



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 001**

(51) Int. Cl.:
A61L 27/02 (2006.01)
A61L 27/04 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04790224 .2**
(96) Fecha de presentación : **08.10.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1684815**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

(54) Título: **Regeneración de cartílago con generación de condrones en presencia de altas concentraciones de magnesio.**

(30) Prioridad: **10.10.2003 EP 03022780**
10.10.2003 US 509942 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2009

(73) Titular/es: **KW2 Implantattechnologie GmbH**
Grosse Barlinge 21
30171 Hannover, DE

(72) Inventor/es: **Witte, Frank;**
Windhagen, Henning;
Kaese, Volker y
Feyerabend, Frank

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 321 001 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

Regeneración de cartílago con generación de condrones en presencia de altas concentraciones de magnesio.

La presente invención se refiere a un método para la generación de condrones y de tejido cartilaginoso. En particular, la presente invención se refiere a la capacidad de iones Mg para estimular el crecimiento y la regeneración de condrones, particularmente de pseudocondrones como producto intermedio en la regeneración y el crecimiento de tejido cartilaginoso. Especialmente, las concentraciones de Mg extracelulares elevadas de manera no fisiológica pueden regenerar cartílago hialino, cartílago elástico y/o fibrocartílago por medio de la forma intermedia de condrones.

Técnica anterior

El cartílago articular tiene una capacidad limitada para la reparación de daños de la superficie de articulaciones. Hasta ahora, no hay ningún tratamiento *in vivo* ni *in vitro* que restaure completamente los daños del cartílago (Hunziker, E.B. 2002, Osteoarthritis. Cartilage 10, 432-463). Sin embargo, un concepto adecuado para el tratamiento de daños de las articulaciones se basa en cartílago producido *in vitro*. Los procedimientos/métodos usados actualmente para la producción de cartílago artificial son sistemas de cultivo *in vitro* basados en el sistema de alginato.

El sistema de alginato se basa en alginato, un copolímero lineal de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-glucurónico, que se recoge de algas marrones. Tiene la capacidad de polimerizarse para dar un gel cuando se pone en contacto con iones calcio. Este procedimiento es reversible, la despolimerización se induce mediante citrato. Basándose en estas propiedades pueden cultivarse células en el, y recuperarlas del, alginato para un cultivo adicional. La principal ventaja de este sistema para condrocitos es que pueden volver a diferenciarse las células minimizando los contactos célula-célula, que son una señal para la condrogénesis (Bonaventure J, *et al.* 1994, Exp Cell Res 212 (1): 97-104.).

Sin embargo, especialmente el uso de factores de crecimiento y/o citocinas hace que el procedimiento/método de generar cartílago *in vitro* sea muy costoso. Además, no se ha demostrado la seguridad a largo plazo de estas adiciones.

Se determinan diferentes tipos de cartílagos mediante condrocitos y su matriz extracelular (ECM). Estos diferentes tipos de cartílago proporcionan diferentes propiedades anatómicas y funcionales según su morfología histológica. En particular, los condrocitos, el componente celular principal del cartílago, son células de crecimiento lento que secretan proteínas de matriz extracelular para formar los diferentes tipos de cartílagos encontrados en el organismo. Dependiendo de la estructura del cartílago, el tejido cartilaginoso aparece histológicamente como cartílago hialino, cartílago elástico o fibrocartílago. Es posible una combinación de estos tejidos en una unidad funcional.

El cartílago hialino representa el tipo más común de cartílago en el organismo y contiene característicamente fibras de colágeno tipo II en su ECM. Normalmente, puede encontrarse cartílago hialino en articulaciones articulares, cartílago costal (costillas), nariz, laringe y placa de crecimiento. Otro tipo de cartílago es el cartílago elástico. Esta clase de cartílago puede encontrarse en el oído, traquea y laringe, es decir, la epiglotis. El tercer tipo de tejido cartilaginoso está presente en la sínfisis, discos intervertebrales, partes de las articulaciones articulares, meniscos y en otras articulaciones, tales como la articulación temporomandibular.

Por supuesto, puede encontrarse una combinación o productos intermedios de estos tipos de cartílago, por ejemplo, el cartílago epifisario en la placa o cartílago de crecimiento.

En muchas enfermedades y trastornos se produce un daño del cartílago. Sin embargo, independientemente de su etiología, los defectos del cartílago, por ejemplo de articulaciones articulares, y su tratamiento siguen siendo uno de los problemas sin resolver en la medicina.

Tal como se mencionó anteriormente, el método más prometedor para el tratamiento de la regeneración del cartílago, por ejemplo de cartílago hialino, es la recogida de células del paciente seguido por el cultivo *in vitro* de estas células para dar un constructo de condrocitos en un sistema de alginato y reimplante de este constructo en el defecto de cartílago del mismo paciente.

Se determina un buen constructo de cartílago mediante condrones dispuestos en un orden funcional en el constructo de cartílago que se derivan de condrocitos.

