica mediante la altura de la barra con las desviaciones estándar indicadas.

La Figura 2 muestra micrografías de condrocitos primarios en cultivo de micromasa como se explica en detalle en el Ejemplo. Las micrografías muestran una imagen general (40x) y una imagen detallada (200x) de secciones de los gránulos que se tiñen con safraninO. Las imágenes detalladas se toman en el borde del gránulo o en el medio.

20 Descripción detallada de la invención

- 25 Se ha descubierto que es muy problemático cultivar cartílago a partir de condrocitos primarios debido a que los cultivos de células derivadas de cartílago primario experimentan desdiferenciación, adquieren características fibroblásticas y pierden la mayoría de las características de los condrocitos maduros. Se cree que este fenómeno se debe principalmente a la pérdida en el cultivo de la interrelación íntima matriz-célula típica del tejido cartilaginoso, que es un elemento vital de la formación y homeostasis del cartílago. El sustento del estado diferenciado de los condrocitos depende, por lo tanto, de interacciones cerradas de matriz celular, de modo que la liberación de las células desde su entorno cartilaginoso da como resultado una pérdida rápida de su morfología y función fenotípicas.

La presente invención proporciona ahora un método para la separación electroforética de células desde un tejido. Este método se puede usar muy adecuadamente para aislar condrocitos desde cartílago.

- 30 Un método para la separación electroforética de células desde un tejido comprende seccionar el tejido para preparar fragmentos del tejido, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 2 mm de diámetro, más preferiblemente de aproximadamente 1 mm. El seccionado se puede realizar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, usando tijeras, una cuchilla de afeitar, un bisturí, estirando a través de una pantalla de malla o tamiz de acero o nylon, o desagregándolo a través de una aguja.

- 35 Los fragmentos se preincuban opcionalmente en una solución de digestión. La solución de digestión comprende una o más enzimas. Las enzimas adecuadas son, por ejemplo, colagenasa, dispasa, tripsina, hialuronidasa, condroitinasa ABC, elastasa, heparitinasa, alfa-quimiotripsina, etc. El tipo de enzima dependerá del tipo de tejido que se use. Una cantidad adecuada de enzima es, por ejemplo, 0,15-2% del peso, que se basa en el peso de la solución de digestión.

- 40 La solución de digestión puede comprender además agentes reguladores que ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Se presentan preferiblemente a una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM. Los agentes reguladores adecuados para su uso en la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como citrato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, fosfato de acetato y reguladores de borato. Adicionalmente, se pueden mencionar amortiguadores y reguladores de histidina, glicina y urea, tales como Tris, MOPS y HEPES.

- 45 La solución de digestión puede comprender además compuestos tales como: agentes quelantes, por ejemplo, ácido dietilentiainopentacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por ejemplo, Versene™), ácido etilen bis(oxietilenitrolo)tetraacético (EGTA); agentes reductores, tales como ditiotreitól, ditióeritritól, mercaptoetanol, glutatión, tioredoxina, cisteína, etc.; iones necesarios para la activación de la enzima, tales como CaCl₂, MgCl₂, NaCl y/o KCl; y/o disolventes orgánicos o agentes modificadores de lípidos / membranas tales como dimetilsulfóxido (DMSO); detergentes no iónicos tales como tritón X-100; y/o osmoprotectores tales como sacarosa.
- 50

La predigestión no siempre es necesaria, por ejemplo, en el caso de la separación electroforética de las células a partir de un tejido (en particular, los condrocitos a partir de cartílago), el tejido se puede seccionar lo suficiente y las células pueden migrar fuera del tejido mediante electroforesis.

Los fragmentos de tejido predigeridos opcionalmente se someten luego a electroforesis. Con este fin, se sumergen preferiblemente en el volumen más bajo posible de un gel de electroforesis adecuado. Ejemplos de geles de electroforesis adecuados son, por ejemplo, geles de electroforesis que se basan en agarosa, dextrano, polietilenglicol, Ficoll, Percoll, poliacrilamida, etc., o una combinación de los mismos.

5 La electroforesis misma se puede llevar a cabo en condiciones que se conocen bien en la técnica, mediante lo cual se aplica un voltaje al gel de electroforesis creando un campo eléctrico que hace que las células en el gel de electroforesis migren del gel de electroforesis a un disolvente acuoso adecuado que rodea el gel de electroforesis, es decir, el regulador de electroforesis.

