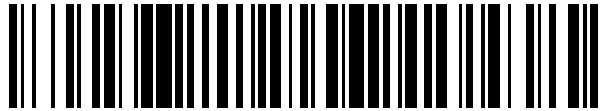


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 921 493**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2017 PCT/EP2017/050431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17121736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2017 E 17701425 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2022 EP 3402542**

54 Título: **Matriz de células notocordales como estimulante para regeneración de disco intervertebral**

30 Prioridad:

**11.01.2016 US 201662277032 P**

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

**26.08.2022**

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITEIT EINDHOVEN  
(100.0%)  
Den Dolech 2  
5612 AZ Eindhoven, NL**

72 Inventor/es:

**ITO, KEITA y  
DE VRIES, STEFAN ANTONIUS HENRICUS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 921 493 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

Matriz de células notocordales como estimulante para regeneración de disco intervertebral

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la regeneración de discos intervertebrales, más específicamente a un método para preparar una disolución o gel de matriz de células notocordales que es adecuado para regenerar el disco intervertebral.

10 **Antecedentes de la invención**

El dolor lumbar como resultado de la degeneración del disco intervertebral (IVD) es una afección común con un alto impacto en la sociedad, físicamente para el individuo afectado, así como económicamente.

15 Los métodos de tratamiento actuales para el dolor lumbar inducido por degeneración son fusión, y reemplazo total de disco. Ambos métodos son exitosos en cierta medida para aliviar el dolor lumbar, pero no tienen una eficacia clínica suficientemente alta y con demasiada frecuencia van acompañados de complicaciones. Además, las prótesis de disco son inherentemente de longevidad limitada. En última instancia, se desea restaurar un disco degenerativo a un estado sano, es decir, regeneración. Desafortunadamente, esto no es sencillo, requiere una intervención biológicamente  
20 activa y hasta ahora no ha tenido éxito. La presente invención avanza la técnica e introduce un método para preparar una disolución o gel de matriz de células notocordales que es adecuado para su uso como estimulante para la regeneración de disco intervertebral.

25 Antes de la madurez esquelética, nuestros discos son sanos y están llenos por un núcleo pulposo central (NP), tejido rico en células notocordales (NC). A los 10 años, perdemos estas NC y, a continuación, nuestros discos contienen principalmente células similares a condrocitos, denominadas células de núcleo pulposo (NPC). Aproximadamente una década o dos después de perder nuestras NC, nuestros discos comienzan a degenerarse con la edad. Otras especies, por ejemplo, cerdos, mantienen sus NC incluso como adultos. Sus IVD no se degeneran. Por lo tanto, los inventores creen que las NC ayudan a mantener unos IVD sanos al producir factores solubles. Se cree además que estos factores  
30 están presentes en la matriz extracelular del tejido de NP rico en NC, y que la matriz de NP rica en NC puede usarse para estimular directamente los IVD degenerados para que se reparen y regeneren. Un tejido acelular de núcleo pulposo porcino se ha descrito por Mercuri J. J. *et al.* "Novel tissue-derived biomimetic scaffold for regenerating the human nucleus pulposus" *Biomed Mater Res A* 2011. Feb; 96 (2): 422-35.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un método para preparar una disolución o gel de matriz de células notocordales con el fin de regenerar el disco intervertebral. El estimulante de regeneración de disco intervertebral procesado por el método descrito es adecuado para regenerar el disco intervertebral.

40 En primer lugar, el tejido de núcleo pulposo porcino que contiene células notocordales se liofiliza para destruir células dentro del tejido y preparar un tejido seco y quebradizo. En segundo lugar, el tejido seco y quebradizo se trata con ADNasa, ARNasa, detergente, o una combinación de los mismos (por ejemplo, benzonasa & Triton) para retirar restos de ácido nucleico y celulares. Este tratamiento da como resultado al menos un 80 % de retirada de ácidos nucleicos  
45 porcinos del tejido de núcleo pulposo porcino, mientras se mantiene sustancialmente el contenido de proteína porcina dentro del tejido de núcleo pulposo porcino. En una manera diferente de decirlo, el tratamiento da como resultado que el material contenga menos del 20 % de ácido nucleico porcino, y que contenga una cantidad sustancialmente inalterada de contenido de proteína porcina en comparación con el tejido de núcleo pulposo porcino de origen.

50 El orden de la primera liofilización seguida de la retirada de ácido nucleico es importante para lograr este resultado. El material genómico porcino alberga retrovirus endógenos (PERV). Los PERV no llegan a la expresión en el propio cerdo, pero pueden volverse activos tras la implantación en diferentes especies, por ejemplo, especie humana. Por lo tanto, la retirada del material genómico para minimizar el riesgo de transmisión de enfermedad es una etapa importante antes de su aplicación en una terapia regenerativa.

55 En el caso de la retirada de ácidos nucleicos del tejido de NP, o bien en estado húmedo o bien después de la desintegración, que es diferente de la presente invención, tal tratamiento ha dado como resultado la retirada de más del 90 % del contenido de ácido nucleico, pero también una pérdida considerable de proteínas de matriz extracelular (> 40 %). La presente invención enseña la retirada sustancial de ácido nucleico del tejido de NP porcino, mientras que  
60 mantiene en gran medida o sustancialmente su contenido de proteína (por ejemplo, factores activos).

En tercer lugar, el material tratado se liofiliza adicionalmente y se pulveriza para dar un polvo de matriz de células notocordales. El polvo de matriz de células notocordales se solubiliza disolviendo el polvo de matriz de células notocordales en un disolvente portador o se forma como un gel.

65 El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada es

capaz de estimular células nativas o madre para que proliferen y produzcan un aumento sustancial en glicosaminoglicanos y la matriz de colágeno tipo II.

El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada es capaz de estimular células nativas o madre para que proliferen y produzcan un aumento significativo en glicosaminoglicanos. Por ejemplo, el polvo de matriz de células notocordales solubilizado resultante es capaz de estimular células nativas o madre para que proliferen y produzcan al menos un aumento de varias veces (por ejemplo, al menos dos a tres veces) en glicosaminoglicanos. El polvo de matriz de células notocordales solubilizado resultante también es capaz de estimular células nativas o madre para que proliferen y produzcan un aumento de al menos siete veces en glicosaminoglicanos. En general, el aumento depende de la especie, la dosificación de polvo administrado y si se administra *in vitro* o *in vivo*.

La disolución o gel estimulante de regeneración de disco intervertebral formado por el método según la invención reivindicada se define como un polvo de matriz de células notocordales solubilizado disuelto en un disolvente portador o formado como un gel, mediante lo cual el polvo de matriz de células notocordales se origina a partir de tejido de núcleo pulposo porcino liofilizado y tratado que contiene células notocordales. El polvo contiene menos del 20 % de ácido nucleico porcino, y el polvo contiene una cantidad sustancialmente inalterada de contenido de proteína porcina en comparación con el tejido de núcleo pulposo porcino de origen.