Los condrocitos se derivan de células mesenquimatosas que tienen un fenotipo característico basado principalmente en el tipo de matriz extracelular que producen. Los condrocitos precursores producen colágeno tipo I pero cuando se dedican a condrocitos presentes en los diversos tipos de cartílago, sintetizan colágeno tipo II. Además dichos condrocitos producen agregado de proteoglicano que tiene glicosaminoglicanos que están sumamente sulfatados. Este estado de los condrocitos que se parecen al aspecto de condrocitos en cartílago nativo también se denomina a veces condrones. Los condrones consisten en al menos un condrocito, que está(n) encapsulado(s) en matriz extracelular, que consiste en al menos colágeno tipo II (tipo IV y diversas proteínas de matriz) y GAG. Dependiendo del tipo de cartílago, los condrones consisten en de 1 a 3 condrocitos en el caso del cartílago elástico o en al menos 2 condrocitos en el caso del cartílago hialino. En particular, los condrones se caracterizan por expresar colágeno tipo II y glucosaminoglicanos (GAG). Además, se sabe que los condrones expresan genes y proteínas específicas de cartílago adicionales tales como colágeno tipo IX, XI, agrecano, sulfato de condroitina, sulfato de queratina y SOX9. En la bibliografía, a

veces se usa el término pseudocondrones. Los pseudocondrones (véase por ejemplo la figura 1) designa condrones que no se han formado en su entorno natural sino que, por ejemplo, se han construido *in vitro* o se han mantenido *ex vivo*.

Puede encontrarse una definición y una revisión de condrones por ejemplo en Bonaventure, J., *et al.* 1994, Exp. Cell Res. 212, 97-104, que se incorpora en el presente documento por referencia.

En el caso de enfermedades de cartílago de articulaciones articulares, hay dos enfermedades principales que afectan al cartílago, concretamente la artrosis y la artritis reumatoide; tanto la artrosis como la artritis reumatoide dan como resultado la degradación y degeneración del cartílago articular. La artrosis es principalmente un trastorno no inflamatorio de articulaciones móviles caracterizado por un desequilibrio entre la síntesis y la degradación del cartílago articular, conduciendo a los cambios patológicos clásicos de desgaste y destrucción del cartílago.

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica autoinmunitaria acompañada por inflamación grave de las articulaciones. En la mayoría de los pacientes la artritis reumatoide comienza con una sensación general de malestar, fatiga, a menudo acompañada por dolor musculoesquelético difuso. Eventualmente la enfermedad evoluciona dando como resultado dolor en movimiento, dolor con la palpación, hinchamiento y deformación de múltiples articulaciones; dado que la artritis reumatoide es una enfermedad sistémica, puede estar acompañada por complicaciones extra-articulares, tales como anemia, vasculitis, escleritis, pleuritis, pericarditis y neuritis periférica.

Además, se produce daño de cartílago y/o del hueso subyacente tras un traumatismo o en cirugía ortopédica. En estos casos es necesaria la regeneración o sustitución del tejido cartilaginoso destruido.

Además, para la reconstrucción del cartílago, por ejemplo, cartílago presente en el oído, nariz, meniscos o discos intervertebrales, es necesario diseñar nuevo material de cartílago o de células precursoras para el desarrollo de cartílago, tales como condrones, *in vitro* y, posteriormente, trasplantar los condrones o el tejido cartilaginoso generados *in vitro* al paciente. Sin embargo, la reconstrucción o el diseño tisular del tejido cartilaginoso requiere actualmente el uso de una estructura principal, células, preferiblemente obtenidas del paciente que va a tratarse, y un cóctel de diversos factores de crecimiento y de diferenciación así como citocinas y/u hormonas. En particular la necesidad de usar un cóctel de diversos factores de crecimiento y de diferenciación hace que este método sea caro.

Sumario de la presente invención

A la vista de los problemas descritos anteriormente, el objeto de la presente invención es mejorar el crecimiento y la regeneración del tejido cartilaginoso.

En particular, la invención se refiere a un método *in vitro* para la generación de condrones y de tejido cartilaginoso que incluye la etapa de cultivar condrocitos que pueden derivarse de células precursoras en concentraciones de Mg extracelulares elevadas de manera no fisiológica. La etapa de cultivo en concentraciones de Mg extracelulares elevadas de manera no fisiológica comprende la etapa de aumentar al menos una vez la concentración de iones Mg en cultivo.

Especialmente, la presente invención se refiere a la generación de condrones y tejido cartilaginoso *in vitro*.

Estos condrones generados *in vitro* también denominados pseudocondrones y el tejido cartilaginoso obtenido de los mismos pueden usarse en el tratamiento de tejido cartilaginoso tras cirugía ortopédica o daño degenerativo y/o tras un traumatismo del cartílago.

En particular, el método se caracteriza por comprender la etapa de aumentar la concentración de Mg extracelular elevada de manera no fisiológica al menos una vez durante el cultivo.

Por tanto, la invención describe entre otras cosas métodos para la generación de tejido cartilaginoso mediante condrones como producto intermedio. Dicho tejido o dichos condrones que se generan *in vitro* pueden usarse para el tratamiento de la artritis reumatoide y artrosis y cambios tras un traumatismo y otros estados que manifiestan degradación del cartílago de las articulaciones, y también incluye las enfermedades destructivas de otros cartílagos, tales como cambios degenerativos y/o cambios tras un traumatismo en los meniscos y/o discos vertebrales y/o en el cartílago de la nariz y/o del oído.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Pseudocondrones tras la recuperación a partir del alginato. Se incubaron condrocitos humanos durante 21 días en alginato. Tras la elución se tiñeron con cloruro de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMMB). Los condrocitos construyen un pseudocondrón y una matriz secretada. Microscopía de contraste de fase, aumento de 100 veces.

Figura 2: Recuentos de células con diferentes concentraciones de magnesio en el sistema de cultivo.