10 Otro procedimiento de aislamiento es aquel en el que el tejido, en particular el cartílago, se somete a una digestión rápida (en el caso del cartílago con colagenasa tipo II) durante un período de tiempo compatible con una terapia o tratamiento intraoperatorio o de cirugía única, de modo que las células se pueden mezclar con el gel y el gel que comprende las células se puede implantar en el paciente, preferiblemente el mismo paciente del que se extrajeron las células. Un período de digestión adecuado es, por ejemplo, tan corto como 1 minuto a 2 horas, preferiblemente de 5 minutos a 1 hora, lo más preferiblemente de 10-30 minutos, después de lo cual, las células se aíslan de la matriz tisular. Se encontró que en el caso del cartílago, es posible un aislamiento muy rápido de los condrocitos. Esto permite luego el reemplazo tisular (preferiblemente autólogo) como una forma de terapia quirúrgica intraoperatoria o individual.

20 En una realización preferida, particularmente en el caso de una digestión rápida, la muestra de tejido se somete a un tratamiento para incrementar la permeabilidad de la matriz extracelular antes de someterla a la enzima de digestión. Se contempla que uno de los factores que determina la eficacia del aislamiento de las células a partir la muestra de tejido es el acceso de la enzima de digestión a las células y la matriz extracelular en la muestra. La permeabilidad del cartílago se determina mediante factores químicos y mecánicos, el agua y las interacciones de proteoglicanos. Se prefiere que el tratamiento para incrementar la permeabilidad de la matriz extracelular, particularmente para el tejido cartilaginoso, comprenda un incremento de las fuerzas de repulsión entre los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular. En una realización preferida, este tratamiento comprende poner en contacto la muestra de tejido con un ácido, una base, dimetilsulfóxido (DMSO), catepsina, glicerol o cationes, o cualquier otro agente que pueda incrementar la presión osmótica de Donan de la matriz extracelular o hacer que se hinche la matriz extracelular, antes de someterla a la enzima de digestión.

30 Los ejemplos adecuados de cationes incluyen Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} . Estos se pueden introducir, por ejemplo, en forma de sus sales de cloruro, preferiblemente en una concentración entre 10 mM y 2 M. Un ácido adecuado es, por ejemplo, ácido clorhídrico, preferiblemente en una concentración de 10-100 mM, lo que da como resultado una disminución del pH de la matriz extracelular. Se puede usar dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol en una concentración entre 5 y 30% v/v. Otros agentes adecuados para esta etapa incluyen etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA) o ácido etilenglicolbis (β -aminoetiléter) N, N'-tetraacético (EGTA), ambos se usan preferiblemente en una concentración de 0,01-0,1 M) o citrato en regulador Tris, pH 5.8 y 7.4, a 4° y 37°. Después de incrementar la permeabilidad del tejido, se puede lavar la muestra de tejido con, por ejemplo, solución salina regulada con fosfato antes de someterla a una enzima de digestión.

La etapa de incrementar la permeabilidad dura preferiblemente desde 1 minuto hasta no más de 1 hora, manteniendo preferiblemente el tiempo total de aislamiento de las células dentro del intervalo de 2 horas. Se realiza preferiblemente a una temperatura entre 17 °C y 37 °C.

40 Los procedimientos de aislamiento que se describen anteriormente son un aspecto de la presente invención, y se pueden usar ampliamente para el aislamiento de células a partir de tejidos. En particular, se puede emplear para el aislamiento de condrocitos a partir del cartílago, preferiblemente cartílago articular. En una realización preferida, los condrocitos se aíslan a partir del cartílago en una parte del cuerpo, tal como una articulación, que comprende un defecto. El sitio de aislamiento puede ser el sitio del defecto que se reparará a sí mismo o que se encuentre cerca de él. Los condrocitos que se obtienen así no se desdiferencian y se pueden usar en otros aspectos de la presente invención.