El método según la invención tiene las siguientes ventajas:

- El tejido del núcleo puposo notocordal porcino es abundante.
- El tejido del núcleo puposo notocordal porcino puede procesarse fácilmente siguiendo las etapas descritas, anteriormente, para producir un polvo que no sea perjudicial y que pueda estimular la regeneración de IVD.
- Mediante el uso del método según la invención para preparar el polvo de matriz de células notocordales, no es necesaria la etapa difícil y que requiere mucho tiempo para identificar y producir los factores activos solubles específicos secretados por células notocordales.
- El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada puede inyectarse en el IVD a través de una aguja de calibre pequeño (< 27G) que causa un daño mínimo a su anillo fibroso exterior.
- El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada forma un hidrogel de autoensamblaje a concentraciones más altas, puede usarse como portador de células (madre), para reponer el número de células decreciente que caracteriza la degeneración de disco intervertebral.
- El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada es suficiente, por sí solo, para inducir a las células madre a convertirse en NPC.
- El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada a concentraciones más altas tiene propiedades reológicas similares al núcleo pulposo natural. Por lo tanto, puede reponerse e integrarse fácilmente en el tejido de núcleo pulposo.
- El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada a concentraciones más altas tiene un potencial de hinchamiento considerable. Por lo tanto, puede añadir presión de hinchamiento al núcleo pulposo.
- El polvo de matriz de células notocordales solubilizado formado por el método según la invención reivindicada puede combinarse con portadores adecuados, crear una liberación sostenida de sus componentes solubles y, por lo tanto, un efecto regenerativo más duradero.

#### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-C muestran el contenido bioquímico expresado como glicosaminoglicano (GAG) en la figura 1A, ADN en la figura 1B, y GAG por ADN en la figura 1C de NPC embebidas en perlas de alginato, tratadas con medio base (BM), medio base más factores solubles del medio acondicionado con cultivo de tejido celular notocordal (NCCM), o medio base más polvo de matriz de células notocordales solubilizado (NCM) en cultivo durante 4 semanas. La NCM no solo estimula a células para que proliferen, sino que también para que cada célula produzca más GAG dando como resultado casi un aumento global de 7x en la producción de GAG.

La figura 2 muestra tinción con azul alciano del medio base (BM), medio base más factores solubles del medio acondicionado con cultivo de tejido celular notocordal (NCCM), o medio base más polvo de matriz de células notocordales solubilizado (NCM) tratada con NPC embebidas en perlas de alginato cultivadas durante 4 semanas, con aumento de 10x y 40x. Una tinción homogénea más oscura de perlas expuestas a NCM indicó una producción de

GAG aumentada y bien distribuida. También se demuestra el aumento de la proliferación de células en grupos con NCM.

5 La figura 3 muestra tinción inmunohistoquímica de colágeno tipo I y tipo II de NPC embebidas en perlas de alginato, tratado con medio base (BM), medio base más factores solubles del medio acondicionado con cultivo de tejido celular notocordal (NCCM), o medio base más polvo de matriz de células notocordales solubilizado (NCM) en cultivo durante 4 semanas. Como se indica por tinción más oscura, la NCM apenas induce ninguna producción de colágeno tipo I, pero fue un estimulante muy fuerte para el colágeno tipo II.

10 Las figuras 4A-B muestran en la figura 4A ADN y en la figura 4B contenido de proteína en polvo de matriz de células notocordales porcina solubilizado no tratada y tratada con benzonasa, donde "h" indica la duración de exposición a benzonasa y "U" a la concentración de benzonasa en UI/ml. Después del tratamiento durante 6 h con 100 o 200 UI/ml de benzonasa, solo el 20 % del ADN porcino permaneció en la NCM mientras que la mayoría de la proteína permaneció.

15 La figura 5 muestra un portador de células madre instructivo. El panel izquierdo es una tinción de células vivas/muertas con calceína AM y yoduro de propidio de células estromales de médula ósea humana (MSC) mezcladas en polvo de matriz de células notocordales solubilizado al 20 % en peso/volumen, inyectado a través de una aguja de 27G y posteriormente cultivado en medio base (24 h). El panel derecho son secciones histológicas delgadas teñidas con safranina O de cultivos de sedimento de MSC (4 semanas) en medio base (control), medio base más 10 ng/ml de TGFβ1 (+TGFβ1) o medio base más 10 mg/ml de polvo de matriz de células notocordales solubilizado (+NCM). Después de la inyección en NCM, las MSC permanecen viables (flechas huecas y sólidas). En 24 h, se unen a la NCM formando una forma más de husillo (flechas huecas). La NCM estimula la proliferación de MSC (masa celular más grande) y asume un fenotipo condrogénico que produce una matriz rica en GAG (Safranina O = tinción más ligera).

25 Las figuras 6A-C muestran las propiedades reológicas y osmóticas del polvo de matriz de células notocordales solubilizado: la figura 6A) módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) y la figura 6B) barrido de frecuencia de desplazamiento de fase ( $\tan \delta$ ) del tejido de núcleo pulposo de adulto joven bovino (NP) y un 10, 20 y 30% en peso/volumen de polvo de matriz de células notocordales solubilizado (NCM); la figura 6C) presión osmótica en función de la concentración de polvo de matriz de células notocordales solubilizado (% en peso/volumen, gel de NCM) calculado a partir del hinchamiento frente a diversas disoluciones de polietilenglicol de concentración (método de análisis como se describe en NO Chahine, *et al.* Biophys J, 89(3): 1543-1550, 2005). Las propiedades reológicas de NCM, especialmente a concentraciones más altas se aproximan a las del tejido de núcleo pulposo natural. A concentraciones superiores al 15 % en peso/volumen, la NCM tiene suficiente potencial osmótico para restaurar la tonicidad al tejido de núcleo pulposo cuyo propio potencial osmótico natural es 0,1 – 0,2 MPa.

### Descripción detallada

40 Según una realización del método de la invención, se recoge tejido de NP rico en NC sano, por ejemplo, de columnas vertebrales porcinas. A continuación, el tejido se liofiliza, destruyendo de ese modo las células, y dejando atrás un tejido quebradizo seco. Benzonasa, ADNasa, ARNasa, detergente, o una combinación de los mismos se usa después para retirar los restos de ácido nucleico y celulares, después de lo cual el tejido se liofiliza nuevamente. El tejido quebradizo se pulveriza luego a un polvo fino. Este polvo puede disolverse en un disolvente portador como PBS, un portador viscoso como ácido hialurónico o incluso un hidrogel o microesferas de liberación sostenida, e inyectarse en el IVD para estimular la regeneración de disco intervertebral. El polvo disuelto e inyectado directamente tiene la capacidad de promover la producción de matriz sana e inhibir la inflamación. Adicionalmente, puede inhibir el catabolismo de la matriz, inhibir la neovascularización e inhibir la neoinervación dentro del IVD.

### Realización a modo de ejemplo y resultados

50 Se realizó un experimento para someter a prueba si la matriz de tejido de NP rica en NC (NCM) en polvo tiene un efecto estimulante y cómo de similar es esto a solo las proteínas producidas por las células NC, es decir, medio acondicionado de NC (NCCM).

55 NCCM se produjo incubando tejido de NP rico en NC porcino durante 4 días en DMEM con alto contenido de glucosa con penicilina/estreptomina al 1 % (p/s) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % y O<sub>2</sub> al 5 %. Después, el medio se vertió a través de un filtro de 70 μm para retirar las NC y el tejido. Posteriormente, se filtró a través de un filtro de 3 kDa, los solutos que permanecieron se suspendieron de nuevo en DMEM bajo en glucosa (lg), y el NCCM se almacenó a -80 °C.

60 La NCM se produjo liofilizando el tejido NP porcino durante la noche, después de lo cual se molió hasta un polvo fino. El contenido de proteína tanto del NCCM como de la NCM se midió de modo que cuando la NCM se suspendió de nuevo en DMEM bajo en glucosa (lg), las concentraciones de proteína finales de ambos fueron las mismas.