Figura 3: Contenido en matriz y en colágeno tras la fase de diferenciación. Izquierda: contenido en glicosaminoglicano (GAG). Derecha: inmunotransferencia de colágeno tipo II tras la fase de diferenciación. Carriles: 1: marcador para colágeno tipo I (50 ng); 2: marcador para colágeno tipo II (50 ng); 3: control (sin magnesio); 4: disolución de MgSO₄ 5 mM; 5: disolución de MgSO₄ 10 mM; 6: disolución de MgSO₄ 20 mM.

Figura 4: síntesis de matriz con diferentes complementos durante la fase 2 (primer carácter) y cultivo de agregación (segundo carácter). K = magnesio 0 mM (control); IT = IGF-I + TGF- β 1 + IL-4; x Mg = MgSO4 mMol.

Figura 5: síntesis de matriz con diferentes complementos durante la fase 1 (primer carácter), fase 2 (segundo carácter) y cultivo de agregación (tercer carácter). Abreviaturas: K = magnesio 0 mM (Control); Mg = MgSO4 10 mM; F = bFGF; ITIL = IGF-I + TGF- β 1 + IL-4.

Descripción detallada de la invención

Se observa que tal como se usa en el presente documento los siguientes términos tienen los significados tal como se indican a continuación.

Se pretende que la expresión “cultivo de células” tal como se usa en el presente documento signifique que se mantienen las células en condiciones que permiten a las células crecer y/o diferenciarse. Puede realizarse el cultivo de células *in vivo* o *in vitro*. Por tanto, el método reivindicado que comprende la etapa de cultivo de células a concentraciones de Mg extracelulares elevadas de manera no fisiológica puede realizarse *in vivo*, por ejemplo en un entorno natural, en mamíferos distintos de seres humanos o *in vitro*.

Se pretende que el término “generación” tal como se usa en el presente documento signifique la diferenciación así como la proliferación de células o células precursoras.

Se pretende que la expresión “concentración de Mg extracelular elevada de manera no fisiológica” signifique que la concentración del ión Mg en el cultivo es superior al nivel fisiológico normalmente presente en el organismo del que se derivan las células. Por ejemplo, en seres humanos la concentración de Mg extracelular es de aproximadamente 0,9 mMol. Por tanto, concentración elevada de manera no fisiológica significa que la concentración de Mg en el compartimento extracelular es superior a dicha concentración.

Se pretende que la expresión “se aumenta al menos una vez la concentración de Mg” signifique que durante el cultivo *in vivo* o *in vitro* se aumenta adicionalmente la concentración de Mg ya elevada de manera no fisiológica añadiendo Mg adicional al cultivo. La adición puede realizarse *in vivo* administrando un agente que da como resultado un aumento en la concentración de Mg en el compartimento extracelular o *in vitro* añadiendo Mg adicional, por ejemplo en forma de sales, al sistema de cultivo.

El término “agente” significa una composición médica o farmacéutica que contiene como principio activo Mg o derivados de Mg tal como se define en el presente documento. En particular, el agente puede estar en forma de gel, pasta, comprimido, inyección o infusión para aplicarse localmente.

La expresión “tejido cartilaginoso” o “cartílago” tal como se usa en el presente documento significa cualquier tipo de cartílago o tejido que comprende estructuras similares a cartílago. En particular, los términos anteriores abarcan cartílago hialino, cartílago elástico y fibrocartílago y productos intermedios o estructuras mixtas de los mismos.

Se pretende que la expresión “Mg o derivado de Mg” tal como se usa en el presente documento signifique iones magnesio en forma libre o como la sal incluyendo formas complejadas.

El catión magnesio es un mineral esencial para muchos animales, incluyendo mamíferos, y especialmente para los seres humanos. Como tal, el magnesio también es un cofactor en numerosas reacciones enzimáticas. Participa en la transferencia de fosfato desde ADP y ATP, contractilidad muscular, activación de integrina y transmisión neuronal. La mayor parte del magnesio en el cuerpo humano está situado en los huesos en forma de fosfatos y carbonatos, y el resto se encuentra principalmente en el hígado y los músculos; los glóbulos rojos también contienen magnesio. El magnesio inhibe los impulsos nerviosos y relaja las concentraciones musculares, funcionando así de manera antagonista frente al calcio. Por otra parte, al igual que el calcio, el magnesio puede unirse a fosfatos y puede sustituir al calcio como mineral óseo o de dientes.

Por tanto, sólo aproximadamente el 1% del magnesio total presente en el organismo está en el compartimento líquido extracelular, principalmente en el suero. Normalmente la concentración de magnesio en el suero es de aproximadamente 1,8 a 2,2 mg/dl; que corresponde a aproximadamente 0,9 mmol/l.

En el suero sanguíneo, puede encontrarse magnesio principalmente en tres formas diferentes, es decir, magnesio unido a proteína, magnesio complejoado o iones magnesio.

La distribución de magnesio varía con la edad y dentro de diferentes especies. Esto significa por ejemplo que la concentración de magnesio en huesos y meniscos disminuye con la edad.

Se han usado diversos compuestos de magnesio por vías de administración intramuscular, oral e intravenosa. Por ejemplo, se usa acetato de magnesio como fuente de magnesio y como suministro de acetato de bicarbonato en disoluciones de diálisis peritoneal o hemodiálisis; igualmente se usa cloruro de magnesio en disoluciones de diálisis.

