

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 558**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014** **PCT/US2014/042322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014** **WO14204806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014** **E 14813201 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021** **EP 3011015**

54 Título: **Adipocitos para aplicaciones de condrocitos**

30 Prioridad:

19.06.2013 US 201361836975 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.10.2021

73 Titular/es:

SPINALCYTE, LLC (100.0%)
17300 El Camino Real, Suite 110
Houston, TX 77058, US

72 Inventor/es:

O'HEERON, PETE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 870 558 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

Adipocitos para aplicaciones de condrocitos

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad respecto a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º de Serie 61/836.975, presentada el 19 de junio de 2013.

Campo técnico

- 10 El campo de la presente divulgación incluye al menos los campos de la medicina, la cirugía, la anatomía, la biología, la biología celular y/o la biología molecular. En determinadas realizaciones, el campo de la divulgación se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de afecciones médicas asociadas con una parte (o partes) del cuerpo o tejidos que necesitan cartílago o condrocitos, por ejemplo.

15 Antecedentes

- El cartílago es un tejido conjuntivo flexible ubicado en mamíferos en una diversidad de ubicaciones, incluyendo al menos en las articulaciones entre los huesos, la jaula torácica, la oreja, la nariz, los bronquios y los discos intervertebrales; es un material rígido con menos flexibilidad que el músculo. El cartílago crece y se repara a un ritmo más lento que otros tejidos conjuntivos, dado que el cartílago no contiene vasos sanguíneos; en cambio, los condrocitos se suministran por difusión, ayudado por la acción de bombeo generada por la compresión del cartílago articular o la flexión del cartílago elástico. Adicionalmente, los condrocitos están unidos en lagunas y no pueden migrar a las zonas dañadas, por lo que el daño del cartílago es difícil de curar. La presente divulgación proporciona al menos soluciones para las necesidades en la técnica de la reparación de cartílago.

25 Sumario

- La presente divulgación está dirigida a sistemas, métodos y composiciones para el tratamiento de un individuo que lo necesite, incluyendo el tratamiento de un individuo que necesite reparación de cartílago, incluida la reparación del cartílago elástico, el cartílago hialino o el fibrocartílago, por ejemplo. La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para la reparación biológica de cualquier tipo de cartílago, incluyendo el cartílago intervertebral y articular, por ejemplo. En aspectos particulares, la presente divulgación se refiere a los campos de la reparación de cartílago, tal como la reparación de cartílago articular. Más particularmente, las realizaciones de la divulgación incluyen métodos para el crecimiento, proliferación y/o diferenciación de células en células de tipo condrocito bajo tensión mecánica (*mechanical stress*), que incluye hacerlo *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

- La presente divulgación está dirigida a métodos y composiciones para la ingeniería del cartílago, para generar cartílago para un individuo que lo necesite. En realizaciones específicas, la divulgación se refiere a células y tejidos para el tratamiento de deficiencias de cartílago. Es un objeto ilustrativo de la presente divulgación proporcionar métodos para reparar y/o regenerar cartílago. Los métodos de la presente divulgación generan cartílago de cualquier tipo, incluyendo cartílago elástico, cartílago hialino y/o fibrocartílago, que difieren en las cantidades relativas de sus componentes principales.

- La presente invención se refiere a métodos y composiciones relacionados con el uso de adipocitos bajo deformación mecánica (*mechanical strain*) para diferenciarse a células de tipo condrocito. En determinados aspectos, la divulgación genera tejido natural *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, tal como a partir de adipocitos, por ejemplo. Más particularmente, pero no exclusivamente, la presente divulgación se refiere a un método para el crecimiento y la diferenciación de adipocitos de mamífero (tales como humanos) en células de tipo condrocito, por ejemplo. En determinadas realizaciones las células pueden ser autólogas o alogénicas o una mezcla de las mismas.

- En realizaciones específicas, la divulgación emplea la diferenciación de determinadas células en células de tipo condrocito. En realizaciones específicas, los adipocitos, por ejemplo, se diferencian en células de tipo condrocito en condiciones particulares. La diferenciación de adipocitos en condrocitos o células de tipo condrocito puede producirse de cualquier manera adecuada, incluyendo la diferenciación *in vivo* tras la implantación de las células o la diferenciación *in vitro* o *ex vivo* antes de la implantación. Las células diferenciadas pueden suministrarse a un individuo como células o como tejido generado a partir de las células, o una mezcla de los mismos.

- En realizaciones específicas, la divulgación proporciona un método para la regeneración *in vivo* de una articulación, tal como un disco intervertebral, codo, rodilla, hombro, cadera, articulación temporomandibular, etcétera. En algunas realizaciones se puede generar tejido cartilaginoso para una nariz u oreja.

- En determinadas realizaciones, el cartílago que es el centro de interés de la solicitud de la divulgación es el cartílago del disco intervertebral. En aspectos particulares de la divulgación, las células utilizadas en la divulgación se someten a deformación mecánica *in vivo* y a otras condiciones encontradas en el disco intervertebral para la diferenciación condrogénica.

En un objeto de la presente divulgación, se proporciona un método para la reparación de un disco intervertebral degenerado, por ejemplo, reconstituir la anatomía del disco intervertebral y mejorar su funcionamiento. En aspectos particulares de la divulgación, se proporciona un método para reparar uno o más discos dañados. En una realización de la divulgación, hay un método de reparación de cartílago dañado en una articulación (tal como un disco intervertebral) de un individuo, que comprende el suministro de adipocitos en conformidad con la descripción a la articulación respectiva (tal como disco intervertebral) del individuo. En realizaciones específicas de la divulgación, los adipocitos (o adipocitos diferenciados a células de tipo condrocito *in vitro* y/o *ex vivo*) se suministran al disco intervertebral en ausencia de la retirada de parte o de todo el disco degenerado. Bajo tensión mecánica, las células proporcionadas adquirirán las características de las células del núcleo en la parte central y de las células del anillo en la periferia, por ejemplo.

Las realizaciones de la divulgación incluyen métodos para el crecimiento, proliferación y/o diferenciación de células en células de tipo condrocito bajo tensión mecánica u otras condiciones encontradas en el espacio del disco intervertebral para la producción de cartílago *ex vivo* que luego se coloca *in vivo* en un individuo. En aspectos particulares de la divulgación, las células utilizadas en la divulgación están sujetas a deformación mecánica, bajo oxígeno (por ejemplo, <5 %), o ambos, para la diferenciación condrogénica. En algunas realizaciones, hay un método de diferenciación de adipocitos humanos en células de tipo condrocito *ex vivo*.

En determinados aspectos de la divulgación, las células se diferencian en condrocitos o células de tipo condrocito, tales como en donde los condrocitos o células de tipo condrocito secretan una molécula seleccionada del grupo que consiste en agregano, colágeno de tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión de cartílago (*cartilage link protein*), perlecano y combinaciones de los mismos. En casos particulares, las células se diferencian a partir de adipocitos, y los adipocitos de ejemplo incluyen adipocitos blancos o adipocitos marrones.

En realizaciones específicas, se proporcionan factores de crecimiento a las células antes, durante o después del suministro de células o tejidos a partir de ellas, *in vivo* al individuo que lo necesite, incluyendo factores de crecimiento tales como la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), BMP-4, BMP-6, BMP-7, proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento insulínico uno (IGF-I), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), FGF-2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y una mezcla de los mismos; en realizaciones alternativas, no se proporcionan estos u otros factores de crecimiento a las células antes, durante o después del suministro de células o tejidos a partir de ellas, *in vivo* al individuo que lo necesite.

En algunas realizaciones de la divulgación, hay métodos y composiciones relacionados con el suministro de adipocitos y/o adipocitos rediferenciados a un sitio *in vivo* en un individuo que lo necesite. En realizaciones específicas, el sitio es *in vivo* y necesita condrocitos, incluso necesita cartílago. Por ejemplo, un sitio que necesita condrocitos incluye articulaciones, por ejemplo, articulaciones cartilaginosas (por ejemplo, vértebras). En algunas realizaciones, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se obtienen del individuo que necesita cartílago. En realizaciones específicas, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se suministran a al menos un disco intervertebral de un individuo. En algunos casos, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se manipulan después de haberlos obtenido, se obtengan o no del individuo que los necesita, o se obtengan o no de un tercero o comercialmente, por ejemplo. Los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados pueden expandirse en cultivo. En determinadas realizaciones, a los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados no se les proporcionan factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, antes o durante, o después de la implantación en una vértebra.