65 Estas (NCM y NCCM) se compararon con el medio base (BM = DMEM lg complementado con ITS, ácido ascórbico, L-prolina, seroalbúmina bovina y p/s).

Se recogieron células, similares a las de los discos humanos adultos, es decir, NPC, de los discos caudales de colas de bovino mediante digestión enzimática, y se sembraron en perlas de alginato al 1,2 % en 3 millones de células/ml de alginato. Las perlas se cultivaron durante 4 semanas en BM, NCCM o NCM (ambos con los mismos suplementos que BM).

Después del cultivo, las perlas se analizaron para determinar el contenido de glicosaminoglicano (GAG) y ADN (correlacionado directamente con el número de células). GAG es el componente de ECM principal del tejido de NP, le da al tejido de NP sus propiedades mecánicas funcionales y es el primero en disminuirse durante la degeneración de IVD.

Como se observó anteriormente, solo las proteínas derivadas de NC (NCCM) causaron la proliferación de células de disco 1,3x en comparación con BM (figura 1B). Esto también estimuló a cada célula para producir 1,8x más GAG que las cultivadas sin las proteínas añadidas (BM, figura 1C). Estos dos mecanismos combinados dieron como resultado un aumento general en el contenido de GAG que fue un poco superior a 2x con las proteínas de NC (NCCM) que sin las mismas (BM, figura 1A).

Con la matriz de NC en polvo añadida al medio (NCM), las células proliferaron casi 5x más que sin la misma (BM, figura 1B), y se estimuló cada célula para producir 3x más GAG (figura 1C). Por lo tanto, el aumento global en el contenido de GAG estimulado fue 7x mayor con el polvo de matriz de NC que sin el mismo (NCM frente a BM, figura 1A). Esta estimulación superior de la producción de GAG por polvo de matriz de NP (NCM) en comparación con solo las proteínas de NC (NCCM) fue inesperada y sorprendente, lo que sugiere que la presentación de las proteínas derivadas de NC o un efecto sinérgico que combina las proteínas con la matriz de NC proporciona un mayor efecto anabólico sobre las células en el centro de nuestros discos.

Los resultados de los ensayos bioquímicos también se confirmaron histológicamente en secciones teñidas con azul alciano (figura 2), donde azul más oscuro en NCCM y especialmente NCM indica un mayor contenido de GAG. Con un aumento de 40x, se observa un número de células aumentado en NCM en comparación con NCCM y especialmente BM.

Se han realizado experimentos *in vitro* para evaluar adicionalmente la viabilidad del polvo de matriz de NC en la regeneración de disco intervertebral. Se ha demostrado que NCCM tiene un efecto en cierto modo anticatabólico y antiinflamatorio sobre las NPC inducidas por inflamación. Además, se ha demostrado que NCCM inhibe el crecimiento de neuritas y la formación de vasos sanguíneos. Se espera que la NCM tenga efectos similares o mejores que el NCCM.

Los cerdos albergan retrovirus endógenos (PERV) en su genoma, que son capaces de infectar células humanas. Por lo tanto, antes de que la aplicación clínica sea factible, es necesario que el polvo de matriz de NC (NCM) se descelularice, mientras se mantiene un contenido de proteína tan alto como sea posible. La descelularización se realiza con benzonasa, que escinde ADN y ARN en pequeños fragmentos que después pueden retirarse mediante etapas de lavado.

Se realizó una prueba para retirar el ADN de NCM. De nuevo, la NCM se produjo mediante liofilización y trituración de tejido de NP rico en NC porcino (n = 3). Después, el polvo se incubó en un agitador a 37 °C con 2 concentraciones diferentes de benzonasa (100 U/ml y 200 U/ml) en tampón Tris-EDTA, hasta 3 puntos temporales diferentes (30 min, 2 horas o 6 horas). Después, las muestras se lavaron dos veces con PBS, y el polvo no tratado, así como cada uno de los grupos de tratamiento, se sometió a ensayo para determinar el contenido de proteínas y ADN. El contenido de ADN disminuyó con la duración del tratamiento con benzonasa, y se observaron pequeñas diferencias entre las dos concentraciones de benzonasa. Aunque se observaron algunas variaciones en el contenido de proteínas entre los grupos de tratamiento, no hubo tendencias claras para disminución del contenido de proteína con el tiempo de tratamiento o la concentración de benzonasa. En conjunto, estos resultados indican que es posible retirar el ADN de la NCM, mientras se mantiene en gran medida el contenido de proteína.

Una vez que los efectos del polvo de matriz de NC sobre la formación de vasos y neuritas, así como también se han establecido sus efectos antiinflamatorios, se realizarán experimentos con animales *in vivo*. Si tiene éxito, el polvo de matriz de NC podría someterse a prueba en ensayos clínicos.

Los experimentos *in vitro* con NPC bovinas usaron ~ 2 mg de NCM/6\*10<sup>5</sup> NPC. Esto dio como resultado un fuerte aumento en la producción de GAG, así como en la proliferación celular. Basándose en el trabajo con el tejido de NP torácico de Beagle y el tejido de NP caudal bovino, se espera que el peso del tejido de NP lumbar de Beagle sea de ~100 mg, que contenía ~2\*10<sup>5</sup> NPC. Por lo tanto, el intervalo de dosificación de NCM que, por lo tanto, se someterá a prueba en un modelo canino *in vivo* será de 1 mg, 5 mg, 10 mg y 20 mg de NCM por 100 mg de tejido de NP. Debido a que la biodisponibilidad se verá afectada por el tejido, el órgano y el método de inyección, y la respuesta celular *in vivo* pueden ser diferentes a *in vitro*, debe explorarse un amplio intervalo de dosificación. Cuando se traslada del canino al ser humano, las diferencias exactas entre especies también son desconocidas y se especula que las dosificaciones para el ser humano pueden ser +/- un orden de magnitud diferente. Por ejemplo, estas podrían ser tan amplias como de 0,1 a 100 mg de polvo de NCM a cada 100 mg de tejido de NP del disco humano.

La disolución o gel de matriz de células notocordales formado según el método de la invención puede usarse para el tratamiento regenerativo de disco de dolor de espalda y cuello discogénico en un entorno/aproximación ortopédica y/o farmacéutica.

5 La matriz de células notocordales (NCM) resultante puede estar en forma de un hidrogel. En una forma concentrada, un 10 a un 30 % en peso/volumen, la NCM se comporta como un hidrogel de autoensamblaje suelto que puede inyectarse a través de una aguja hipodérmica.

10 La NCM resultante también puede usarse como portador celular. Cuando se mezcla e inyecta a través de una aguja 27G, las células estromales de médula ósea humana (hBMSC) mantienen su viabilidad (0 h, forma redondeada) e incluso después de eso se unen a los componentes de matriz del hidrogel de NCM (forma de husillo, figura 5).