50 En el contexto de la invención, se considera que los condrocitos que se desdiferencian sustancialmente, no muestran la morfología alargada que tienen los condrocitos que se desdiferencian típicamente. Además, se observa que los condrocitos que a menudo se desdiferencian solo producen colágeno tipo I, y no colágeno tipo II, y por consiguiente, tienen una proporción de colágeno II / I inferior a 1. Como se mencionó, de acuerdo con la invención, se evita en gran medida la desdiferenciación de condrocitos.

Los aspectos de la presente invención se basan en parte en la idea de que la dilución simple de condrocitos primarios en una matriz de gel da como resultado un incremento en la proporción de producción de matriz en base por célula.

55 Sin pretender imponer ninguna teoría, una hipótesis es que esto se puede deber a la liberación de los condrocitos desde el condrón, la unidad microanatómica que se compone de un condrocito y su microambiente pericelular (PCME), incluyendo la matriz pericelular y la cápsula. Los condrones contienen generalmente más de un condrocito. El número promedio de tejido de condrocitos por condrón en la rodilla, por ejemplo, es típicamente de 2,0 en toda la rodilla, mientras que el número promedio de condrocitos por unidad de volumen es de alrededor de 5×10^6 por cm^3 . Por lo

tanto, el número promedio de tejido de condrocitos por unidad de volumen en el cartílago articular de la rodilla es de aproximadamente 10×10^6 condrocitos por cm^3 en la proporción indicada de 2,0 condrocitos por condón. En el condón, los condrocitos están muy juntos. Por lo tanto, se prevé que el condrocito en el gel de matriz está esencialmente libre del entorno del condón, que es el resultado directo del procedimiento de aislamiento, y que los condrocitos no están en contacto cercano, sino que se separan mediante un gel. Además, se prevé que después de que los condrocitos se hayan aplicado al gel, los condrones se puedan reformar.

5

Un método de cultivo típico para los condrocitos es el cultivo de micromasa. El cultivo de micromasa es un tipo de cultivo en el que las células de una suspensión se hilan mediante centrifugación y se cultivan en forma del gránulo resultante, adheridas entre sí.

10 El presente método comprende la dilución de células aisladas y concentradas con un material de gel, de modo que las células individuales no se adhieren entre sí, sino que se separan.

En una realización, se pueden aislar, concentrar y diluir los condrocitos primarios (recién aislados) con un material formador de gel. El material formador de gel (que se llama también material de gel en la presente, por ejemplo, agarosa) se mezcla preferiblemente en forma no solidificada con las células mediante una resuspensión cuidadosa pero suave de las células concentradas con una composición, tal como una solución o una suspensión del material formador de gel y el material permite luego que forme el gel. Por ejemplo, la mezcla de células en la composición del material formador de gel antes de la gelificación se puede poner en hielo en el caso de una agarosa pastosa, durante un período corto de tiempo. Después de la gelificación, los cultivos en gel se pueden cultivar en condiciones estándar para permitir que las células formen material extracelular, o los cultivos en gel se pueden implantar directamente para el propósito de reparación del tejido.

15

20

El presente método comprende la dilución de células aisladas y posteriormente concentradas, preferiblemente condrocitos con un material de gel, de modo que los condrocitos individuales no se adhieren entre sí, sino que se separan. En un intervalo significativo, se descubrió que cuanto más se espaciaban estas células en dicho gel, mayor era la producción de GAG por célula. Por lo tanto, la presente invención prevé el uso de células que crecen a distancia entre sí, o se espacian de manera estable, por ejemplo, separando el gel solidificado rígido a través del cual no se pueden mover, para la aceleración de la formación de material extracelular, en particular GAG, o para inducir la producción de matriz extracelular de cartílago y/o tejido cartilaginoso. Por lo tanto, la presente invención contempla el uso del gel para un propósito beneficioso particular de mejorar las condiciones de producción de cartílago a partir de condrocitos primarios.

25

Muy adecuadamente, los condrocitos aislados se pueden mezclar con un material de gel de matriz, de modo que se suspendan en dicho material de gel de matriz a una densidad de células que es inferior a la del aislado concentrado. Por ejemplo, si la densidad de condrocitos original en el aislado concentrado es $80 \times 10^6/\text{ml}$, los condrocitos aislados se suspenden en un volumen apropiado para dar como resultado una densidad de condrocitos de menos de $70 \times 10^6/\text{ml}$, por ejemplo 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005 o $0,002 \times 10^6/\text{ml}$.