En algunas realizaciones, en el disco hay tanto adipocitos y/o adipocitos rediferenciados como células condrocíticas. En algunas realizaciones, no todos los adipocitos y/o adipocitos rediferenciados que se suministran *in vivo* se diferenciarán a condrocitos en el disco, sin embargo, los tejidos que se producen en el disco son útiles para mejorar la altura del disco y la función biomecánica.

En algunas realizaciones, hay un método de diferenciación de adipocitos y/o adipocitos rediferenciados humanos en células de tipo condrocito *in vivo*, que comprende la etapa de suministrar adipocitos y/o adipocitos rediferenciados a una articulación de un individuo, en donde antes de suministrar los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados, no se someten a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos; en realizaciones alternativas, sin embargo, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se someten a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos. En casos específicos, el individuo tiene discopatía. En algunos casos, la articulación es un disco intervertebral.

En algunas realizaciones, algunos de los adipocitos indiferenciados y las células de tipo condrocito diferenciadas en el disco se definen además como células que producen moléculas de la matriz fibrosa, moléculas de la matriz cartilaginosa, o ambas. En determinados aspectos, las células de tipo condrocito se definen además como células que producen moléculas de la matriz, tales como colágeno I, colágeno II, proteoglicano o una combinación de los mismos. En realizaciones específicas, el colágeno comprende colágeno de tipo I y tipo II. En algunos casos, uno de los proteoglicanos son agreganos.

En casos particulares, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se suministran entre los discos intervertebrales. En determinados casos, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se suministran entre o en el núcleo pulposo y las fisuras en el anillo fibroso interno.

5 Algunos aspectos de los métodos de la divulgación incluyen la obtención de adipocitos del individuo o de otro lugar. La obtención puede abarcar la extracción de adipocitos de un cuerpo o puede abarcar la recuperación de adipocitos ya obtenidos, tal como de un tercero, incluyendo comercialmente, o del almacenamiento, por ejemplo. Cuando los adipocitos se extraen de un cuerpo, puede ser de los muslos, las caderas, las nalgas, el abdomen, la cintura, el brazo, la espalda, la rodilla interna, la zona del pecho, las mejillas, la barbilla, el cuello, las pantorrillas y/o los tobillos.

10 En determinados aspectos, los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados se expanden, por ejemplo, durante al menos un día. En algunos casos, los adipocitos obtenidos se pasan, por ejemplo, más de una vez. En aspectos particulares, los adipocitos se expanden y se pasan.

15 En algunas realizaciones, hay un método de producción de tejido condrocítico en una articulación de un individuo, que comprende la etapa de suministrar adipocitos y/o adipocitos rediferenciados a la articulación, en donde los adipocitos y/o los adipocitos rediferenciados no se han expuesto a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, *in vitro* antes o durante, o después, del suministro a la articulación, aunque en realizaciones alternativas, las células se exponen a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, *in vitro* antes o durante, o después, del suministro a la articulación. En realizaciones específicas, el tejido condrocítico comprende células que tienen marcadores bioquímicos particulares, tales como colágeno de tipo I y tipo II y/o varios proteoglucanos encontrados en el tejido cartilaginoso y otros, por ejemplo.

25 En determinadas realizaciones de la divulgación, la presencia de los adipocitos y/o de los adipocitos rediferenciados, y/o la muerte de adipocitos y/o de adipocitos rediferenciados antes y/o después del suministro a la articulación del individuo desencadena la respuesta de una o más células. En casos específicos, la presencia de los adipocitos y/o de los adipocitos rediferenciados, y/o la muerte de adipocitos y/o de adipocitos rediferenciados desencadena la respuesta de otras células en la articulación, y las otras células pueden ser de cualquier tipo, incluidas las células endógenas del individuo, tales como condrocitos, fibroblastos, adipocitos, células madre del disco, etc. En aspectos particulares, la respuesta celular endógena incluye la estimulación del crecimiento, por ejemplo, ya que al menos algunos adipocitos y/o adipocitos rediferenciados mueren en la articulación. Por tanto, en realizaciones específicas, la mera presencia de los adipocitos y/o de los adipocitos rediferenciados, y/o la liberación de factores intracelulares tras la muerte de las células puede estimular una respuesta de crecimiento celular de las células existentes en el disco. En casos particulares, la respuesta de crecimiento celular da como resultado un recrecimiento del disco (o reparación de la articulación).

30 En realizaciones particulares de la divulgación, como resultado indirecto o directo del suministro de los adipocitos y/o de los adipocitos rediferenciados a la articulación, puede formarse tejido cicatricial en la articulación. En al menos casos específicos, tal formación de tejido cicatricial es beneficiosa para la articulación, por ejemplo, cuando la articulación es un disco, al proporcionar estabilidad, resistencia, amortiguación, sellado de una fisura (o fisuras) anular, etcétera.

40 Por tanto, en determinados aspectos, la divulgación genera tejido natural *ex vivo*, tal como a partir de adipocitos, por ejemplo. Más particularmente, pero no exclusivamente, la presente divulgación se refiere a un método para el crecimiento y la diferenciación de adipocitos humanos en células de tipo condrocito (o células que funcionan con la misma capacidad que los condrocitos), por ejemplo. Las células pueden ser autólogas o alogénicas o una mezcla de las mismas, en determinadas realizaciones.

50 En realizaciones específicas, la divulgación emplea la diferenciación de determinadas células en células de tipo condrocito o células que funcionan con la misma capacidad que los condrocitos. En realizaciones específicas, los adipocitos humanos, por ejemplo, se diferencian en condiciones particulares en células de tipo condrocito. La diferenciación de las células en condrocitos o células de tipo condrocito puede producirse de cualquier manera adecuada, incluso *ex vivo* después de la obtención de adipocitos, tal como comercialmente o a partir de un individuo vivo o un banco de células o tejidos. Se pueden recoger adipocitos de ejemplo de una biopsia o liposucción, por ejemplo. En algunas realizaciones, los adipocitos se obtienen del individuo que necesita cartílago.

60 En algunas realizaciones de la divulgación, el tejido cartilaginoso se genera a partir de adipocitos. Pueden obtenerse imágenes del cartílago en un individuo que necesite reparación de cartílago o que se sospeche que necesita reparación de cartílago. El cartílago no absorbe los rayos X en condiciones normales condiciones *in vivo*, pero se puede inyectar un colorante en la diartrosis, lo que hará que el colorante absorba los rayos X. El vacío resultante en la película radiográfica entre el hueso y el menisco representa el cartílago. Otro medio para obtener imágenes del cartílago es mediante resonancia magnética nuclear (RMN). En realizaciones de la divulgación, se toma una imagen de parte de un individuo para facilitar la generación de tejido cartilaginoso de una forma deseada. En al menos realizaciones específicas, la imagen es tridimensional. La obtención de imágenes puede ser de cualquier tipo siempre que sea adecuada para permitir la generación de una forma de cartílago deseada. En realizaciones

específicas, uno podría emplear obtención de imágenes, tal como resonancia magnética nuclear o tomografía computarizada (TAC), de cartílago en una ubicación del cuerpo que se desea reparar o de la que se desea obtener imágenes para facilitar la reparación. Por ejemplo, en los casos en que sea necesario reparar una oreja o una rodilla, se podría tomar una imagen de una oreja o rodilla sana respectiva y producir una imagen (una imagen especular, en el caso de la oreja) del tejido cartilaginoso deseado de la misma.