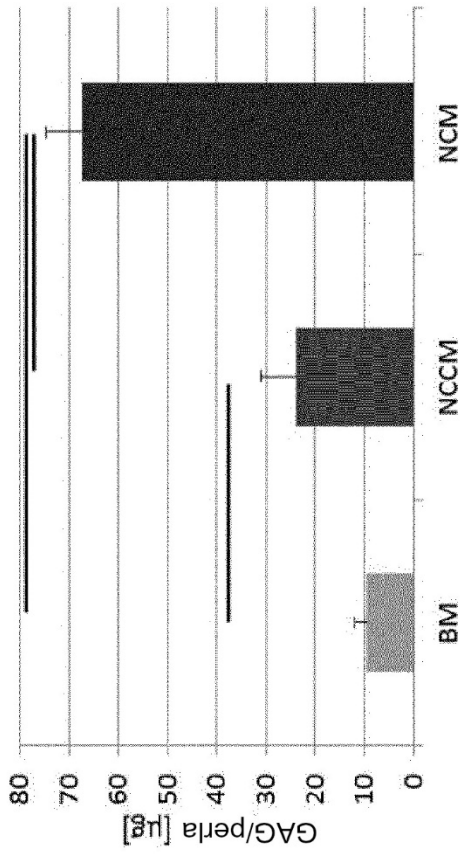
15 La NCM resultante puede ser instructiva de células progenitoras. Cuando las células progenitoras (hBMSC) en cultivo de sedimento se exponen a NCM (10 mg/ml) en un cultivo de 4 semanas, se les indica que se diferencien en células condrogénicas que producen una matriz rica en proteoglicanos y colágeno tipo II (figura 5).

20 La NCM resultante tiene propiedades de material, lo que puede ayudar a restaurar la característica biomecánica del IVD a un estado sano. La NCM resultante tiene propiedades reológicas que dependen de la concentración y que a concentraciones más altas comienzan a acercarse a las del tejido natural de NP (figuras 6A-B). La NCM resultante también tiene un potencial de hinchamiento osmótico considerable (figura 6C), lo que puede ayudar a restaurar directamente las propiedades de hinchamiento de discos moderadamente degenerados empobrecidos en glicosaminoglicano (GAG).

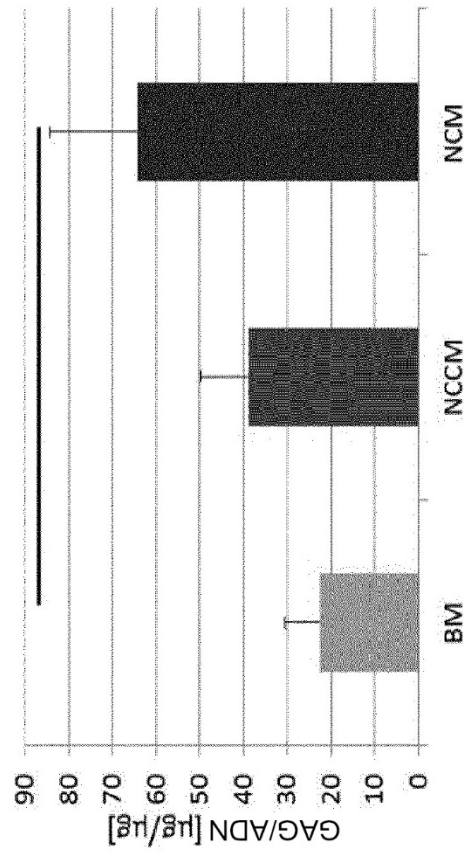
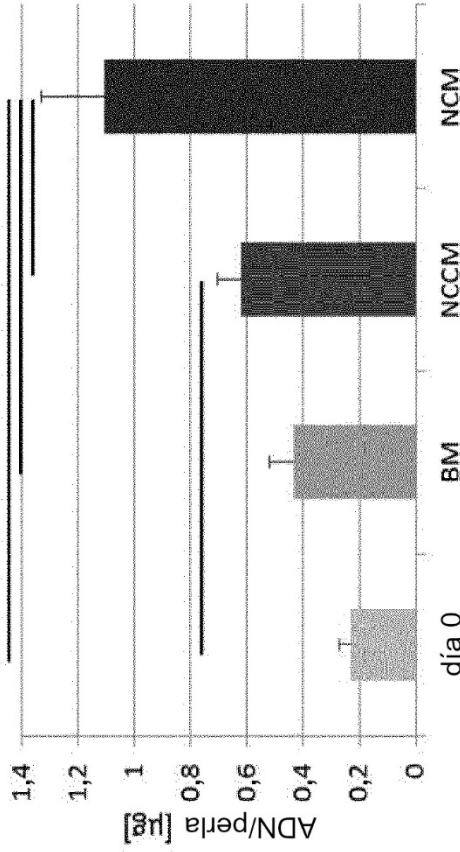
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una disolución o gel de matriz de células notocordales con el fin de regeneración de disco intervertebral, que comprende:
- 5
- (a) liofilizar tejido de núcleo pulposo porcino que contiene células notocordales para destruir células dentro del tejido y preparar un tejido seco y quebradizo;
- (b) tratar el tejido seco y quebradizo para retirar restos celulares y de ácido nucleico, en el que el tratamiento da como resultado al menos un 80 % de retirada de ácidos nucleicos porcinos del tejido de núcleo pulposo porcino mientras se mantiene sustancialmente el contenido de proteína porcina dentro del tejido de núcleo pulposo porcino;
- 10
- (c) liofilizar adicionalmente el material tratado y pulverizar el material tratado para dar un polvo de matriz de células notocordales; y
- 15
- (d) solubilizar el polvo de matriz de células notocordales disolviendo el polvo de matriz de células notocordales en un disolvente portador o formado como un gel.
- 20
2. El método según la reivindicación 1, en el que el polvo de matriz de células notocordales se disuelve en un disolvente portador, un portador viscoso, o un hidrogel o microesfera de liberación sostenida.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el disolvente portador es PBS.
- 25
4. El método o producto según la reivindicación 2, en el que el portador viscoso es ácido hialurónico.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el polvo de matriz de células notocordales solubilizado es un hidrogel.
- 30
6. El método según la reivindicación 5, en el que el polvo de matriz de células notocordales solubilizado está a una concentración del 10 al 30 % en peso/volumen.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el tejido seco y quebradizo se trata con benzonasa, ADNasa, ARNasa, detergente, o una combinación de los mismos.
- 35

