



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 837**

51 Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04808335 .6**

96 Fecha de presentación : **07.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1706132**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Una composición terapéutica para el cartílago y procedimiento de uso de la misma.**

30 Prioridad: **23.12.2003 KR 10-2003-0095340**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2011

73 Titular/es: **Sewon Cellontech Co., Ltd.
10, 11th, Goodmorning-Shinhan Tower
23-2, Yoido-dong
Youngdeungpo-gu, Seoul 150-712, KR**

72 Inventor/es: **Chang, Cheong-Ho;
Ko, Chang-Kwon;
Jang, Jae-Deog;
Lee, Eun-Young y
Choi, Jeong-Yong**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 837 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

Una composición terapéutica para el cartílago y procedimiento de uso de la misma

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición terapéutica para el cartílago, capaz de trasplantarse clínicamente a las articulaciones *articulatio genu* (articulación de la rodilla) o de los tobillos, en particular a una región sintomática clínicamente significativa de defectos del cartílago del cóndilo femoral (medial, lateral o troclear) y regiones de defecto del cartílago óseo del astrágalo (hueso del tobillo, en huéspedes humanos o animales) y un procedimiento de uso de la misma.

Antecedentes de la técnica

- 10 Generalmente, los tejidos de cartílago que constituyen las articulaciones vertebrales, una vez dañados, no se pueden regenerar a su estado original *in vivo*.

Cuando los tejidos de cartílago articular se dañan, la actividad diaria normal se ve limitada con dolor severo. El daño de tejido de cartílago articular inicial avanza hasta un estado crónico, denominado artritis degenerativa fatal, que interfiere con la vida normal.

- 15 Mientras tanto, con el fin de tratar el daño de cartílago articular, actualmente, un procedimiento de tratamiento es moler la superficie articular dañada volviéndola de esta manera suave u otro procedimiento es inducir microfracturas o hacer un pequeño agujero en la superficie articular.

- 20 Sin embargo, tales procedimientos tienen desventajas tales como la reaparición de síntomas dentro de varias semanas haciendo de esta manera imposible la vuelta a un estilo de vida normal. Adicionalmente, los tejidos fibrosos preparados a través de tales procedimientos de tratamiento son completamente diferentes cualitativamente de los tejidos de cartílago normal.

- 25 Además, cuando los tejidos del cartílago articular están dañados significativamente, la regeneración de las regiones del cartílago se hace imposible. Por lo tanto, cuando los tejidos del cartílago son incapaces de regenerarse debido a un estado gravemente dañado de los mismos, dados los procedimientos de tratamiento convencionales, el cartílago articular dañado se debe retirar completamente y reemplazar con una articulación artificial de metal o de plástico.

Hasta ahora, una técnica de reemplazo de articulación artificial de este tipo se conoce como el único procedimiento para tratar daño de cartílago que es demasiado grave para tratarse usando técnicas de regeneración.

- 30 Sólo en los Estados Unidos, se realizan 300.000 reemplazos de articulación de rodilla artificial de los mencionados anteriormente por año.

- 30 Sin embargo, el cartílago articular artificial es incapaz de uso permanente, ya que tiene una vida de servicio de aproximadamente 10 años como dispositivo. Adicionalmente, el precio del dispositivo es de más de 4.000 dólares imponiendo de este modo una carga económica pesada en los pacientes.

Además, la frecuencia de aparición de complicación para tal cartílago articular artificial es excesivamente elevada, siendo por tanto inaplicable a personas jóvenes activas.

- 35 Recientemente, con el fin de tratar cartílago articular artificial dañado, se ha dirigido una enorme atención al trasplante autólogo de condrocitos como un nuevo procedimiento de tratamiento basado en ingeniería de tejido.

Esta técnica se investigó por primera vez en el Hospital for Joint Diseases, en Nueva York, EE.UU. y se desarrolló adicionalmente por la Universidad de Gothenburg y el Sahlgrenska University Hospital en Suecia.

- 40 El trasplante autólogo de condrocitos es un procedimiento para tratar cartílago dañado en la articulación de un paciente, que implica recoger cartílago a partir de un área que soporta menos peso del paciente que sufre del cartílago dañado de las articulaciones de la rodilla seguido por la separación de condrocitos, cultivar los condrocitos separados para obtener una cantidad de condrocitos suficiente para tratar las regiones con defecto del cartílago y después trasplantar los condrocitos cultivados a las regiones de defecto de cartílago de los pacientes para restaurar el cartílago articular dañado.