Los inventores han encontrado ahora que el cultivo de condrocitos o células precursoras de los mismos a concentraciones de magnesio extracelulares elevadas de manera no fisiológica permite la generación de condrones, un producto intermedio en la regeneración tisular de tejido cartilaginoso. En particular, aumentando adicionalmente la concentración de magnesio extracelular por encima del nivel fisiológico al menos una vez durante el cultivo conduce a condrones que pueden diferenciarse adicionalmente en tejido cartilaginoso.

Por tanto, el aumento regulado de la concentración de magnesio por encima del nivel fisiológico incluyendo al menos una vez la etapa de aumentar adicionalmente la concentración de Mg en el compartimento extracelular aplicando magnesio en forma, por ejemplo, de un agente acelera el crecimiento y/o la regeneración de cartílago en mamíferos.

Preferiblemente, la concentración de magnesio es inicialmente al menos tres veces superior al nivel fisiológico, más preferiblemente cinco veces superior al nivel fisiológico del compartimento respectivo, es decir, el compartimento extracelular del cartílago o, cuando se usa en el diseño tisular, del medio de cultivo celular. Preferiblemente, la concentración de Mg está en el intervalo de desde 11 hasta 25 mMol.

Tras aumentar la concentración de magnesio al menos una vez durante el cultivo, la concentración de magnesio está en el intervalo de desde 21 hasta 65 mMol.

La concentración de Mg puede reducirse posteriormente tras haberla aumentado una vez. Esto significa que tras aumentar las concentraciones de Mg una vez durante el cultivo celular y formar condrones, puede reducirse la concentración de Mg por ejemplo a niveles fisiológicos o incluso por debajo de niveles extracelulares fisiológicos.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método de usar magnesio o derivados de magnesio tal como se define en el presente documento para promover fases específicas de maduración de condrocitos y/o cartílago. Por tanto, mediante una aplicación con tiempo controlado puede regularse la osteogénesis y la condrogénesis del tejido óseo y cartilaginoso en regeneración con el fin de optimizar la estructura recién formada del cartílago.

En una realización adicional, el sustrato o agente que contiene Mg o derivados de Mg permite una liberación regulada de manera diferente de cantidades predeterminadas de Mg en el entorno. Por tanto, pueden promoverse o suprimirse fases específicas de desarrollo de cartílago.

Además, la presente invención permite el control del crecimiento y el desarrollo de cartílago artificial, por ejemplo para el uso como entramado para órganos. Estos órganos artificiales pueden usarse en la sustitución del oído externo, válvula, nariz o discos intervertebrales o para la sustitución de meniscos o articulaciones articulares.

En otra realización, se usan Mg o derivados de Mg en diseño tisular *in vitro* de tejido cartilaginoso. En la técnica se conocen métodos para la generación de tejido cartilaginoso mediante diseño tisular.

Sin embargo, los métodos descritos actualmente en la técnica requieren el uso de cócteles caros de diversos factores de crecimiento o factores de diferenciación junto con los respectivos condrocitos o condroblastos, células del estroma de médula ósea, células sinoviales y diversas células precursoras. El uso de Mg o derivados de Mg tal como se define en el presente documento permite la reducción de otros factores de crecimiento reduciendo así el coste y, adicionalmente, permite una generación controlada y un desarrollo optimizado del cartílago. Sin embargo, el cultivo puede tener lugar en presencia de al menos un factor de crecimiento, citocina y/u hormona. Además, puede estar presente suero de ternero fetal o suero de mamífero tal como suero de ser humano.

El compuesto de magnesio añadido al cultivo es preferiblemente sulfato de magnesio o cloruro de magnesio, pero no se limita a estos compuestos.

Cuando se realiza el cultivo *in vitro* para el diseño tisular de tejido cartilaginoso, la primera parte del cultivo se realiza en sistemas de cultivo tisular tales como un cultivo monocapa, preferiblemente en un medio complementado con FCS. Durante la primera fase de cultivo, la concentración de magnesio está en el intervalo de desde 11 hasta 25 mMol.

En la segunda fase de cultivo, es decir, cuando se aumenta una vez la concentración de magnesio en comparación con la primera fase, se realiza preferiblemente el cultivo como un cultivo de las células incrustadas en alginato y cultivadas en medio complementado con suero de un mamífero. Durante esta segunda fase, la concentración de magnesio está en el intervalo de desde 21 hasta 65 mMol.

Las células que van a cultivarse pueden ser condrocitos o condrocitos diferenciados a partir de células precursoras de condrocitos y/o a partir de células madre mesenquimatosas y/o células madre embrionarias y/o células madre adultas. Preferiblemente, las células son de origen humano.

Además, pueden usarse Mg y derivados de Mg en un método para la preparación de tejido cartilaginoso en terapia génica.

También se abarca el uso de dichos agentes para tratar pacientes que padecen enfermedades, trastornos o daños del cartílago debidos a cirugía, traumatismo, degeneración o como consecuencia de otros tipos de enfermedades. El

Mg o los derivados de Mg pueden administrarse en el, o en la proximidad del, cartílago que va a tratarse, aumentando así la concentración de Mg en el compartimento extracelular hasta concentraciones elevadas de manera no fisiológica. La administración puede ser en forma de composiciones farmacéuticas tales como infusiones, inyecciones o mediante catéter. Alternativamente, puede usarse un sustrato que permite la liberación de Mg o derivados de Mg mediante degradación biológica y/o química y/o física. Cuando se tratan pacientes es necesario aumentar el nivel de magnesio en el compartimento extracelular del cartílago por encima del nivel fisiológico, preferiblemente al menos el 300% por encima de dicho nivel.