Un individuo que necesite reparación de cartílago puede ser de cualquier tipo siempre que exista en el individuo una deficiencia detectable en el tejido del cartílago de cualquier tipo. En realizaciones específicas, la deficiencia de cartílago comprende la pérdida de cartílago. Un individuo que necesite reparación de cartílago puede necesitarla debido a una lesión, enfermedad, defecto congénito, exposición ambiental a productos químicos, un deseo de cirugía plástica cosmética, cirugía plástica excesiva y/o deficiente, los efectos de la obesidad, un traumatismo repentino, un traumatismo reiterado, degeneración provocada por el desgaste normal, el resultado de una displasia de cadera, el uso excesivo de fármacos, reacciones alérgicas, o una combinación de los mismos. En los casos en que haya lesión, la lesión puede ser de cualquier tipo, incluso originada en el combate, una pelea, deportes, el ejercicio y/o la inmovilidad durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo. Si la necesidad es el resultado de una enfermedad, la enfermedad puede ser de cualquier tipo, incluyendo genética, la artrosis, la acondrogénesis, la policondritis recidivante, etcétera. El defecto congénito puede ser de cualquier tipo, tal como microtia (incluida la anotia), por ejemplo. Un individuo que lo necesite puede tener la nariz rota.

En determinados aspectos de la divulgación, las células se diferencian en condrocitos o células de tipo condrocito, tales como en donde los condrocitos o células de tipo condrocito secretan una molécula seleccionada del grupo que consiste en agregano, colágeno de tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión de cartílago, perlecano y combinaciones de los mismos. En casos particulares, las células se diferencian a partir de adipocitos.

En realizaciones específicas, no se proporcionan factores de crecimiento a los adipocitos, incluyendo factores de crecimiento tales como la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), BMP-4, BMP-6, BMP-7, proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento insulínico uno (IGF-I), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), FGF-2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y una combinación de los mismos. Sin embargo, en realizaciones alternativas, en los métodos de la divulgación se emplean factores de crecimiento, tales como los proporcionado a los adipocitos, condrocitos y/o el tejido cartilaginoso, incluyendo BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, CDMP, TGF- β , IGF-I, los FGF, bFGF, FGF-2, PDGF, y una combinación de los mismos. Pueden emplearse otros factores de crecimiento.

En algunas realizaciones de la divulgación, hay métodos y composiciones relacionados con el suministro de cartílago a un sitio *in vivo* en un individuo que lo necesite, en donde el cartílago se generó con un método de la divulgación. En realizaciones específicas, el sitio de suministro es *in vivo* y necesita condrocitos, incluso necesita cartílago. Por ejemplo, un sitio que necesita condrocitos incluye una oreja, nariz, rodilla, hombro, codo, y cualquier otra zona del cuerpo en que el tejido conjuntivo esté presente o sea necesario. En algunos casos, el cartílago es para una articulación, mientras que, en otros casos, el cartílago no es para una articulación.

En algunas realizaciones, los adipocitos se obtienen del individuo que necesita cartílago. En realizaciones específicas, los condrocitos resultantes generados a partir de adipocitos se suministran en al menos una ubicación en un individuo. En algunos casos, los adipocitos se manipulan después de su obtención, se obtengan o no del individuo que los necesita, o se obtengan o no de un tercero o comercialmente, por ejemplo. Los adipocitos pueden expandirse en cultivo. En determinadas realizaciones, a los adipocitos no se les proporcionan factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, antes o durante, o después de la implantación en el individuo, aunque en realizaciones alternativas a los adipocitos se les proporcionan factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, antes o durante, o después de la implantación en el individuo.

Aunque el cartílago puede almacenarse en condiciones adecuadas para el individuo del que se obtuvieron los adipocitos, en algunos casos, el cartílago se almacena en condiciones adecuadas para un individuo del que no se obtuvieron los adipocitos. El experto en la materia reconoce que en situaciones en las que el individuo al que finalmente se suministra el cartílago no es el mismo individuo del que se obtuvieron los adipocitos originales, pueden adoptarse una o más etapas para prevenir el rechazo de tejido por parte del cuerpo hospedador.

En algunas realizaciones, en el cartílago hay tanto adipocitos como células condrocíticas. En algunas realizaciones, el tejido cartilaginoso se genera *ex vivo*, pero aún conserva una o más adipocitos. Dicho tejido aún puede suministrarse *in vivo*.

Por tanto, en realizaciones específicas, se podría generar una RMN o TAC de alta definición/resolución u otras imágenes de modalidad de diagnóstico por la imagen del cartílago de la rodilla, hombro, codo, nariz, oreja, etc. En algunas realizaciones, la imagen por RMN se utilizaría para generar un molde tridimensional de la forma del cartílago deseado. En algunas realizaciones, el molde se siembra con adipocitos humanos de acuerdo con la presente divulgación. Por tanto, el molde se somete a condiciones que facilitan la generación de condrocitos a partir de

adipocitos y, en realizaciones específicas, las condiciones comprenden bajo oxígeno, tensión mecánica, o cualquier otra condición (o condiciones) atmosférica o biológica que pueda optimizar la diferenciación de los adipocitos en condrocitos o células de tipo condrocito, o una combinación de los mismos. En realizaciones específicas, los adipocitos que se van a diferenciar a condrocitos se exponen a una cámara que proporciona las condiciones adecuadas para la diferenciación de condrocitos. Dentro de este entorno, puede producirse la diferenciación de condrocitos a partir de los adipocitos y producirse el tejido cartilaginoso en el molde. Una vez que se genera el tejido, puede colocarse en el cuerpo en la ubicación apropiada. En realizaciones específicas, se emplea al menos un soporte para sustentar el cartílago; en realizaciones específicas, el soporte es reabsorbible, aunque en algunos casos el soporte no es reabsorbible y es permanente de forma eficaz para el individuo. En algunos casos, para sustentar el cartílago se emplea titanio, polímero u otro material.

En determinados aspectos de la divulgación, a un individuo se le proporciona otra terapia además de los métodos de la divulgación. Por ejemplo, antes, durante y/o después del suministro de los adipocitos, el individuo puede recibir uno o más antibióticos. Las terapias postoperatorias ilustrativas incluyen antiinflamatorios no esteroideos (los AINE), analgésicos simples (analgésicos) y/o relajantes musculares según sea necesario, y puede ir seguido de una rehabilitación funcional de forma postoperatoria, tal como después de la primera, segunda, tercera o más semanas postoperatorias, por ejemplo. En realizaciones específicas, se le puede proporcionar al individuo uno o más de un antibiótico, un agente antifúngico o un agente antivírico.

En determinados aspectos de la divulgación, a un individuo se le proporciona otra terapia además de los métodos de la divulgación. Por ejemplo, antes, durante y/o después del suministro de los adipocitos o adipocitos rediferenciados, el individuo puede recibir uno o más fármacos, tales como antibióticos, analgésicos, etc. Las terapias postoperatorias ilustrativas incluyen antiinflamatorios no esteroideos (los AINE), analgésicos simples (analgésicos) y/o relajantes musculares según sea necesario, y puede ir seguido de una rehabilitación funcional de forma postoperatoria, tal como después de la primera, segunda, tercera o más semanas postoperatorias, por ejemplo. En realizaciones específicas, se le puede proporcionar al individuo uno o más de un antibiótico, un agente antifúngico o un agente antivírico.

En una realización adicional, hay un kit que comprende adipocitos que se alojan en uno o más recipientes adecuados. En realizaciones específicas, el kit comprende además uno o más reactivos adecuados para potenciar la diferenciación *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* de adipocitos a condrocitos o células de tipo condrocito. En algunas realizaciones, el kit de la divulgación incluye uno o más aparatos para el suministro de tejido o células (incluido tejido cartilaginoso) a un individuo. En algunos casos, el kit comprende uno o más soportes para la estabilización del cartílago tras el suministro *in vivo* del cartílago generado *ex vivo*.