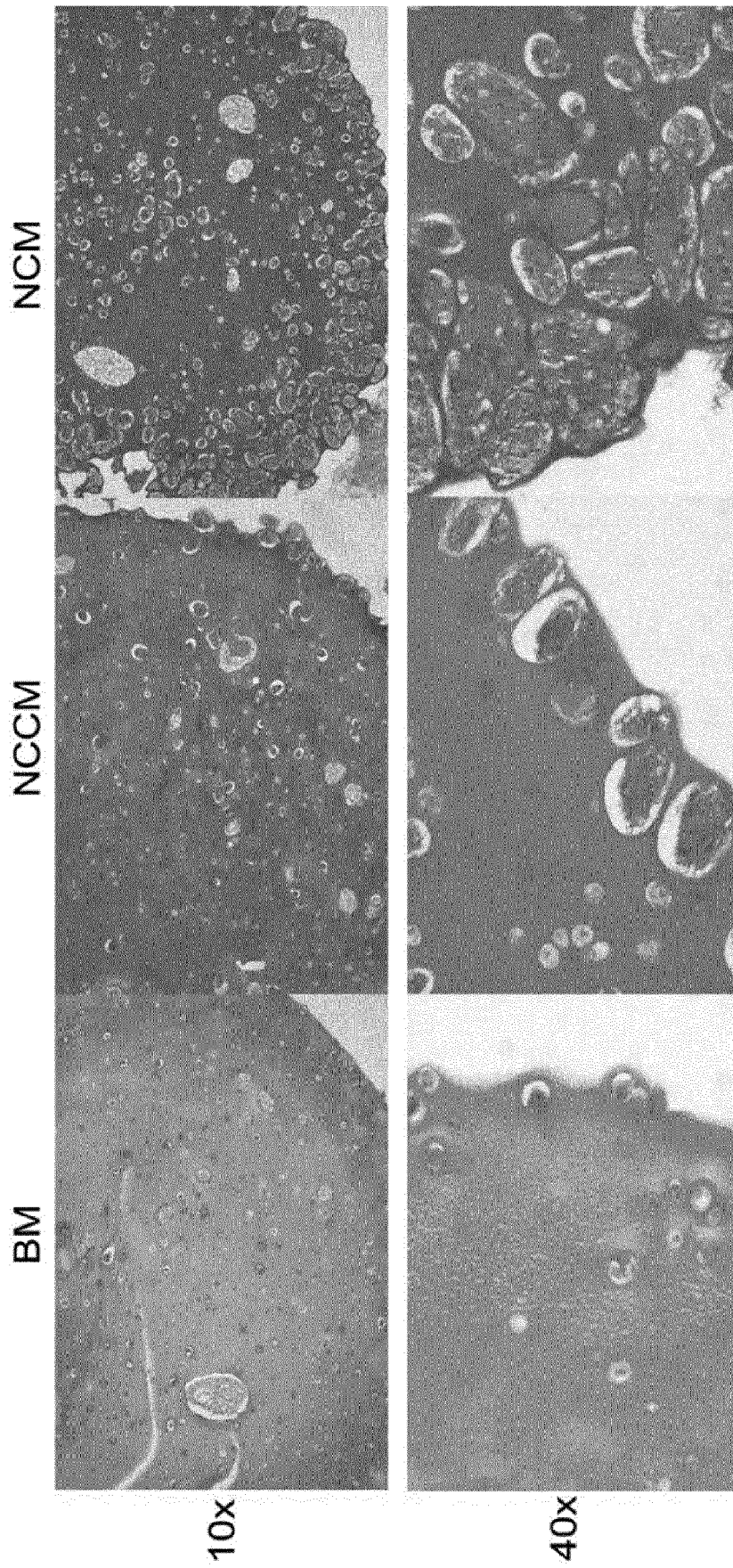
**FIG. 1A**



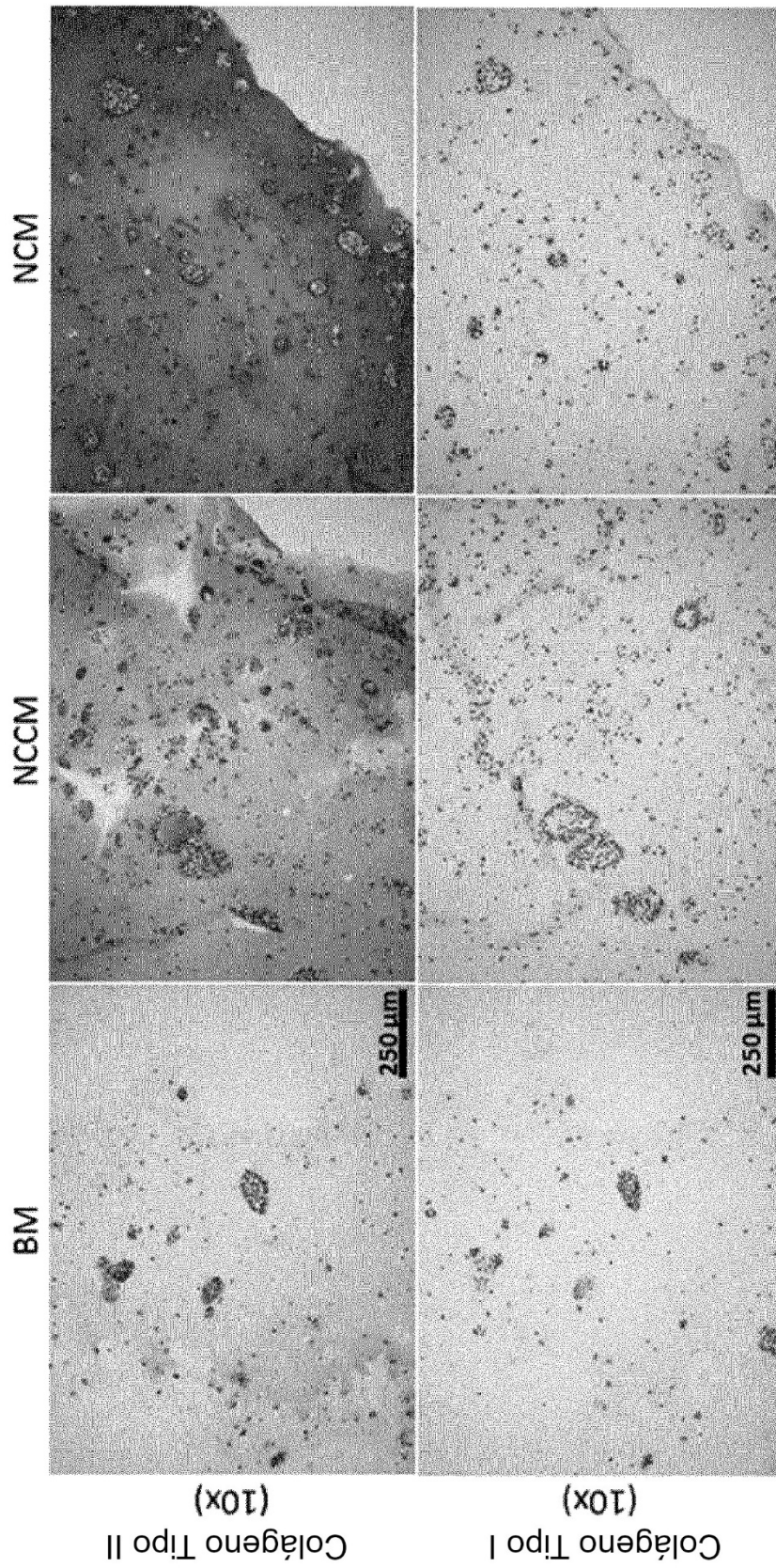
**FIG. 1B**