Puede conseguirse aumentar adicionalmente la concentración de Mg administrando composiciones farmacéuticas o agentes apropiados.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de los agentes y los condrones y tejido cartilaginoso para tratar o prevenir enfermedades, trastornos o daños del cartílago caracterizado por administrar magnesio en el, o en la proximidad del, cartílago. Además, la presente invención se refiere a dicho uso en métodos para hacer crecer o regenerar tejido cartilaginoso caracterizado por aumentar la concentración de magnesio en el tejido cartilaginoso por encima del nivel fisiológico en el que dicha concentración de magnesio se aumenta adicionalmente al menos una vez durante el cultivo. En particular, el método puede comprender administrar el magnesio en forma de un sustrato o un agente.

La administración local de Mg o derivados de Mg tal como se define en el presente documento permite una regeneración y/o crecimiento optimizados de tejido cartilaginoso. En particular mediante una administración oportunamente limitada, por ejemplo usando sustrato degradable que contiene Mg o derivados de Mg, puede acelerarse la regeneración tisular en defectos condrales y/u osteocondrales.

Por tanto, el Mg y los derivados de Mg pueden influir positivamente en la formación de cartílago *in vivo* e *in vitro*.

Por supuesto, pueden combinarse el Mg o los derivados de Mg que están presentes en forma de un sustrato o agente con al menos un compuesto adicional conocido en la técnica para promover el crecimiento y/o la regeneración de tejido cartilaginoso o que se usa en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades, trastornos o daños del cartílago.

Un experto en la técnica conoce la formulación de sustratos y agentes adecuados en forma de composición farmacéutica.

Además, la dosificación del Mg o de los derivados de Mg administrados puede variar dependiendo de las condiciones del individuo, edad, peso corporal, etc. El experto en la técnica sabe cómo proporcionar Mg o derivados de Mg en una cantidad que aumenta el nivel de Mg por encima del nivel fisiológico del compartimento extracelular del cartílago o del medio de cultivo en el caso de diseño tisular.

Por tanto, la presente invención puede usarse para la profilaxis o el tratamiento de defectos o daños condrales u osteocondrales. Además, la presente invención es útil para tratar la ruptura o degeneración de menisco o disco, al igual que hernia discal. Además, la presente invención se refiere al uso de magnesio o derivados de magnesio en enfermedades degenerativas, autoinmunitarias o inflamatorias o traumatismo que conduce a daño de cartílago hialino, elástico y/o fibroelástico. Además, en la presente invención se abarcan enfermedades que provocan trastornos de crecimiento o los propios trastornos de crecimiento, que pueden afectar directa o indirectamente al tejido cartilaginoso de la placa de crecimiento.

El método o uso según la presente invención puede aplicarse a mamíferos, es decir seres humanos y animales.

Alternativamente, el magnesio o los derivados de magnesio tal como se definen en el presente documento son útiles para la preparación de menisco o disco artificiales que van a usarse en la sustitución de menisco o disco, respectivamente. Además, la presente invención es útil en cirugía de ligamentos. Puede encontrarse tejido cartilaginoso por ejemplo en la inserción del ligamento. Por tanto, la cirugía de ligamentos puede abarcar el uso de magnesio o derivados de magnesio para promover la generación de tejido cartilaginoso que está uniéndose al ligamento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran los efectos cuando se usa Mg o derivados de Mg de una manera regulada sobre la regeneración de cartílago. Sin embargo, la invención no se limita a, o está limitada por, los ejemplos.

1. Fase de proliferación

Se sembraron condrocitos humanos en un número de células inicial de 5×10^6 células en frascos de cultivo celular y se cultivaron en DMEM con alto contenido en glucosa + el 10% en volumen de FCS + diferentes concentraciones de disolución de sulfato de magnesio (0, 1, 2, 5 y 10 mM). Se cambió el medio dos veces por semana. Se hicieron pasar las células una vez por semana con el 0,25% en peso de tripsina/EDTA, se contaron y volvieron a sembrarse (véase la figura 2). Se determinó el recuento de células con un contador celular CASY, Schärfe-System GmbH, Alemania.

2. Fase de diferenciación

Se hicieron proliferar condrocitos humanos en DMEM con alto contenido en glucosa + el 10% en volumen de FCS + bFGF 10 ng/ml durante seis pasos. Tras la tripsinación se realizó una etapa de lavado en solución salina tamponada con HEPES (HBS, NaCl 0,15 M/HEPES 25 mM, pH 7,4). Se suspendieron las células en alginato al 1,2% en peso en HBS en una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Se introdujo gota a gota la suspensión celular en frascos de cultivo de vidrio que contenían CaCl₂ 0,1 M/HEPES 25 mM. Tuvo lugar una polimerización inmediata del alginato. Se lavaron las perlas de alginato con HBS tras 30 min.

Después se complementaron las células encapsuladas con DMEM con alto contenido en glucosa + el 10% en volumen de suero humano + 2-fosfato de ácido ascórbico 0,28 mM + cisteína 1 mM + diferentes concentraciones de disolución de sulfato de magnesio (0, 5, 10 y 20 mM) y se cultivaron durante 23 días a 37°C, un 5% de CO₂, un 8% de O₂ y humedad atmosférica del 95% cambiando el medio cada dos días. Después se aislaron las células disolviendo el alginato con tampón de disolución (NaCl 0,15 mM + tri-citrato de sodio 55 mM + HEPES 25 mM) a 37°C en un baño de agua con agitación durante de 20 a 25 min. En la figura 3 se muestra un análisis de la cantidad de sulfato de condroitina y el contenido en colágeno II.