En algunas realizaciones de la divulgación, hay un método de inducción de la desdiferenciación de adipocitos a células de tipo condrocito, que comprende la etapa de someter a los adipocitos a deformación mecánica. En realizaciones específicas, la etapa de sometimiento se produce *in vitro* o *ex vivo*, o *in vivo*, o una combinación de los mismos. En determinados casos, la deformación mecánica comprende una baja presión de oxígeno, presión hidrostática intermitente, tensión de cizalla de líquidos (*fluid shear stress*), cualquier otra fuerza mecánica o de deformación ejercida *in vivo* sobre cartílago existente, o una combinación de los mismos. Los adipocitos pueden ser adipocitos blancos, adipocitos pardos, o una mezcla de los mismos.

En aspectos de la divulgación, cuando los adipocitos se someten a deformación mecánica *in vitro*, las células se combinan con un armazón para producir una composición de células/armazón. En algunos casos, la composición de células/armazón comprende factores de crecimiento, moléculas de la matriz, fármacos o una combinación de los mismos. La composición de células/armazón puede suministrarse a un individuo, tal como a la articulación de un individuo. En realizaciones específicas, la articulación es un disco intervertebral. En determinados casos, el individuo tiene discopatía.

En aspectos de la divulgación, cuando los adipocitos se someten a deformación mecánica *ex vivo*, a las células se les proporcionan condiciones adecuadas para generar cartílago. En realizaciones específicas, las condiciones comprenden bajo oxígeno, tensión mecánica, o una combinación de los mismos. En algunos casos, el cartílago se configura en la forma de una forma deseada. La forma deseada puede ser al menos parte de una oreja o de una nariz, por ejemplo. En algunos aspectos, el método comprende además la etapa de generar un molde de la forma deseada. En algunos casos, el método comprende además la etapa de proporcionar el cartílago a un individuo que necesita reparación de cartílago. En realizaciones específicas, la forma deseada se utiliza para sustituir o reparar cartílago en una o más regiones del cuerpo de un individuo, en donde la región precisa tejido conjuntivo. En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de obtener imágenes de una parte del cuerpo de un individuo que necesita reparación de cartílago o que se sospecha que necesita reparación de cartílago. En algunos casos, el método comprende además la etapa de obtener imágenes de una parte del cuerpo de un individuo que necesita reparación de cartílago y generar a partir de las mismas un molde de una forma deseada de cartílago. En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de obtener imágenes de una parte del cuerpo de un individuo en donde esa parte no necesita reparación y utilizar la imagen para generar un molde para el crecimiento de cartílago para sustituir o reparar una zona que necesita reparación.

Quando se proporciona al individuo cartílago o tejido de adipocitos, en algunos casos se puede realizar con uno o más soportes. En realizaciones específicas, el soporte es reabsorbible. En algunos aspectos, el soporte está compuesto de un material que sería reabsorbido por el cuerpo del individuo durante y/o después de que se complete su función de formación de cartílago. En casos particulares, el soporte no es reabsorbible. En determinadas realizaciones, el soporte está compuesto de metal o uno o más de otros materiales que pueden permanecer en el cuerpo y actuar como un andamiaje para mantener la forma y la función del cartílago.

Quando se suministra cartílago o tejido de adipocitos a una nariz, oreja, rodilla, hombro, codo u otra zona del cuerpo, se puede realizar donde se precise tejido conjuntivo para el individuo. En algunos casos, el cartílago o tejido de adipocitos no se suministra a una articulación. En realizaciones específicas, el tejido cartilaginoso no se suministra a un disco vertebral.

En aspectos de la divulgación, cuando los adipocitos se someten a deformación mecánica *in vivo*, los adipocitos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos antes de la etapa de someterlos *in vivo*. En realizaciones particulares, los adipocitos se suministran a una articulación del individuo. En algunos casos, el individuo tiene discopatía. En realizaciones específicas, las células se suministran a un disco intervertebral. En algunas realizaciones, después del suministro a la articulación, en la articulación hay una mezcla de adipocitos y de células de tipo condrocito. Las células de tipo condrocito pueden definirse además como células que producen moléculas de la matriz tal como colágeno I, colágeno II, proteoglucanos (tal como agreganos) o una combinación de los mismos. El colágeno puede comprender colágeno de tipo I y tipo II.

Quando los adipocitos se suministran a un individuo, puede ser entre discos intervertebrales. En aspectos específicos, los adipocitos se suministran entre o en el núcleo pulposo y las fisuras en el anillo fibroso interno.

Los métodos de la divulgación pueden comprender además la obtención de adipocitos del individuo. En algunos casos, los adipocitos obtenidos se expanden, tal como al menos un día. En algunos casos, los adipocitos obtenidos se pasan, tal como el pase más de una vez.

En determinadas realizaciones, después del suministro de los adipocitos a la articulación del individuo muere una pluralidad de adipocitos. En realizaciones específicas, la muerte de los adipocitos da como resultado una respuesta celular de las células articulares endógenas del individuo. En algunas realizaciones, la respuesta celular comprende la estimulación del crecimiento de las células articulares endógenas del individuo. En determinados aspectos, después del suministro de los adipocitos a la articulación del individuo, hay desarrollo de tejido cicatricial en la articulación.

En realizaciones de la divulgación, los adipocitos son autólogos o alogénicos con respecto al individuo.

Lo anterior ha esbozado de manera bastante amplia las características y ventajas técnicas de la presente invención para que la descripción detallada de la invención que sigue se pueda entender mejor. En lo sucesivo en el presente documento se describirán características y ventajas adicionales de la invención que forman la materia objeto de las reivindicaciones de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que la concepción y la realización específica divulgadas pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. Los expertos en la materia también deberían darse cuenta de que tales construcciones equivalentes no se apartan del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las características novedosas que se cree que son características de la invención, tanto en su organización como en su método de funcionamiento, junto con otros objetos y ventajas adicionales, se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considere en relación con las figuras adjuntas. Debe entenderse expresamente, sin embargo, que cada una de las figuras se proporciona con fines ilustrativos y descriptivos únicamente y no están destinadas a ser una definición de los límites de la presente invención.

Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, en la memoria descriptiva, "un" o "una" puede significar uno o más. Como se usa en el presente documento en la reivindicación (o reivindicaciones), cuando se utilizan junto con la expresión "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. En realizaciones específicas, los aspectos de la divulgación pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" uno o más elementos o etapas de la divulgación, por ejemplo. Algunas realizaciones de la divulgación pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas de método y/o métodos de la divulgación. Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento pueda implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento.

El término "adipocitos" (que también se pueden denominar células adiposas o lipocitos, o células grasas), como se usa en el presente documento, se refiere a células de tejido conjuntivo que pueden sintetizar y contener grandes glóbulos de grasa. Dos tipos de adipocitos incluyen los siguientes: 1) adipocitos blancos que tienen grandes gotitas

de grasa, una pequeña cantidad de citoplasma y núcleos aplanados y no ubicados en el centro; y 2) adipocitos pardos que tienen gotitas de grasa de distinto tamaño, una gran cantidad de citoplasma, numerosas mitocondrias y núcleos redondos ubicados en el centro. Los principales componentes químicos de la grasa de los adipocitos comprenden triglicéridos, que son ésteres compuestos de un glicerol y uno o más ácidos grasos, tales como ácido esteárico, oleico o palmítico.

La expresión "células de tipo condrocito", como se usa en el presente documento, se refiere a células que no son condrocitos primarios pero que proceden de adipocitos, por ejemplo. Estas células de tipo condrocito tienen un fenotipo de condrocitos (células de cartílago) que incluyen una forma de condrocitos (por ejemplo, células poligonales y/o romboidales) y/o son capaces de agregarse y producir componentes de la matriz del cartílago, tales como proteoglicano sulfatado y colágeno de tipo II, por ejemplo. Por tanto, los marcadores de ejemplo de células de tipo condrocito incluyen uno o más de agregano, que es un proteoglicano de condroitín sulfato y queratán sulfato, colágeno de tipo II, proteína Sox-9, proteína de unión de cartílago y perlecano, que es un proteoglicano de heparán sulfato, por ejemplo.

El término "articulación", como se usa en el presente documento, se refiere a una región del cuerpo en donde se unen dos huesos de un esqueleto.