30

35

Preferiblemente, las células se suspenden homogéneamente en dicho material de gel de matriz de modo que la dilución dé como resultado que las células se coloquen a distancias pares entre sí.

La concentración clínica de las células (es decir, la densidad del implante de condrocitos que comprenden gel) estará preferiblemente en el intervalo de $0,002-1,0 \times 10^6$ células/ml, más preferiblemente en el intervalo de 0,02 a $0,6 \times 10^6$ células/ml.

40

Clínicamente, el método comprende que el cirujano tome una biopsia de cartílago, aislando los condrocitos del cartílago de acuerdo con cualquier método, preferiblemente mediante un método como se describe aquí, lavando opcionalmente las células, concentrando (por ejemplo, por filtración o centrifugación o cualquier otro método adecuado, preferiblemente filtrando las células a través de un colador celular) para eliminar cualquier fluido de aislamiento y componentes de tejido de cartílago redundantes, diluir las células así contraídas con la composición de material formador de gel, gelificar la composición e implantar en el paciente el gel que comprende los condrocitos.

45

Se puede usar cualquier material de gel de matriz que no sea citotóxico, como material de gel de matriz adecuado. Preferiblemente, el material de gel de matriz es biocompatible, lo que significa que una superficie de tejido acepta el material. El término amplio biocompatible incluye también no tóxico, no carcinogénico, inerte químicamente y estable en el cuerpo vivo. Los materiales biocompatibles adecuados incluyen adhesivo de fibrina, ácido hialurónico, alginato, hidrogel de propilen fumarato-co-etilenglicol, hidrogel de hidroxipropil metilcelulosa, péptido mimético de colágeno, quitosano, colágeno, gelatina, hidrogel de (etilenglicol)-co-poli(ácido láctico), agarosa, Pluronic™ F-127, copolímeros de poli(etilenglicol)-tereftalato (PEGT) y poli(tereftalato de butileno) (PBT) (tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2006/085747), o combinaciones de los mismos.

50

55

El término "matriz extracelular", que se abrevia "MEC", se refiere al complejo material estructural que se produce mediante las células en los tejidos de mamíferos, particularmente células de tejido conectivo, por ejemplo, células tales como fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, células epiteliales, células de músculo liso, adipocitos y células

mesenquimales, y cuyo material *in vivo* rodea y da soporte a esas células. Típicamente, el MEC se compone de fibras integradas en lo que se conoce comúnmente como 'sustancia fundamental'. Las fibras se componen de proteínas estructurales, generalmente colágeno y/o elastina. La sustancia fundamental se compone de proteoglicanos (o mucopolisacáridos).

- 5 En aspectos de la presente invención, el material de gel de matriz puede comprender uno o más de los componentes proteoglicanos, GAG, fibras y proteínas funcionales.

Las fibras del gel de matriz pueden ser cualquier fibra. Se prefieren las fibras de elastina y/o colágeno. Muy preferidas son las fibras de colágeno. Los colágenos particularmente adecuados son colágenos formadores de fibrillas. Se prefieren particularmente el colágeno tipo I, el colágeno tipo II, el colágeno tipo III, el colágeno tipo IV o el colágeno tipo X. El más preferido es el colágeno tipo II. Una cantidad adecuada de colágeno es, por ejemplo, 1-90% del peso, que se basa en el peso total del material de matriz de gel.

En aspectos de la invención, el material de gel de matriz comprende preferiblemente al menos un proteoglicano. El proteoglicano se compone preferiblemente de una proteína del núcleo con moléculas de glicosaminoglicano (GAG) que penden. Los GAG adecuados son, por ejemplo, ácido hialurónico, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, heparina sulfato, heparina sulfato y queratán sulfato. Los GAG se unen preferiblemente a la proteína del núcleo a través de un enlazador trisacárido (por ejemplo, un enlazador GalGalXyl). Los proteoglicanos de ejemplo son decorina, biglicano, versicano y agrecano. Los proteoglicanos se pueden interconectar opcionalmente mediante moléculas de ácido hialurónico. Alternativamente, se pueden unir múltiples proteoglicanos a una única cadena principal de ácido hialurónico. En ambos casos, el gel de matriz forma una red de polímero o hidrogel capaz de contener agua.