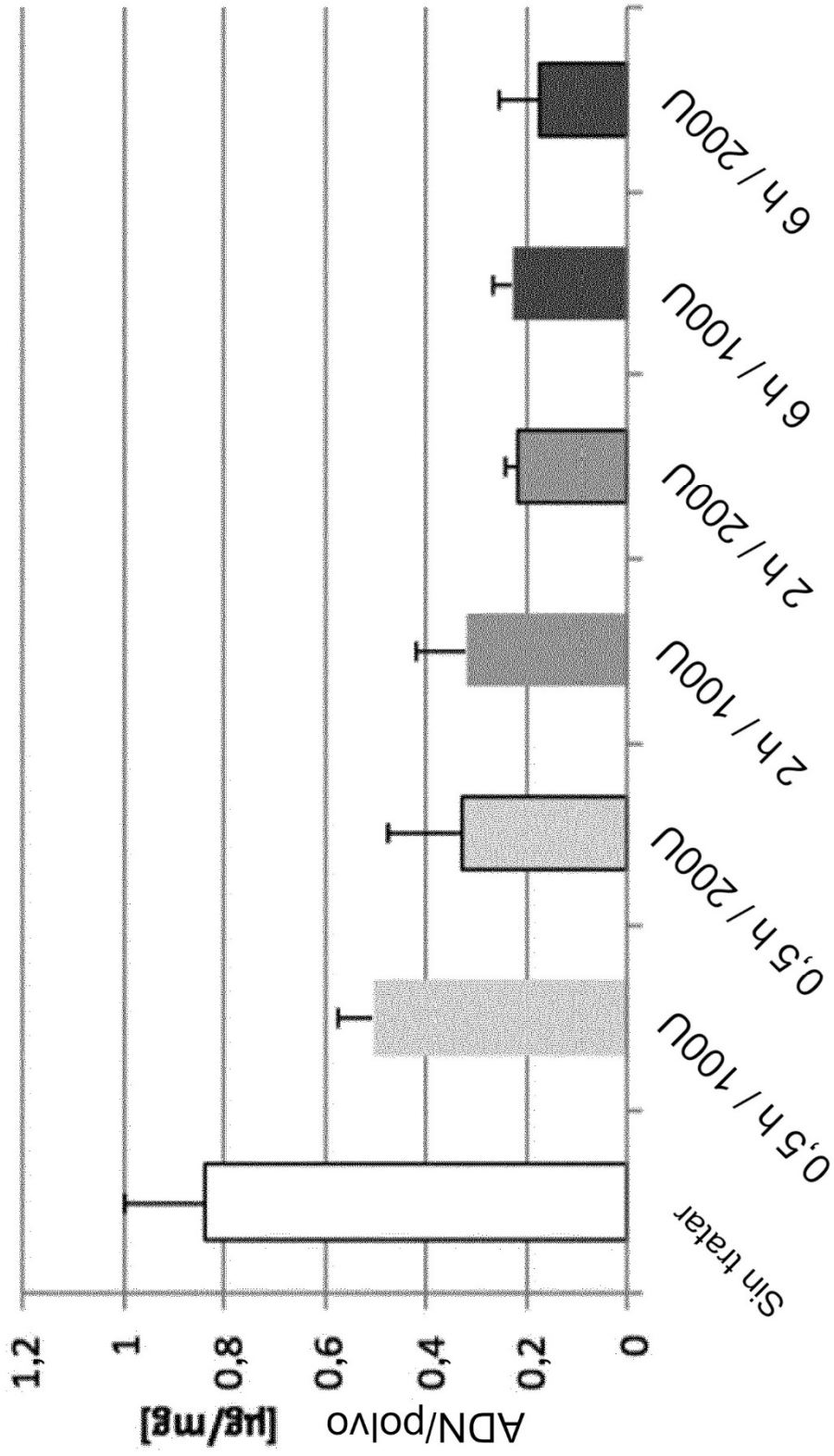
**FIG. 1C**



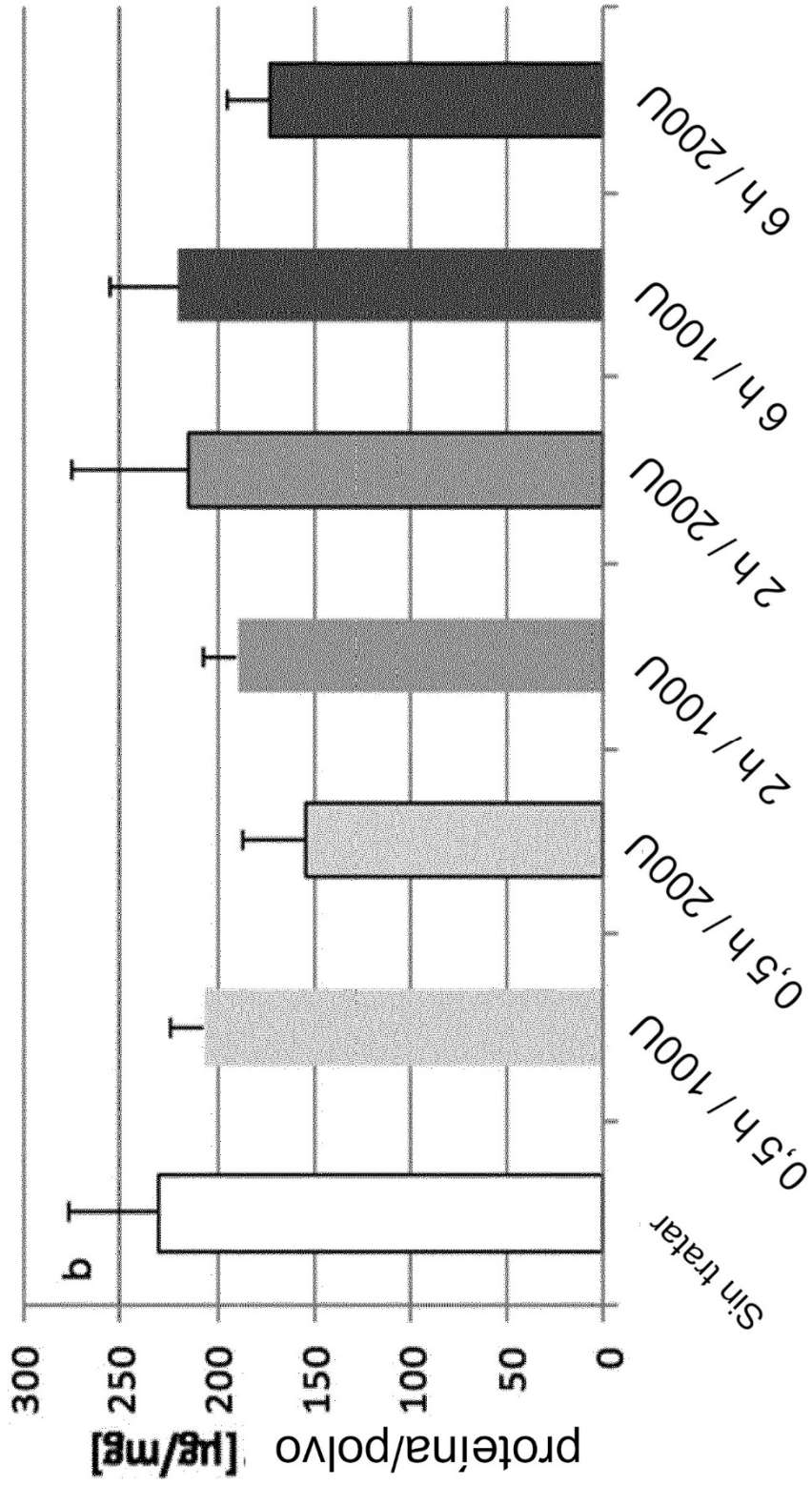
**FIG. 2**



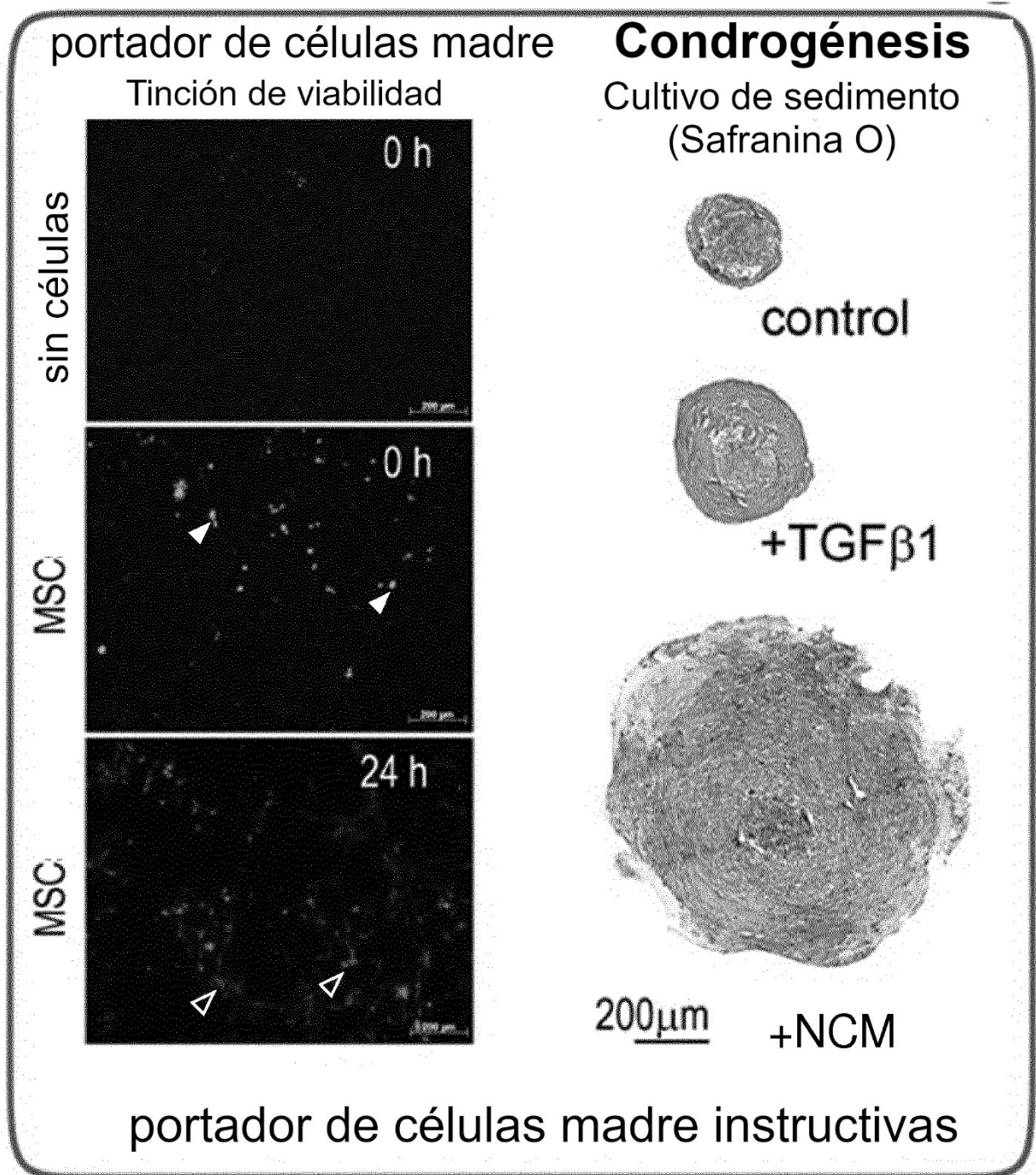