La expresión "adipocitos rediferenciados", como se usa en el presente documento, se refiere a adipocitos que se han sometido a condiciones para convertirse en células de tipo condrocito. Las condiciones pueden ser de cualquier tipo adecuado, aunque en realizaciones específicas las condiciones mecánicas comprenden presión hidrostática (incluyendo constante o intermitente), bajo oxígeno, tensión de cizalla de líquidos, etc.

La expresión "tensión de cizalla de líquidos" se refiere al movimiento de líquidos sobre una superficie, lo que da como resultado la generación de tensión de cizalla (*shear stress*). La tensión de cizalla es un estado de tensión en que la tensión es paralela a una superficie. El armazón microfluídico permite el flujo de líquidos en los microcanales. Este flujo de líquidos induce una tensión de cizalla de líquidos sobre las células que se siembran en el armazón.

El término "hermético" como se usa en el presente documento se refiere a estar fabricado estanco para líquidos, tal como por fusión o sellado, por ejemplo. En particular, una membrana hermética no permite que el líquido de su interior salga de la membrana, aunque permite que el oxígeno y el dióxido de carbono atraviesen la membrana (tal como el oxígeno para entrar en la membrana y el dióxido de carbono para salir de la membrana).

La expresión "presión hidrostática" se refiere a la presión ejercida o transmitida por un líquido (por ejemplo, agua) en reposo. El disco intervertebral está expuesto a amplios intervalos de presión hidrostática intradiscal durante ejercicios de carga diferentes y están en su mínimo (alrededor de 0,25 MPa) mientras se está acostado o sentado relajado y en el máximo (aproximadamente de 2,5 a 5 MPa) al levantar pesos con la espalda curvada. Estas distintas magnitudes de carga influyen en el disco intervertebral mediante la alteración del recambio de la matriz del disco dependiendo de sus magnitudes. Se han realizado numerosos estudios para determinar el mejor régimen para aplicar presión hidrostática intermitente (PHI) *in vitro* a las células, para inducir la diferenciación condrogénica de las células *in vitro*. Se han analizado distintos regímenes. En estos estudios, la PHI aplicada está dentro de los intervalos de amplitud de 0,5 MPa a aproximadamente 5 MPa y un intervalo de frecuencias de 0,01 Hz a 1 Hz. En realizaciones específicas, el dispositivo de encapsulación está diseñado para transmitir presión hidrostática *in vivo* a la construcción de células-matriz. La envoltura externa llena de líquido (medio) se comprime durante distintos ejercicios de carga; con esta compresión, algo de medio líquido difunde a través de la membrana interna semipermeable, lo que permite la perfusión de la construcción de células-matriz y genera presión hidrostática dentro de la construcción de células-matriz. En este sistema, se aplica la presión hidrostática fisiológica apropiada a la construcción de células-matriz, lo que es útil para la diferenciación condrogénica de las células.

El término "hipoxia" como se usa en el presente documento se refiere a una deficiencia de oxígeno. En aspectos específicos, se refiere a una presión de oxígeno que es menor a aproximadamente el 20 %.

El término "articulación", como se usa en el presente documento, se refiere a una región del cuerpo en donde se unen dos huesos de un esqueleto.

I. Realizaciones generales

Aunque cualquier tejido puede repararse al menos en parte mediante los métodos de la divulgación, incluidos los tejidos del cartílago, en una realización ilustrativa particular, se repara el cartílago del disco intervertebral o el cartílago articular. Una realización general de la divulgación es utilizar adipocitos como fuente de células para diseñar técnicamente nuevo cartílago para el disco intervertebral. La divulgación abarca la diferenciación de estas células en células de tipo condrocito.

En realizaciones particulares de la divulgación, los adipocitos pueden diferenciarse a células de tipo condrocito en uno de una diversidad de modos, incluyendo *ex vivo*, *in vitro*, y/o *in vivo*. En realizaciones específicas, se emplean condiciones particulares para facilitar la diferenciación de condrocitos a partir de adipocitos *ex vivo*, incluyendo, por

ejemplo, las siguientes: 1) tridimensionalidad; 2) baja presión de oxígeno; y 3) tensión mecánica; 4) presión hidrostática intermitente; 5) tensión de cizalla de líquidos; y/o 6) otras condiciones externas que favorecen la diferenciación condrogénica.

5 II. Células utilizadas en la divulgación

En determinadas realizaciones de la divulgación, puede emplearse cualquier célula siempre que la célula sea capaz de diferenciarse en un condrocito o célula de tipo condrocito. Sin embargo, en realizaciones específicas, la célula es, por ejemplo, un adipocito. Pueden utilizarse células autólogas, aunque en realizaciones alternativas se emplean células alogénicas; en realizaciones específicas, las células alogénicas se han sometido a ensayo en cuanto a enfermedades y se consideran adecuadas para la transmisión al ser humano. En determinados aspectos de la divulgación, la célula o células son autólogas, aunque en realizaciones alternativas las células son alogénicas. En los casos en donde las células no sean autólogas, antes del uso en la divulgación, las células pueden procesarse por medios convencionales en la técnica para eliminar materiales potencialmente peligrosos, patógenos, etc.

Los adipocitos se pueden recoger mediante resección quirúrgica o liposucción, por ejemplo.

En aspectos particulares, la diferenciación de tipo condrocito de los adipocitos humanos puede facilitarse empleando deformación mecánica. En realizaciones específicas de la divulgación, tras la diferenciación a partir de adipocitos, las células resultantes *in vivo* comprenden la expresión de determinados marcadores bioquímicos indicativos de colágeno de tipo I y II y proteoglucanos.

En aspectos particulares, puede producirse *in vivo* una diferenciación de tipo condrocito de los adipocitos humano, en que el microentorno del disco intervertebral favorece la diferenciación condrocítica. La carga hidrostática, la hipoxia, la interacción de célula a célula con células condrocíticas residentes en el disco y otros entornos bioquímicos en el disco intervertebral pueden facilitar la diferenciación de adipocitos a células condrocíticas, en realizaciones particulares. En realizaciones específicas de la divulgación, después del trasplante de células las células del disco intervertebral serán una combinación de adipocitos y células condrocíticas que producen tejido adiposo y condrocítico con marcadores bioquímicos de colágeno de tipo I y tipo II y/o varios proteoglucanos que se encuentran en tejidos fibrosos y cartilaginosos.

En algunas realizaciones, los adipocitos se pueden sembrar en una matriz antes y/o durante la diferenciación de condrocitos y la producción de cartílago. En realizaciones en donde se emplea una matriz (que puede denominarse armazón), la matriz puede estar compuesta de un material que permite que las células se adhieran a la superficie del material y formen un tejido tridimensional. Este material puede no ser tóxico, biocompatible, biodegradable, reabsorbible o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, pueden utilizarse polímeros orgánicos tales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-coglicólico (PLGA), poli-e-caprolactona (PCL), poliaminoácidos, polianhídridos, poliortoésteres; hidrogeles naturales tales como colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa, quitosano; hidrogeles sintéticos tales como poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) [P(PF-co-EG) y sus copolímeros. En determinados casos pueden emplearse como armazón perlas de alginato. En algunas realizaciones, los materiales cerámicos tales como la hidroxiapatita y/o el fosfato tricálcico (TCP) pueden utilizarse como armazones en determinados casos que precisen un soporte estructural temporal o permanente, por ejemplo. En determinados casos pueden emplearse como armazón materiales de colágeno.

Las células pueden colocarse en una matriz fabricada de uno o más biopolímeros, tal como para imitar una matriz natural. El armazón puede sembrarse *in vitro* o *ex vivo*, y en determinados aspectos se proporcionan factores de crecimiento a las células, la matriz, o ambas. El armazón puede colocarse en una cámara que puede ser un sistema de perfusión de medio y permite la aplicación de fuerza mecánica al armazón y/o condiciones particulares de bajo oxígeno. Después del suministro de la fuerza, se ayuda a las células a diferenciarse, especialmente para la generación de cartílago. En algunas realizaciones, la matriz se emplea con las células en el molde (análogo a la barra de refuerzo para el cemento) y/o la matriz podría utilizarse con los adipocitos antes de la inserción del molde.