15 Una cantidad adecuada de proteoglicano es, por ejemplo, 1-90% del peso, que se basa en el peso total del material de matriz de gel.

El material de gel de matriz puede comprender además una o más proteínas proveedoras de funcionalidad tales como: glicoproteínas tales como laminina, entactina, tenascina fibrillina o fibronectina, para mejorar la integridad estructural de la red y para la unión de células al gel de la matriz; osteocalcina (proteína Gla), como una proteína que se une al calcio durante la mineralización; osteonectina, que cumple una función de puente entre el colágeno y el componente mineral; y sialoproteínas, tales como sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), proteína de matriz de dentina-1 (DMP1), sialofosfoproteína de dentina (DSPP) y fosfoglicoproteína extracelular de matriz (MEPE). Una cantidad adecuada de proteína es, por ejemplo, 1-90% del peso, que se basa en el peso total del material de matriz de gel.

El gel de matriz puede comprender además citoquinas y factores de crecimiento. Las citoquinas y factores de crecimiento adecuados incluyen la osteoprotegerina (OPG), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF, FGF-1, y FGF-2), interferón α (IFN- α), interleucinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-11), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II), factor de diferenciación de osteoclastos (ODF, que se conoce también como OPGL [ligando de osteoprotegerina], RANKL [activador del receptor del ligando NFB], TRANCE [citoquina inducida por activación relacionada con el TNF]), y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Los factores de crecimiento que se prefieren incluyen BMP, IGF, PTH y PDGF. El material de gel de matriz en aspectos de la presente invención puede ser un material natural o artificial (por ejemplo, un hidrogel proteínico o peptídico). Los expertos en la técnica conocen las cantidades adecuadas de estas citoquinas y factores de crecimiento, y pueden variar según las necesidades.

Una vez que las células se mezclan con el material de gel de la matriz, se obtiene un material que puede servir para la función de un material de reparación. Por simplicidad, este material se puede denominar como el implante de condrocitos (autólogo). Este implante de condrocitos (autólogo) se puede asociar con un armazón para proporcionar al implante una integridad estructural aún mayor. Tanto el implante de condrocitos (autólogo) como el armazón cargado son aspectos de la presente invención. Se entenderá que no se necesita implantar necesariamente este implante mediante métodos que requieren procedimientos quirúrgicos largos y abiertos. En cambio, se puede preparar e implantar mediante técnicas mínimamente invasivas, como los métodos endoscópicos.

El material de matriz se puede preparar adecuadamente mezclando los componentes que se seleccionan en un medio acuoso, preferiblemente agua, y agregando opcionalmente componentes para permitir que los componentes adquieran su orientación tridimensional o para permitir el autoensamblaje de los componentes en un hidrogel 3D.

El medio acuoso en el que se combinan o agregan los componentes de gel de matriz puede comprender además electrolitos, por ejemplo, iones tales como CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl y/o KCl ; nutrientes; agentes reguladores que ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas que se describen anteriormente para la solución de digestión; osmoprotectores y otros excipientes.

Se apreciará que el material de matriz se puede preparar de antemano y almacenar, listo para su uso, en condiciones adecuadas, lo que es de gran beneficio para los procedimientos quirúrgicos que incluyen i) la extracción autóloga de condrocitos, ii) el aislamiento de los condrocitos y iii) la preparación del implante de condrocitos (autólogo) de acuerdo con la invención. La preparación del implante de condrocitos (autólogos) no requerirá más tiempo que el aislamiento de los condrocitos del paciente que necesita el tratamiento quirúrgico. Una vez que se prepara, se prefiere que el

implante de condrocitos (autólogo) o, alternativamente, el armazón cargado, se implante inmediatamente en el sitio de implantación que se prepara opcionalmente.

La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplo

5 Materiales y Métodos

Condrocitos primarios bovinos

10 Los CPB se usaron en experimentos inmediatamente después del aislamiento. Para el aislamiento de estas células, se diseccionó el espesor completo del cartílago articular del surco femoral rotuliano del bovino adulto. El cartílago diseccionado se secciona y se incuba durante 20-22 horas en una solución de colagenasa tipo II que contiene 0,15% de colagenasa (Worthington), medio de Eagle modificado de Dulbecco (Gibco) suplementado con penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml). La suspensión, que está esencialmente libre de condrones, se filtró a través de un filtro de malla de nylon de 100 µm (colador de células Nucleon) y los condrocitos se lavaron 2 veces con solución salina regulada con fosfato (PBS) suplementada con penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml).