**FIG. 3**



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 5**

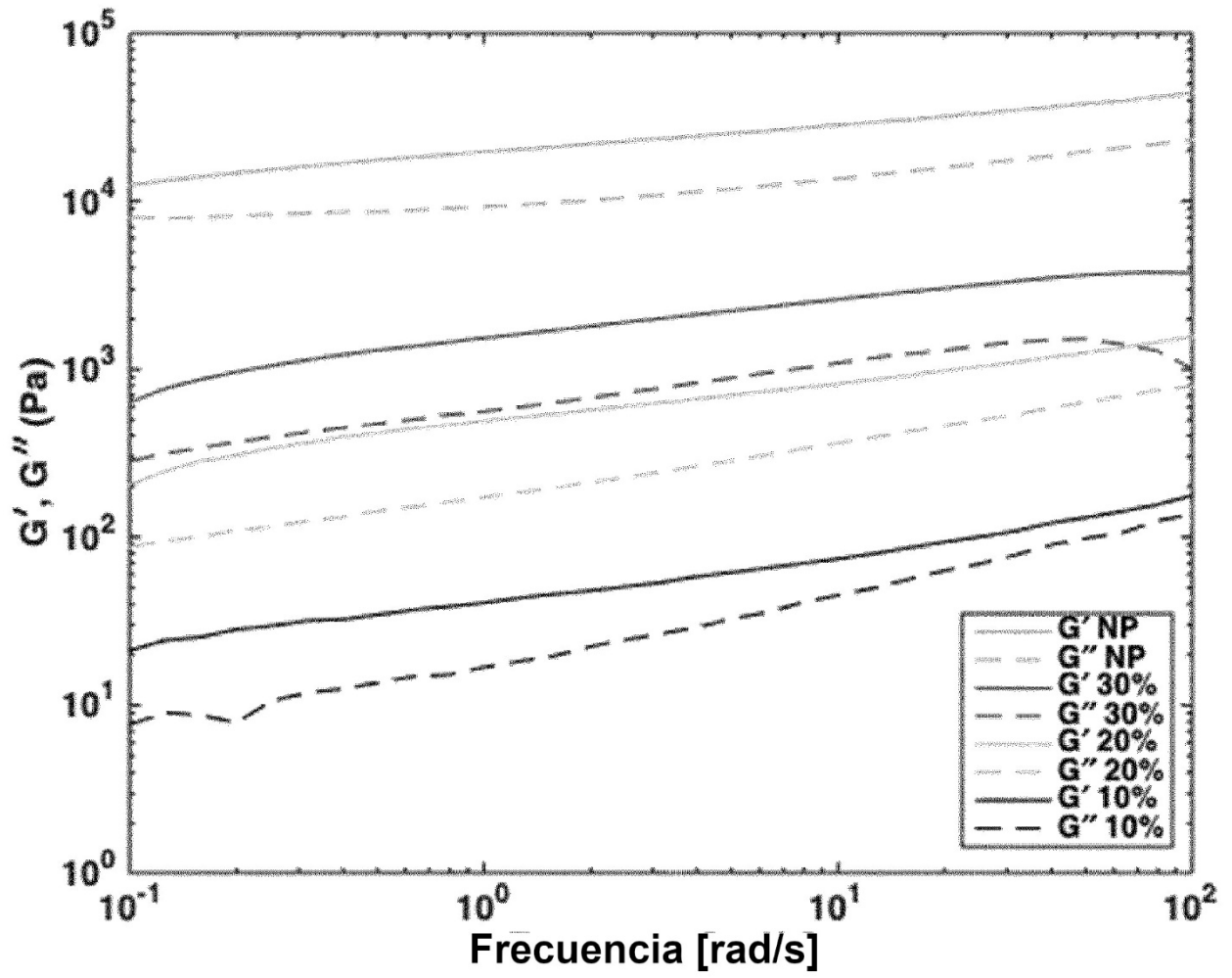