3. Condrogénesis tras complementar con magnesio en la fase 1 y/o 2

a) Se trataron condrocitos tal como en el ejemplo 2. Tras recuperarlos del alginato se centrifugaron para dar sedimentos de agregación de 5×10^5 células. Se cultivaron en DMEM con alto contenido en glucosa + el 10% en peso de suero humano + 2-fosfato de ácido ascórbico 0,28 mM + cisteína 1 mM + factor de crecimiento similar a insulina I 100 ng/ml + factor de crecimiento transformante β 1 20 ng/ml e interleucina 4 10 ng/ml durante tres semanas a 37°C, un 5% de CO₂, un 19% de O₂ y humedad atmosférica del 95% cambiando el medio cada dos días. Se realizó el cultivo en placas de 12 pocillos recubiertas con agarosa (el 1% en peso de agarosa en agua destilada) con 3 ml de medio (véase la figura 4).

b) Se hicieron proliferar condrocitos tal como en el ejemplo 1 sin magnesio o con magnesio 5 mM o bFGF. Se diferenciaron tal como en el ejemplo 2 con magnesio 10 mM. Después se cultivaron tal como en el ejemplo 3 a). Véase la figura 5.

Se realizó la determinación de la cantidad de sulfato de condroitina mediante un método conocido con ayuda de cloruro de azul de 1,9-dimetilmetileno y se midió mediante medición fluorométrica a una extinción de 530 nm.

REIVINDICACIONES

1. Método para la generación *in vitro* de condrones que comprende la etapa de:

5 cultivar células en un medio que tiene concentraciones de magnesio (Mg) extracelulares elevadas de manera no fisiológica,

10 **caracterizado** porque al menos una vez durante el cultivo celular se aumenta la concentración de Mg extracelular elevada de manera no fisiológica.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho magnesio es una disolución de sulfato de magnesio o cloruro de magnesio.

15 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas concentraciones extracelulares de dicha disolución de magnesio oscilan desde aproximadamente 12 mMol hasta aproximadamente 65 mMol.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo de las células se ve afectado adicionalmente en presencia de suero de ternero fetal (FCS) o suero de mamífero.

20 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo de las células se ve afectado adicionalmente en presencia de al menos un factor de crecimiento y/o citocina y/u hormona.

25 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se cultivan condrocitos aislados de tejido de un mamífero.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se cultivan condrocitos diferenciados a partir de células precursoras de condrocitos y/o a partir de células madre mesenquimatosas y/o células madre embrionarias y/o células madre adultas.

30 8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que los condrocitos son de origen mamífero.

9. Método según la reivindicación 8, en el que los condrocitos son de origen humano.

35 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células, preferiblemente condrocitos, se siembran en frascos de cultivo tisular y se cultivan en cultivo monocapa con medio complementado con FCS y la concentración de magnesio está inicialmente en el intervalo de 11 a 25 mMol.

40 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cuando se aumenta la concentración de Mg se incrustan las células en alginato y se cultivan en medio complementado con suero de dicho mamífero, se aumenta la concentración de magnesio hasta un intervalo de 21 a 65 mMol.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el cultivo se realiza a una presión parcial de oxígeno del 8%.

45 13. Método para la preparación de tejido cartilaginoso que comprende el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Uso de los condrones obtenidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de tejido cartilaginoso.

50 15. Tejido cartilaginoso obtenido según un método según la reivindicación 13.

55 16. Uso de Mg y derivados de Mg y condrones generados *in vitro* mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un medicamento para tratar pacientes que padecen enfermedades, trastornos o daños del cartílago debidos a cirugía, traumatismo, degeneración o como consecuencia de otros tipos de enfermedades mediante el cual la concentración de magnesio extracelular se aumenta a un nivel extracelular elevado de manera no fisiológica y dicha concentración de Mg extracelular elevada de manera no fisiológica se aumenta adicionalmente al menos una vez durante el tratamiento.

60 17. Uso según la reivindicación 6, en el que dicho magnesio es una disolución de sulfato de magnesio o cloruro de magnesio.

18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, en el que dichas concentraciones extracelulares de dicha disolución de magnesio oscilan desde aproximadamente 12 mMol hasta aproximadamente 65 mMol.

65 19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el medicamento contiene adicionalmente al menos un factor de crecimiento y/o citocina mencionada y/u hormona.

ES 2 321 001 T3

20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el magnesio está adaptado para administrarse en forma de un sustrato o un agente.

5 21. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que el medicamento está adaptado para administrarse en el, o en la proximidad del, cartílago que va a tratarse.

10 22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que la enfermedad del cartílago es una cualquiera de defectos o daños condrales u osteocondrales, la ruptura o degeneración del menisco o del disco, en enfermedad degenerativa, autoinmunitaria o inflamatoria o traumatismo que conduce a daño del cartílago hialino, elástico y/o fibroelástico.