Cultivo de micromasa

15 El cultivo de micromasa es un tipo de cultivo en el que las células de una suspensión se hilan mediante centrifugación y se cultivan en forma del gránulo resultante, adheridas entre sí.

El presente método comprende la dilución de esa micromasa con un material de gel, de modo que los condrocitos individuales no se adhieren entre sí, sino que se separan.

20 Los condrocitos PCB primarios (recién aislados) se aislaron por separado como gránulos de aproximadamente 500.000 células/gránulo, y se diluyeron con agarosa al 1% mediante una resuspensión cuidadosa pero suave del gránulo con una fusión de agarosa de bajo punto de fusión al 1% de acuerdo con el siguiente esquema.

25 Se preparó un total de 6 grupos y un control. Para los grupos A, B y C, la cantidad de agarosa que se agrega al gránulo (fue de 500.000 células/gránulo) fue de 6 µl, 21,8 µl y 106 µl para preparar diluciones del gránulo aislado de 1,1x, 4,0x y 19,8x, respectivamente. De este modo, se mantiene constante la cantidad de células y se incrementa el volumen del gel. Para los grupos D, E y F, el volumen del gránulo fue de 10,6 µl y la cantidad de células/gránulo para una dilución de 2,0x, 4,0x y 19,8x, de 500.000, 250.000 y 50.000, respectivamente. De este modo, se mantiene constante el volumen del gel, mientras se varía la cantidad de células.

30 Tabla 1. Esquema de dilución que indica a qué diluciones se inició el cultivo de los condrocitos primarios en cultivo de micromasa y las cantidades de ADN y material de matriz (glicosaminoglicanos sulfatados) que se producen en un período de cultivo de 3 semanas.

Grupo	Concentración de condrocitos primarios *10 ⁶ /ml	Dilución múltiplo (x)	GAG total ug	ADN total ug	GAG/ADN ug/ug
A	83	1,1	31,0 ± 9,2	8,8 ± 1,8	3,5 ± 1,3
B	23	4	40,9 ± 2,0	7,3 ± 1,4	5,6 ± 1,1
C	4,7	20	45,8 ± 1,9	5,4 ± 0,3	8,4 ± 0,6
D	47	2	41,7 ± 2,6	7,3 ± 1,3	5,7 ± 1,1
E	23	4	46,0 ± 2,5	5,0 ± 1,2	9,2 ± 2,3
F	4,7	20	38,3 ± 2,9	4,3 ± 2,3	8,9 ± 4,8
control	93	-	26,5 ± 6,0	8,8 ± 1,2	3,0 ± 0,8

35 Después de la dilución, las mezclas se pusieron en hielo durante 1 minuto. Las construcciones de agarosa/célula se cultivaron en condiciones estándar en 3 ml de CM1 en un tubo de centrifuga Falcon de polipropileno durante 3 semanas y el medio se refrescó cada 3-5 días. Cada grupo que consta de 9 cultivos de mezcla de gel se investigó adicional e individualmente para histología, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica o análisis bioquímico cuantitativo.

Histología

40 Se fijaron los cultivos de micromasa con glutaraldehído al 1,5% en regulador de cacodilato (0,14 M / pH 7,2-7,4). Las muestras se lavaron en PBS, se deshidrataron y se incrustaron en parafina. Las secciones (5 µm) se cortaron con un micrótopo y se tñieron para glucosaminoglicanos sulfatados (GAG) con safraninO y se contratiñeron con hematoxilina (Gill No 3) y verde rápido para visualizar núcleos y citoplasma, respectivamente.