FIG. 6A

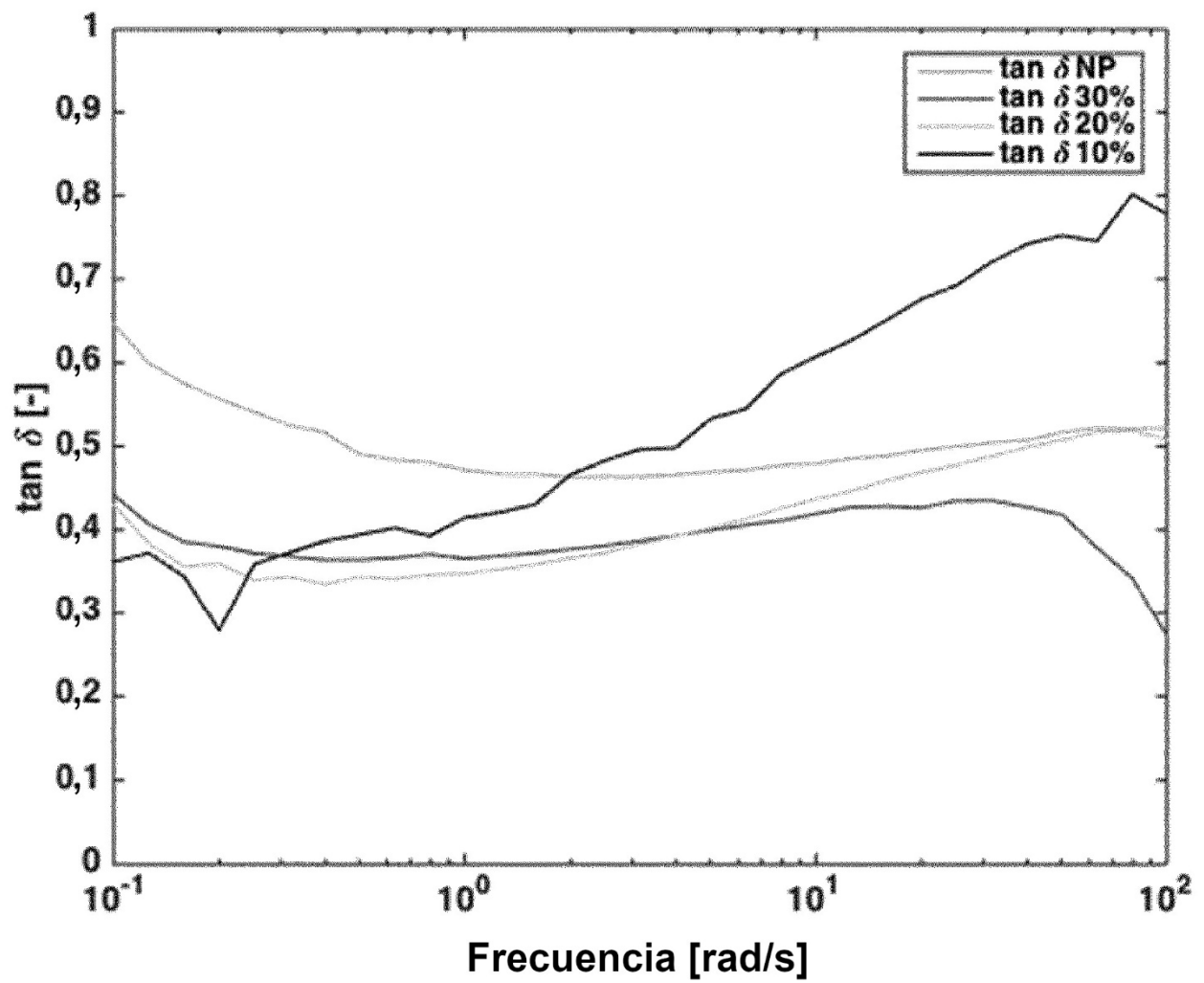
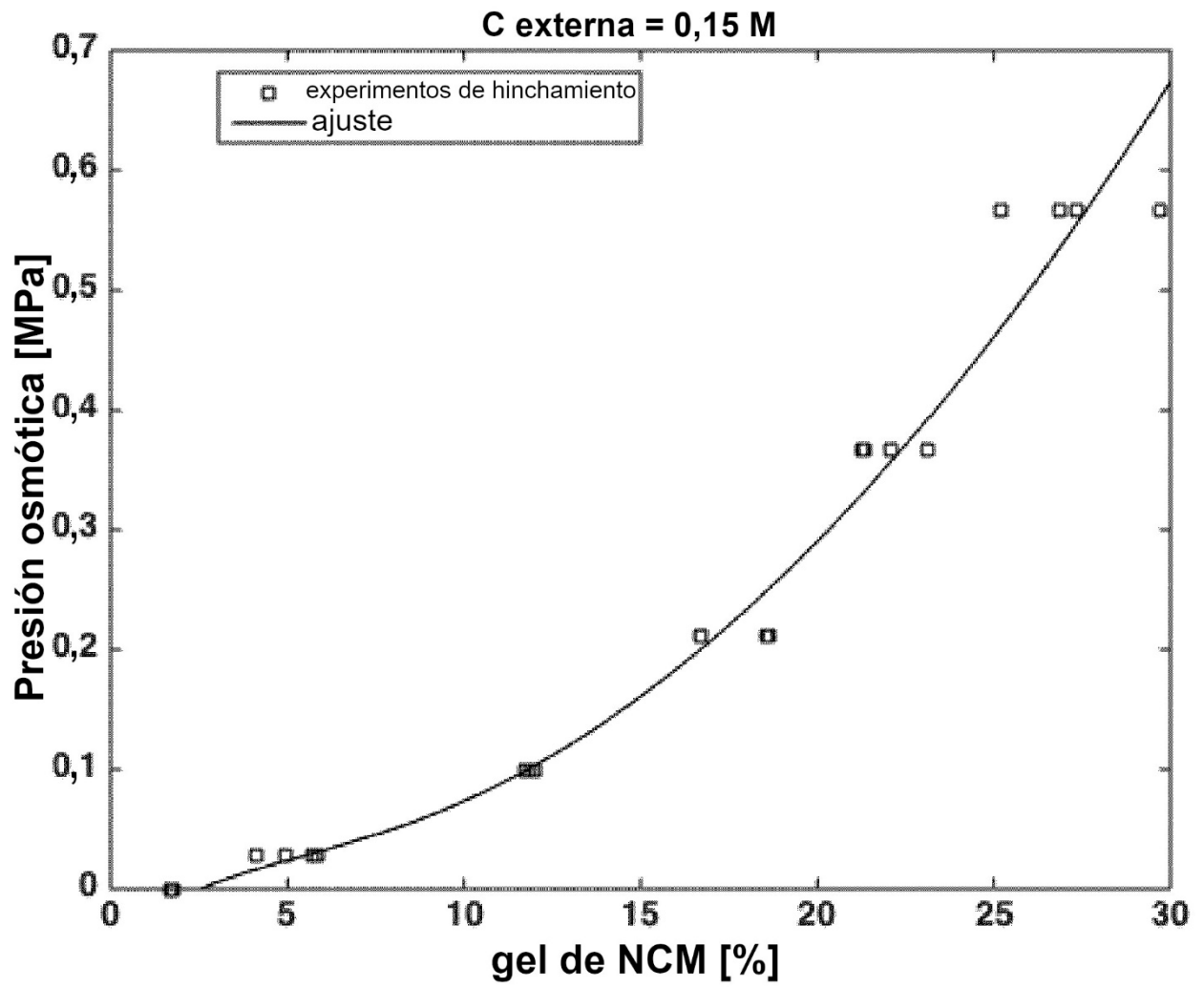


FIG. 6B



**FIG. 6C**