En algunos aspectos de la divulgación, los condrocitos se generan y el cartílago se produce en una cámara que tiene condiciones particulares. La cámara puede ser capaz de regular uno o más de los siguientes parámetros: temperatura, pH del medio, intercambios de gases, estímulos mecánicos, pO₂, PCO₂, humedad y difusión de nutrientes, por ejemplo. Puede estar presente en la cámara un sistema de perfusión, en realizaciones específicas, para proporcionar un suministro constante de nutrientes y eliminar de manera eficaz los productos de desecho. Pueden proporcionarse una o más combinaciones de cargas mecánicas, tal como de forma intermitente, incluida la deformación de células y tejidos, fuerzas de compresión y de cizalla, flujo de líquidos y cambios en la presión hidrostática, por ejemplo. En determinados aspectos estas condiciones pueden producirse en la cámara.

Los adipocitos pueden obtenerse de una fuente donante (alogénica) o de una biopsia de piel autóloga. Puede emplearse el aislamiento de células del cuerpo y su expansión en cultivo y, en determinados casos, las células no se manipulan o se manipulan mínimamente (por ejemplo, se exponen a suero, antibióticos, etc.). Estas células pueden colocarse en un dispositivo (por ejemplo, una jeringa que tiene células resuspendidas en medios procedentes de un

cultivo en monocapa) e inyectarse en el individuo. El suero que se utiliza para alimentar las células para la multiplicación puede lavarse con medios tales como DMEM para evitar la inyección de suero extraño en el individuo. En realizaciones de este sistema, no se emplea matriz, incluido el alginato. En realizaciones de la divulgación, se inyectan solamente las células (o una cantidad mínima de líquido para suspender las células para la inyección) y no se inyectan medios, por ejemplo. La suspensión líquida que contiene las células puede comprender tampón, aminoácidos, sales, glucosa y/o vitaminas, que son componentes del DMEM. Las moléculas de matriz de ejemplo para la manipulación de las células que no se emplean en las etapas del método de la divulgación incluyen polímeros (incluido PGA, PLGA y PCL, por ejemplo); hidrogeles naturales tales como colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa, quitosano, por ejemplo; e hidrogeles sintéticos tales como PEO, PVA, PAA, etc.).

En algunos métodos de la divulgación, después de la obtención de los adipocitos se puede expandir el número de células, aunque en realizaciones alternativas se proporcionan adipocitos *in vivo* a un individuo que lo necesite en ausencia de cualquier expansión previa. El experto en la materia reconoce que las células en cultivo precisan nutrición y que las células pueden alimentarse con medios, tales como SFB (suero fetal bovino). En algunos casos puede prevenirse la contaminación o la infección (por ejemplo, añadiendo antibióticos). Antes de la inyección de las células al individuo, las células se lavan con medios DMEM para eliminar el SFB y los antibióticos, por ejemplo, y las células en suspensión se utilizarán para inyección. La suspensión líquida puede contener una pequeña cantidad de medios, que incluyen tampón, aminoácidos, sales, glucosa y/o vitaminas, por ejemplo. El crecimiento de los adipocitos *in vitro* puede comprender al menos uno o más días de crecimiento antes de su uso *in vivo*. En determinados casos, las células pueden inspeccionarse o controlarse para asegurarse de que al menos algunas de las células se estén dividiendo. Las células que no se dividen pueden eliminarse.

III. Rediferenciación mecánica de adipocitos y usos ilustrativos de las mismas

La tensión /deformación mecánica son factores importantes para la condrogénesis. El presente método utiliza una o más deformaciones mecánicas. Realizaciones tales como presión hidrostática intermitente (PHI), baja presión de oxígeno, tensión de líquidos de cizalla, carga de presión, o una combinación de las mismas, como inductor de la diferenciación condrogénica de los adipocitos. En algunas realizaciones de la presente divulgación, las células se cultivan en una matriz tridimensional, por ejemplo.

La carga mecánica sobre los adipocitos puede efectuarse *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* seguido por *in vivo*, o una combinación de los mismos. En una realización, la diferenciación se inicia *in vitro* y después se implantan *in vivo* y continúan creciendo y diferenciándose; en algunos casos, las células de tipo condrocito se siembran en la matriz (y la matriz puede comprender una estructura inerte). En aspectos específicos de la divulgación, la estructura inerte de la matriz está destinada a proporcionar un régimen de carga fisiológica para inducir la diferenciación *in vivo* de las células.

En aspectos específicos de la divulgación, se induce a las células a experimentar diferenciación en condrocitos o células de tipo condrocito. Dicha diferenciación puede producirse antes del suministro *in vivo*, tal como en un almacén, y/o después del suministro *in vivo*. En realizaciones específicas, la célula se somete a condiciones para facilitar la diferenciación en condrocitos. En una realización específica adicional, una condición comprende carga mecánica. En realizaciones específicas de la divulgación, la carga mecánica estimula la diferenciación condrogénica de los adipocitos. Dicha tensión mecánica puede ser de cualquier tipo, aunque en realizaciones específicas comprende presión hidrostática y/o tensión de cizalla de líquidos. En realizaciones específicas adicionales, el estrés es constante o intermitente.

En la presente divulgación, la carga mecánica, tal como la presión hidrostática cíclica y la tensión de fluidos de cizalla, inducen la diferenciación condrogénica de los adipocitos sembrados en una matriz tridimensional. Las condiciones de cocultivo para estimular la diferenciación condrogénica pueden emplear factores tales como el cultivo de alta densidad celular, el cultivo con BMP-2 y ácido ascórbico, y/o el cultivo en baja presión de oxígeno.

Los métodos pueden comprender la etapa de suministrar adipocitos a una articulación de un individuo, en donde, antes del suministro, los adipocitos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos, aunque en realizaciones alternativas. Los adipocitos pueden o no exponerse a condiciones hipóxicas antes del suministro *in vivo*.

Realizaciones del método utilizan deformaciones mecánicas *in vivo* y, en realizaciones particulares, se utiliza la presión inherente de la columna vertebral para proporcionar deformación mecánica. En algunas realizaciones, el método tiene lugar en ausencia de otros tipos de presión, incluida la ausencia de presión hidrostática intermitente, tensión de líquidos de cizalla, etcétera. En algunas realizaciones, el método tiene lugar en ausencia de presión distinta de la presión inherente de la columna vertebral, baja presión de oxígeno, factores de crecimiento, cultivo en una matriz, etcétera. En algunas realizaciones, la carga de presión procedente de la columna vertebral se emplea para inducir la diferenciación de los adipocitos a otras células.

En aspectos específicos de la divulgación, se induce a las células a experimentar diferenciación en condrocitos o células de tipo condrocito. En determinadas realizaciones, tal diferenciación se produce después del suministro *in*

vivo. Aunque las células pueden experimentar diferenciación *in vivo* en cualquier articulación, en realizaciones específicas la articulación es un disco intervertebral. En aspectos de la divulgación, se puede mejorar la biomecánica de la matriz y la biología del disco mediante el aumento del tamaño del disco, del contenido de colágeno y/o del nivel de determinadas moléculas biológicas. En realizaciones de la divulgación, las células en los discos, siempre y cuando no se filtren fuera del espacio y no mueran, producen moléculas de la matriz tales como colágeno, proteoglucano, etc. En determinados aspectos, las moléculas biológicas proporcionan propiedades biomecánicas beneficiosas, tales como la resistencia a cargas de compresión/tensión. Las células sometidas a carga con la columna vertebral de pie/andando/curvada normal se diferenciarán en células cartilaginosas o células de tipo cartilaginoso *in vivo*. Tanto los adipocitos como las células condrocíticas del disco pueden producir una matriz o tejido fibroso y/o cartilaginoso que puede mejorar la altura y el volumen del disco intervertebral y potenciar las propiedades biomecánicas.