Inmunohistoquímica

5 Los cultivos de micromasa se incrustaron en el compuesto OCT (Tissue-Tek) y se congelaron inmediatamente a -80 °C para la inmunotinción. Se cortaron secciones (5 µm) con un criotomo y se fijaron con acetona durante 10 min. Las crio-secciones se tiñeron durante la noche a 4 °C para colágeno Tipo II (1:100, DSHB # II-II6B3). El bloqueo se realizó con suero humano al 10% y, como anticuerpo secundario, se utilizó anti-ratón de cabra (1:100, DAKO). La tinción se visualizó con una solución de 3, 3 diaminobenzidina (DAB) (DAKO) durante 10-20 minutos. Se verificó la especificidad del anticuerpo MHC Clase I específico humano (1/100) con condrocitos humanos. Este anticuerpo no reaccionó de forma cruzada con condrocitos bovinos. El anticuerpo se diluyó en regulador de lavado (PBS que contenía 10% de regulador de bloqueo DAKO Cytomation X0909). Los portaobjetos se pre-bloquearon en regulador de bloqueo al 100% durante 1 hora y se incubaron con el primer anticuerpo durante la noche. Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron 3 veces en regulador de lavado y se incubaron con el segundo anticuerpo de cabra anti-ratón (1:100, DAKO) durante 1 hora. Los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS y la tinción se visualizó con microscopio fluorescente.

Ensayo cunatitativo de GAG y ADN

15 Los cultivos de micromasa para el análisis cuantitativo de los GAG y el número de células se lavaron con PBS y/o se congelaron a -80°C. Posteriormente se digirieron con 1 mg/ml de proteinasa K (SIGMA-Aldrich) en regulador Tris/EDTA (pH 7,6) que contenía 18,5 µg/ml de yodoacetamida y 1 µg/m de pepstatina A (SIGMA-Aldrich) durante > 16 horas a 56°C. El contenido de GAG se determinó espectrofotométricamente con tinción con cloruro azul de 9-dimetilmetileno (DMMB, SIGMA-Aldrich) en regulador PBE (14,2 g/l de Na₂HPO₄ y 3,72 g/l de Na₂EDTA, pH 6,5) con un lector de microplacas (instrumentos Bio-TEK) en una absorbancia de 520 nm. El número de células se determinó mediante la cuantificación del ADN total con el kit de ADN CyQuant de acuerdo con la descripción del fabricante (sondas moleculares) y el lector de placas fluorescentes (Perkin-Elmer). La curva estándar para el análisis se generó usando sulfato de condroitina A (Sigma).

Resultados

25 Como se puede ver a partir de la Figura 1 y la Tabla 1, cuando las células aisladas se cultivaron en un cultivo en gel, producen más GAG por unidad de ADN cuando están más separadas. Al incrementar la distancia entre las células reduciendo la cantidad de células por volumen de gel o incrementando el volumen de gel a nivel celular constante, se obtiene una mayor producción de GAG por célula.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la separación electroforética de células a partir de un tejido, comprendiendo el método:
- a) seccionar un tejido para preparar fragmentos de dicho tejido, preincubando opcionalmente dichos fragmentos en una solución de digestión;
- 5 b) sumergir los fragmentos de tejido predigeridos opcionalmente en un material de gel de electroforesis;
- c) someter el gel de electroforesis cargado así con los fragmentos de tejido predigeridos a condiciones de electroforesis, con lo que se hace que las células migren fuera del gel de electroforesis a una solución acuosa que rodea el gel de electroforesis.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tejido es cartílago, preferentemente cartílago articular, y las células son condrocitos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los fragmentos de dicho tejido son de aproximadamente 0,5 - 2 mm de diámetro.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los fragmentos de dicho tejido son de aproximadamente 1 mm de diámetro.
- 15 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el seccionado se realiza utilizando tijeras, una cuchilla de afeitar, un bisturí, estirando a través de una pantalla de malla o tamiz de acero o nylon, o desagregándolo a través de una aguja.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa de preincubar dichos fragmentos en una solución de digestión, en el que dicha solución de digestión comprende una o más enzimas.
- 20 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cantidad de enzima es de 0,15 a 2% en peso, con base en el peso de la solución de digestión.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que una o más enzimas se seleccionan de colagenasa, dispasa, tripsina, hialuronidasa, condroitinasa ABC, elastasa, heparitinasa o alfa-quimotripsina.
- 25 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la solución de digestión comprende además agentes reguladores que ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas, preferiblemente en el que los agentes reguladores están presentes en una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que la solución de digestión comprende además un agente quelante, un agente reductor o iones para la activación de una o más enzimas.
- 30 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los fragmentos de tejido se sumergen en el menor volumen posible de un material de gel de electroforesis.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de gel de electroforesis se selecciona de geles de electroforesis basados en agarosa, dextrano, polietilenglicol, Ficoll, Percoll, poliacrilamida o una combinación de los mismos.
- 35