15 23. Uso de condrones obtenidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de tejido cartilaginoso según la reivindicación 15, para la preparación de un medicamento para tratar pacientes que padecen enfermedades, trastornos o daños del cartílago debidos a cirugía, traumatismo, degeneración o como consecuencia de otros tipos de enfermedades mediante el cual la concentración de magnesio extracelular se aumenta a un nivel extracelular elevado de manera no fisiológica y dicha concentración de Mg extracelular elevada de manera no fisiológica se aumenta adicionalmente al menos una vez durante el tratamiento.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

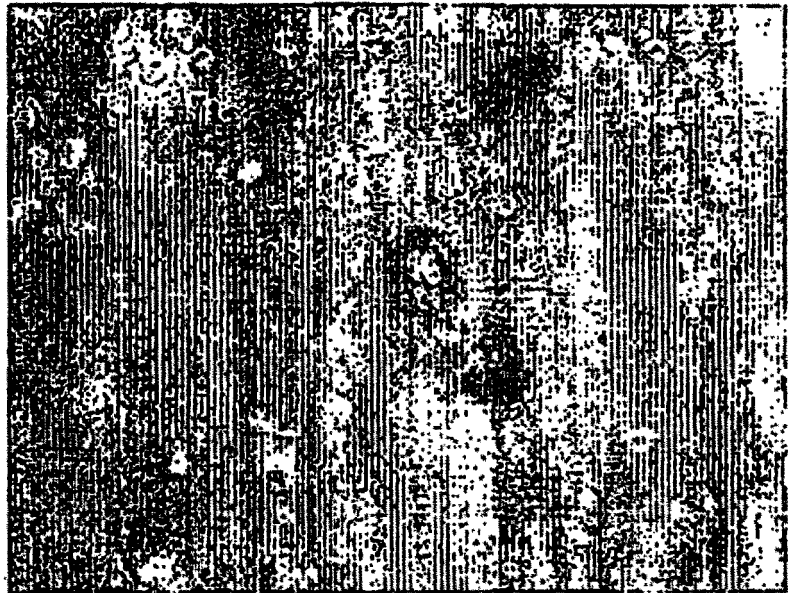


Figura 1

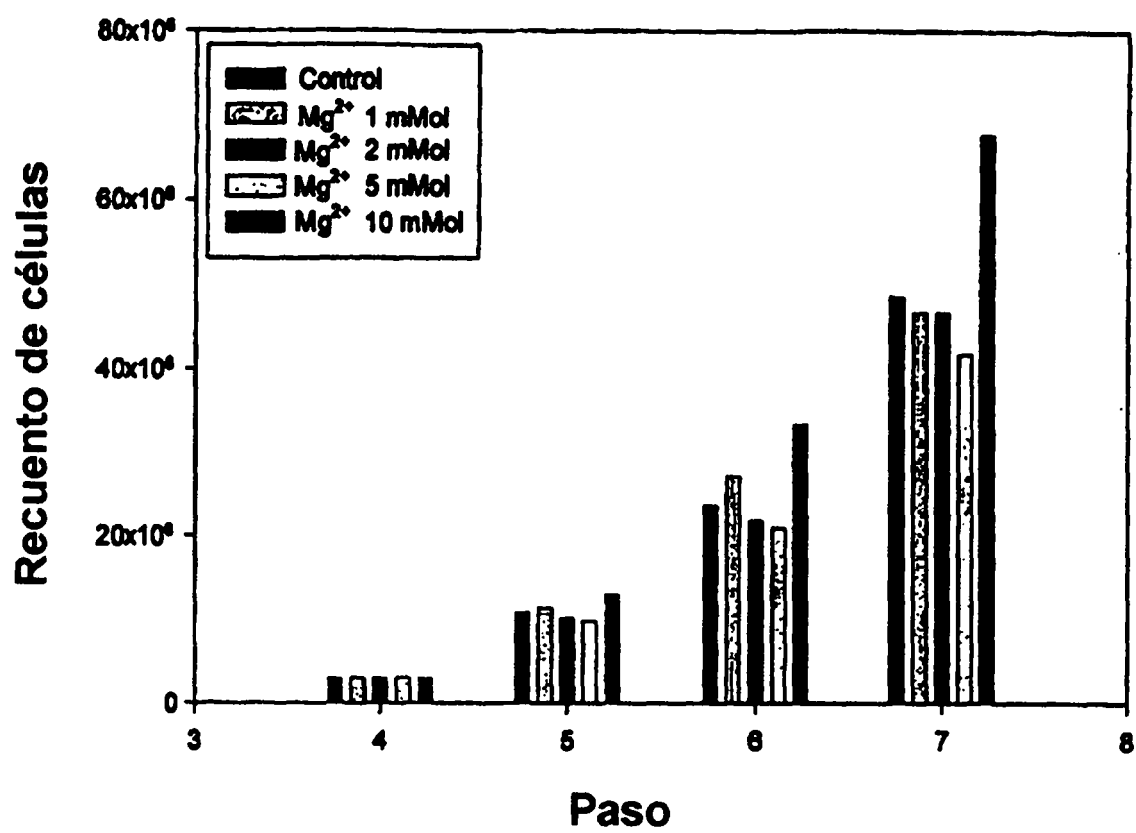


Figura 2

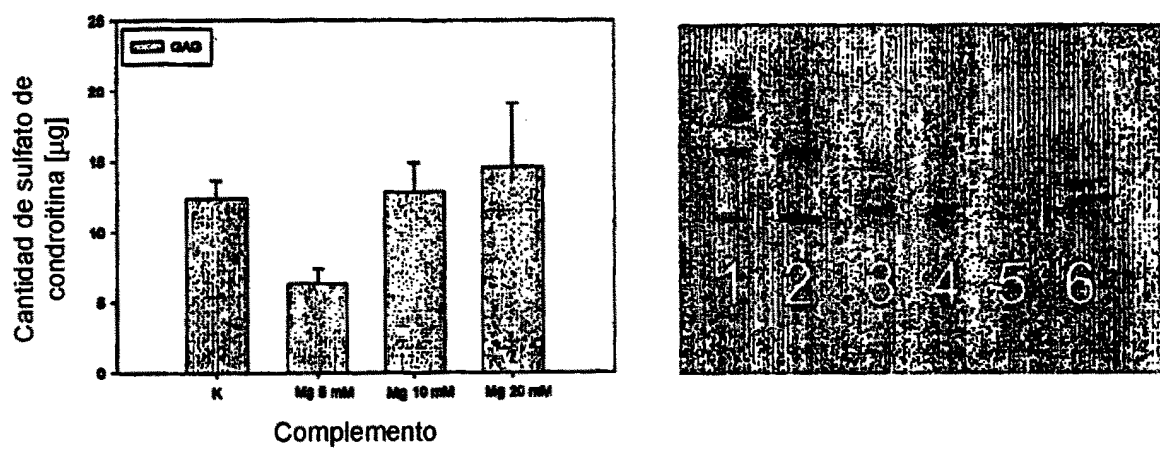


Figura 3

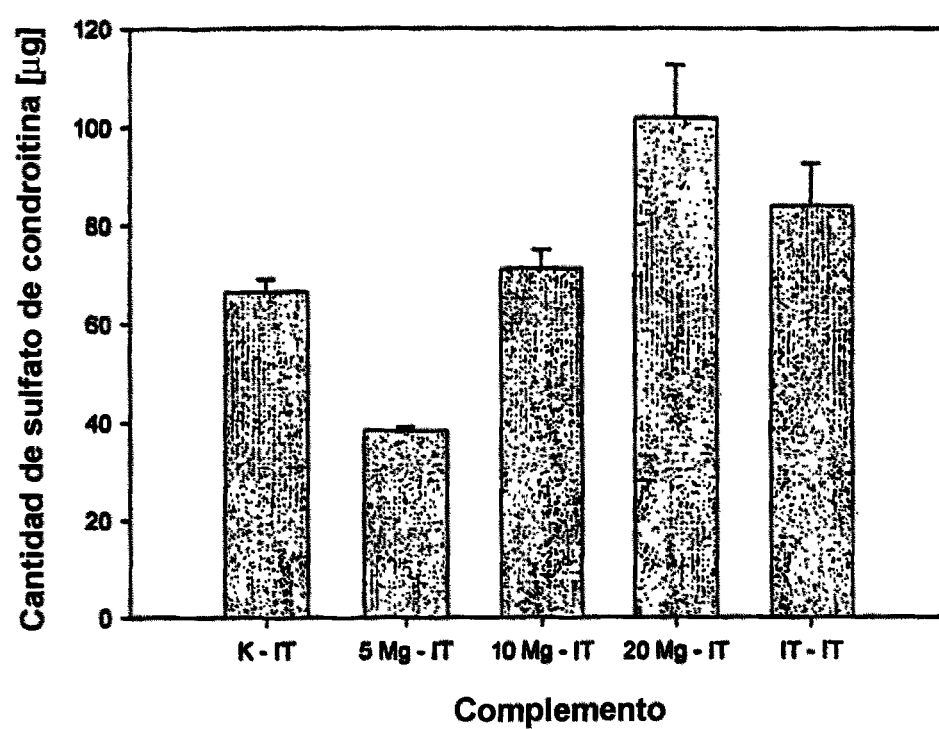


Figura 4

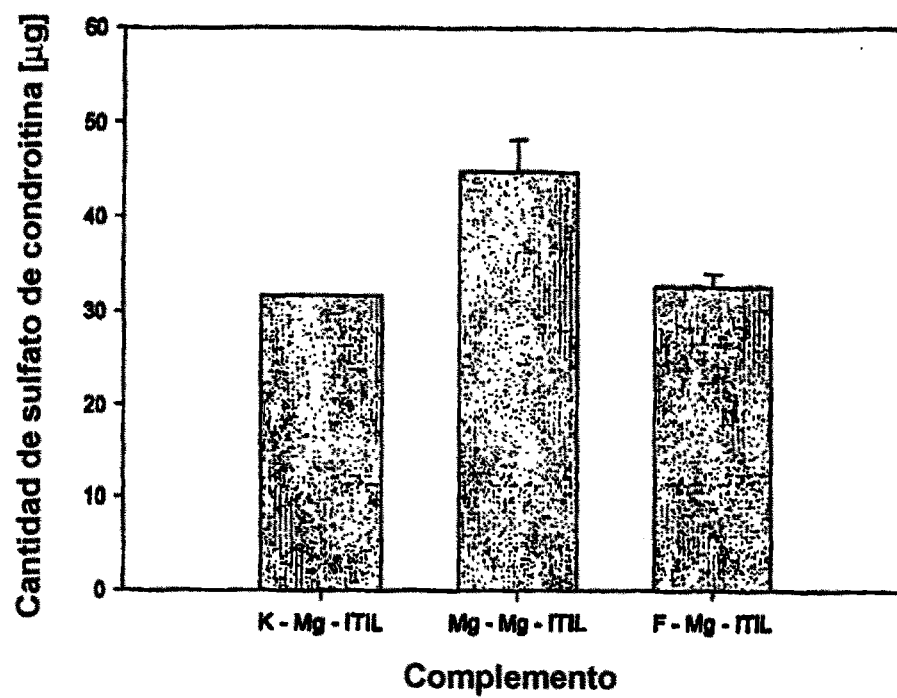


Figura 5