En determinadas realizaciones, se mejora la altura del disco y/o se presentan determinados marcadores bioquímicos en las células implantadas. La altura del disco puede medirse mediante radiografías simples, compararse antes y después de la terapia, por ejemplo. En al menos casos específicos, también puede emplearse resonancia magnética nuclear (RMN), ensayo de marcadores bioquímicos y/o histología. El restablecimiento de la altura del disco mejora el espacio para los nervios raquídeos que atraviesan la columna vertebral, y además tiene un beneficio indirecto en este sentido de mejorar la biomecánica discal y la biología de la zona. En realizaciones particulares los cambios histológicos después del trasplante de los adipocitos pueden mostrar una combinación de adipocitos y células cartilaginosas y matriz con aumento de la altura del disco debido a un tejido más abundante.

En algunas realizaciones, se inyectan adipocitos o adipocitos rediferenciados entre las vértebras o los discos intervertebrales, y las células del núcleo pulposos pueden migrar a las fisuras del anillo asociadas a la degeneración del disco. Estas células potenciarán la formación de la matriz tanto en el núcleo pulposos como en el anillo fibroso para ayudar en la reparación y regeneración del tejido. En determinadas realizaciones, las células del núcleo pulposos se diferenciarán más hacia condrocíticas y las células del anillo fibroso serán más adipocíticas debido a los entornos mecánicos y bioquímicos del núcleo pulposos y el anillo fibroso.

En algunas realizaciones, la diferenciación de los adipocitos no comienza hasta la implantación *in vivo* y no todas las células trasplantadas pueden diferenciarse en células condrocíticas debido a los variables entornos biomecánicos y bioquímicos.

En realizaciones de la divulgación, se obtienen adipocitos, por ejemplo, del individuo que se está tratando, se obtienen de otro individuo (incluido un cadáver o un donante vivo, por ejemplo), o se obtienen comercialmente. Puede tomarse una biopsia de grasa y, en algunas realizaciones, puede manipularse la biopsia de grasa. Por ejemplo, puede digerirse el tejido graso durante la noche para obtener adipocitos, cultivarse las células para expandirlas y proporcionarlas al individuo, incluso mediante su inyección en el individuo, por ejemplo. Antes del suministro al individuo, las células pueden pasarse una o más veces dependiendo del número de células necesarias, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, por ejemplo. Los pases pueden tener lugar en el transcurso de uno o más días, incluyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o 1, 2, 3, 4 o más semanas, por ejemplo. En algunas realizaciones, las células se pasan durante 5-7 días, por ejemplo.

En realizaciones de la divulgación, la discopatía se previene proporcionando adipocitos *in vivo* a un individuo que lo necesite, incluyendo un individuo susceptible a la enfermedad, por ejemplo, un individuo que envejece. En algunas realizaciones, el individuo es un adulto. Un individuo en riesgo de contraer la enfermedad incluye un atleta (profesional o recreativo), fumadores, individuos obesos y/o aquellos cuyas empleos o estilo de vida precisan esfuerzo físico, incluyendo levantamiento excesivo, por ejemplo.

IV. Realizaciones del soporte

En realizaciones particulares de la divulgación, los adipocitos o adipocitos rediferenciados, se suministran a un individuo con uno o más soportes. Las células pueden suministrarse con un soporte cuando las células están en forma de tejido y, en algunos casos, el tejido tiene una forma deseada.

En algunos casos, se proporciona *in vivo* a un individuo cartílago generado por los métodos de la divulgación, junto con uno o más soportes para el cartílago. El soporte puede ser biodegradable o no biodegradable y/o reabsorbible o no reabsorbible, dependiendo de la necesidad. En los casos en que el soporte sea reabsorbible, el material de soporte puede ser de cualquier tipo en la técnica, incluido el biopolímero. Los polímeros basados en lactida incluyendo poliésteres sintéticos tales como polilactida y copolímeros con glicólido y ϵ -caprolactona son ejemplos de polímeros reabsorbibles. En los casos en que el soporte sea no reabsorbible, el material de soporte puede ser de cualquier tipo en la técnica, incluyendo metal o polímero. Los polímeros no reabsorbibles incluyen resinas de poliacetal y/o polieteretercetona. Se pueden utilizar como soporte materiales de reabsorción lenta, tales como cerámica y colágeno.

Puede generarse cartílago *in vivo* a través de un depósito o recipiente implantable utilizado con el fin formar células condrogénicas, y el depósito puede retirarse después de que se haya formado el cartílago, o el recipiente puede

estar hecho de materiales absorbibles que el cuerpo reabsorberá durante y después de la formación de cartílago.

El soporte puede tener cualquier forma, incluyendo, en algunos casos, una forma que se adapte a la forma del cartílago. La forma del soporte puede ser una forma sustancialmente idéntica del soporte. En algunos casos, el soporte no se adapta a la forma del cartílago, pero sigue teniendo una función de apoyo. Algunas formas de soporte incluyen la lineal, redonda, tubular, rectangular, esférica, de tipo tornillo, cónica, roscada, de copa, de caja, etcétera.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la divulgación. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la divulgación y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado similar o parecido sin apartarse del alcance de la divulgación.

EJEMPLO 1

INYECCIÓN DE ADIPOCITOS Y DIFERENCIACIÓN *IN VIVO*

En realizaciones de la divulgación, se suministran adipocitos a vértebras de mamíferos para mejorar la degeneración de discos intervertebrales, por ejemplo. En algunas realizaciones, se suministran adipocitos a vértebras de mamíferos para inducir la diferenciación de condrocitos o para continuar la diferenciación de condrocitos.

Se emplea un modelo de conejo que implica la punción el anillo, lo que reduce la altura del disco (debido a la pérdida y degeneración de la matriz, por ejemplo) hasta aproximadamente el 70 % de la altura normal, aproximadamente 4 semanas después de la lesión. El trasplante de células en este modelo se realiza a las 4 semanas después de la punción del anillo, y la altura del disco aumenta gradualmente, por ejemplo, durante las próximas 3-4 semanas. Las células que se inyectaron están contenidas en el disco y están vivas, para producir más matriz (tejido adiposo y cartilaginoso) para aumentar la altura del disco. Más matriz y la altura aumentada del disco dan como resultado una mejor función biomecánica y menos dolor para el individuo. En determinados aspectos, el análisis bioquímico demuestra que se expresa colágeno de tipo I y tipo II, lo que demuestra que hay un componente cartilaginoso, indicando que al menos en algunos casos hay tejido cartilaginoso (si fuera todo fibroso (tejido cicatricial), se expresaría principalmente colágeno de tipo I sin colágeno de tipo II, pero el tejido cartilaginoso expresa colágeno de tipo II).

Tras la manipulación del modelo de conejo mencionado anteriormente, la altura del disco aumenta después del trasplante de adipocitos.

EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE CARTÍLAGO *EX VIVO* A PARTIR DE ADIPOCITOS

Un individuo que necesite cartílago o se sospecha que necesita cartílago se somete al método (o los métodos) de la divulgación. Un individuo que necesita cartílago, tal como tener cartílago faltante o defectuoso, por ejemplo, está sujeto al método (o métodos) de divulgación. En realizaciones específicas, se diagnostica que un individuo necesita cartílago. En algunas realizaciones, el individuo no necesita la reparación de discos vertebrales.

Los adipocitos se obtienen de otro individuo o comercialmente. Los adipocitos se pueden cultivar una vez obtenidos. Los adipocitos pueden someterse a condiciones que faciliten la diferenciación de condrocitos, tal como bajo oxígeno, tensión mecánica, o una combinación de los mismos.

En algunos casos, se obtienen imágenes con métodos apropiados del cartílago defectuoso o un representante del cartílago defectuoso (tal como una imagen especular del cartílago defectuoso, por ejemplo, en una rodilla, hombro u oreja), tal como una RMN o un TAC, por ejemplo. A continuación, la imagen se emplea para generar un molde de la forma deseada del cartílago defectuoso. Los adipocitos se proporcionan al molde, y como el molde/los adipocitos se someten a las condiciones apropiadas, los adipocitos se diferencian en condrocitos en el molde para producir tejido cartilaginoso. En realizaciones específicas, sin embargo, los adipocitos solos se someten a condiciones apropiadas para producir condrocitos antes de la siembra en el molde y, en algunos casos, los adipocitos se someten a condiciones apropiadas para producir condrocitos antes y después de la siembra en el molde. El propio molde puede generar las condiciones necesarias o el molde puede insertarse en otro recipiente que genere esas condiciones.