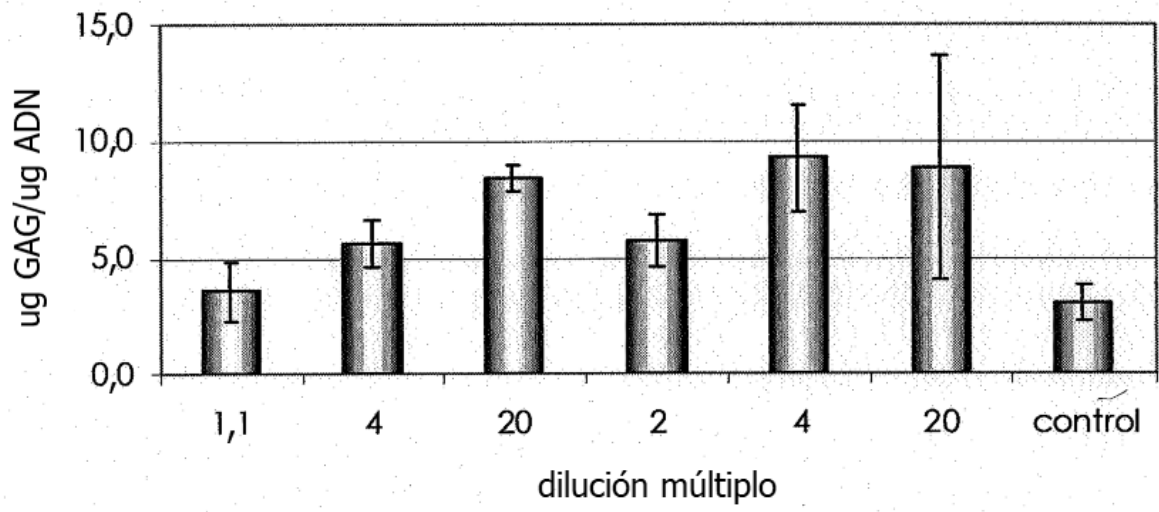


Figura 1

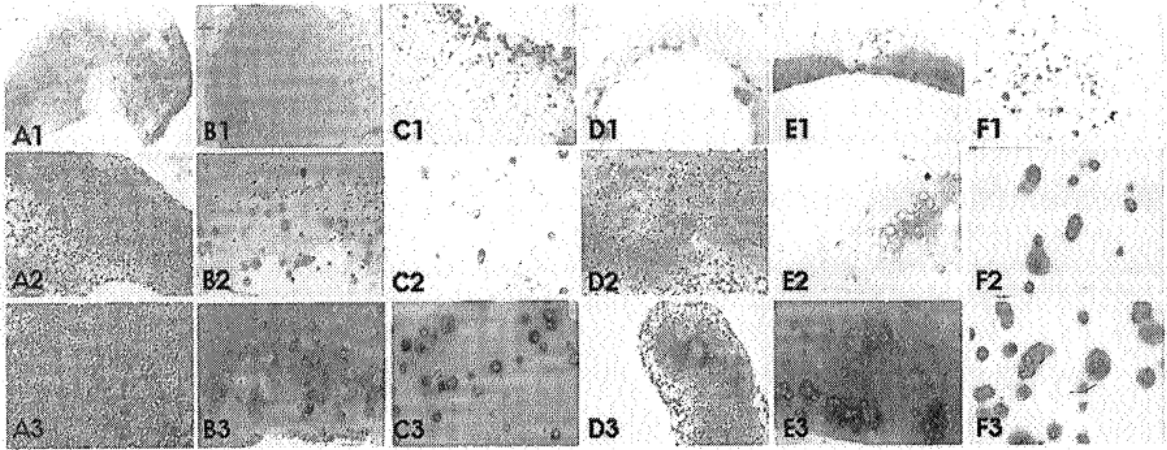


Figura 2