El cartílago resultante se proporciona a un individuo que lo necesite, incluido el mismo individuo del que se recogieron los adipocitos y/o a otro individuo que necesite reparación de cartílago. En realizaciones específicas, el tejido cartilaginoso se combina antes o después del suministro con uno o más soportes para facilitar la colocación segura del cartílago en su ubicación deseada, aunque en algunos casos no se necesita soporte. El soporte puede

ser reabsorbible o no reabsorbible, dependiendo de la ubicación deseada, del grosor del cartílago, etcétera.

- 5 Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, debe entenderse que en el presente documento pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Además, el alcance de la presente solicitud no está destinado a limitarse a las realizaciones particulares del procedimiento, maquina, fabricación, composición de materia, medios, métodos y etapas descritos en la memoria descriptiva. Como apreciará fácilmente un experto en la materia a partir de la divulgación de la presente invención, los procedimientos, máquinas, fabricación, composiciones de materia, medios, métodos o etapas, que existen actualmente o que se desarrollarán más tarde que realizan
- 10 sustancialmente la misma función o logran sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en el presente documento pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, las reivindicaciones adjuntas están destinadas a incluir dentro de su alcance tales procedimientos, máquinas, fabricación, composiciones de materia, medios, métodos o etapas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inducción de la desdiferenciación de adipocitos a células de tipo condrocito, que comprende la etapa de someter a los adipocitos a deformación mecánica *in vitro* o *ex vivo*.
2. Adipocitos para su uso en un método de reparación de cartílago en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método inducir la desdiferenciación de adipocitos a condrocitos sometiendo a los adipocitos a deformación mecánica.
3. El método de la reivindicación 1 o los adipocitos para el uso de la reivindicación 2, en donde:
 - (a) la deformación mecánica comprende baja presión de oxígeno, presión hidrostática intermitente, tensión de cizalla de líquidos, o una combinación de los mismos; o
 - (b) los adipocitos son adipocitos blancos, adipocitos pardos, o una mezcla de los mismos.
4. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - (a) la etapa de sometimiento se produce *in vitro* y las células se combinan con un armazón para producir una composición de células/armazón, opcionalmente en donde la composición de células/armazón comprende factores de crecimiento, moléculas de la matriz, fármacos o una combinación de los mismos; o
 - (b) la etapa de sometimiento se produce *ex vivo* y a las células se les proporcionan condiciones adecuadas para generar cartílago, opcionalmente en donde las condiciones comprenden bajo oxígeno, tensión mecánica, o una combinación de los mismos.
5. Adipocitos para el uso de la reivindicación 2, en donde:
 - (a) los adipocitos se someten a deformación mecánica *in vivo*;
 - (b) los adipocitos se someten a deformación mecánica *in vitro*, las células se combinan con un armazón para producir una composición de células/armazón, y la composición de células/armazón se suministra al individuo; o
 - (c) los adipocitos se someten a deformación mecánica *ex vivo*, a las células se les proporcionan condiciones adecuadas para generar cartílago, y el cartílago se proporciona al individuo, opcionalmente en donde las condiciones comprenden bajo oxígeno, tensión mecánica, o una combinación de los mismos.
6. Adipocitos para el uso de la reivindicación 5(b), en donde
 - (a) la composición de células/armazón comprende factores de crecimiento, moléculas de la matriz, fármacos o una combinación de los mismos;
 - (b) la composición de células/armazón se suministra a la articulación del individuo; o
 - (c) la composición de células/armazón se suministra a un disco intervertebral del individuo, opcionalmente en donde el individuo tiene discopatía.
7. El método de la reivindicación 4(b), en donde el cartílago se configura en la forma de una forma deseada, opcionalmente en donde:
 - (a) la forma deseada es al menos parte de una oreja o de una nariz;
 - (b) el método comprende además la etapa de generar un molde de la forma deseada;
 - (c) dicha forma deseada se utiliza para sustituir o reparar cartílago en una o más regiones del cuerpo de un individuo, en donde dicha región precisa tejido conjuntivo;
 - (d) el método comprende además la etapa de obtener imágenes de una parte del cuerpo de un individuo que necesita reparación de cartílago o que se sospecha que necesita reparación de cartílago;
 - (e) el método comprende además la etapa de obtener imágenes de una parte del cuerpo de un individuo que necesita reparación de cartílago y generar a partir de las mismas un molde de una forma deseada de cartílago; o
 - (f) el método comprende además la etapa de obtener imágenes de una parte del cuerpo de un individuo en donde esa parte no necesita reparación y utilizar la imagen para generar un molde para el crecimiento de cartílago para sustituir o reparar una zona que necesita reparación.
8. Adipocitos para el uso de la reivindicación 5(c), en donde el cartílago se proporciona al individuo con uno o más soportes, opcionalmente en donde
 - (a) el soporte es reabsorbible;
 - (b) el soporte está compuesto de un material que sería reabsorbido por el cuerpo del individuo durante y/o después de que se complete su función de formación de cartílago; o
 - (c) el soporte no es reabsorbible, opcionalmente en donde el soporte está compuesto de metal o uno o más de otros materiales que pueden permanecer en el cuerpo y actuar como un andamiaje para mantener la forma y la función del cartílago.

9. Adipocitos para el uso de la reivindicación 5(c), en donde

- 5 (a) el tejido cartilaginoso se suministra a una nariz, oreja, rodilla, hombro, codo u otra zona del cuerpo donde se precise tejido conjuntivo para el individuo;
 (b) el tejido cartilaginoso no se suministra a una articulación; o
 (c) el tejido cartilaginoso no se suministra a un disco vertebral.

10. Adipocitos para el uso de la reivindicación 5(a), en donde:

- 10 (a) los adipocitos no se someten a factores de crecimiento, moléculas de la matriz, deformación mecánica, o una combinación de los mismos antes de la etapa de sometimiento;
 (b) los adipocitos se suministran a una articulación del individuo;
 (c) el individuo tiene discopatía; o
 (d) las células se suministran a un disco intervertebral.

11. Adipocitos para el uso de la reivindicación 10(b), en donde:

- 20 (a) después del suministro a la articulación, en la articulación hay una mezcla de adipocitos y de células de tipo condrocito;
 (b) los adipocitos se suministran entre los discos intervertebrales;
 (c) los adipocitos se suministran entre o en el núcleo pulposo y las fisuras en el anillo fibroso interno;
 (d) después del suministro de los adipocitos a la articulación del individuo, muere una pluralidad de adipocitos; o
 (e) después del suministro de los adipocitos a la articulación del individuo, hay desarrollo de tejido cicatricial en la articulación.

25 12. Adipocitos para el uso de la reivindicación 11(a), en donde las células de tipo condrocito se definen además como células que producen moléculas de la matriz, opcionalmente en donde las moléculas de la matriz son colágeno I, colágeno II, proteoglicanos, o una combinación de los mismos y, opcionalmente, en donde uno de los proteoglicanos es agreganos.

30 13. El método de la reivindicación 1, en donde los adipocitos son adipocitos obtenidos de un individuo, opcionalmente en donde

- 35 (a) los adipocitos obtenidos se expanden, opcionalmente durante al menos un día; o
 (b) los adipocitos obtenidos se pasan, opcionalmente más de una vez.

40 14. Adipocitos para el uso de la reivindicación 12(d), en donde la muerte de los adipocitos da como resultado una respuesta celular de las células articulares endógenas del individuo, opcionalmente en donde la respuesta celular comprende la estimulación del crecimiento de las células articulares endógenas del individuo.

15. Adipocitos para el uso de la reivindicación 2, en donde las células son autólogas o alogénicas para el individuo.