- 45 La realización de este trasplante autólogo de condrocitos se verificó como un tratamiento de articulación fundamental en base a diversos resultados clínicos, pero necesariamente implica recoger un periostio en el momento del trasplante del agente terapéutico de condrocitos y después del trasplante en una parte afectada inyectar el agente terapéutico de condrocitos.

- 50 Adicionalmente, el trasplante autólogo de condrocitos tiene diversas desventajas tales como una incisión grande de la rodilla asociada con la recolección de periostio, la posibilidad de filtración del agente terapéutico de condrocitos debido a sutura incompleta entre el sitio quirúrgico y el periostio, consumo excesivo de tiempo en la sutura entre el

periostio y la región de defecto articular, y similares.

Divulgación

Problema técnico

5 Por lo tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores y es un objeto de la presente invención proporcionar una composición terapéutica para cartílago, capaz de resolver la dificultad debido a la recolección de periostio, sutura, sutura incompleta entre el periostio y el sitio trasplantado e incisión grande y el tiempo necesario para cirugía, tras el trasplante del agente terapéutico del cartílago y un procedimiento de uso de la misma.

10 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición terapéutica para cartílago que proporcione efectos de pérdida mínima de agente terapéutico de cartílago debido al uso combinado y la solidificación de componentes de condrocitos, trombina y un componente de matriz de fibrinógeno, efectos de regeneración de cartílago más completos mediante la interacción entre la matriz de fibrinógeno y las células, reducción del tiempo de operación quirúrgica y la utilización de un artroscopio y un procedimiento de uso de la misma.

Solución técnica

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los objetos anteriores y otros objetos se pueden conseguir proporcionando una composición terapéutica para cartílago que comprende una mezcla de componentes de condrocitos aislados y expandidos o diferenciados a partir de un huésped, trombina y una matriz de fibrinógeno.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de uso de una composición terapéutica para cartílago, que comprende:

- 20 preparar componentes de condrocitos aislados y expandidos o diferenciados a partir de un huésped;
- preparar trombina;
- preparar una matriz de fibrinógeno;
- tratar una región de defecto de cartílago; y
- 25 mezclar los componentes de condrocito, trombina y matriz de fibrinógeno e inyectar la mezcla resultante en la región de defecto del cartílago.

Descripción de los dibujos

Los objetos anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los cuales:

30 La Figura 1 es un gráfico que muestra la resistencia de una matriz para trasplantar condrocitos de acuerdo con la presente invención, con respecto a una concentración de inyección de fibrinógeno y trombina;

 La Figura 2 es una fotografía de una matriz cuando se inyectó fibrinógeno en una cantidad de 200 mg/ml (A), 160 mg/ml (B) y 20 mg/ml, respectivamente, en la Figura 1;

 La Figura 3 es una fotografía que muestra la región de defecto de cartílago recortada en la que se trasplantó una matriz de acuerdo con la presente invención;

35 La Figura 4 es una fotografía que muestra un sitio trasplantado en el que se trasplanta una matriz de acuerdo con la presente invención;

 La Figura 5 es una fotografía que muestra un estado de inyección de una composición terapéutica para cartílago después de sutura de periostio de acuerdo con otro ejemplo de la presente invención;

40 La Figura 6 es una fotografía que muestra un estado de inyección de una composición terapéutica para cartílago después de formar previamente un agujero de conexión en una región de defecto de cartílago de acuerdo con otro ejemplo de la presente invención;

 La Figura 7 es una fotografía que muestra patrones de diferenciación de condrocitos en una matriz de fibrinógeno de acuerdo con la presente invención; y

45 La Figura 8 es una fotografía que muestra patrones de diferenciación de condrocitos en una matriz de fibrinógeno que contiene colágeno al 10% y ácido hialurónico al 10% de acuerdo con otro ejemplo de la presente invención.

Mejor modo

A continuación, se describirá la presente invención con mayor detalle.

La presente invención puede mejorar, mantener y restaurar las funciones de tejidos mediante el uso de ingeniería de

tejido que implica el reemplazo de tejido y órganos.

De acuerdo con la presente invención que usa ingeniería de tejido, se proporciona una composición terapéutica para cartílago formada mediante la mezcla de componentes de condrocitos aislados y expandidos o diferenciados a partir de un huésped tal como un ser humano o un animal y trombina y una matriz de fibrinógeno.

- 5 Adicionalmente, la presente invención requiere una matriz en la cual se pueden incluir células específicas y factores de crecimiento como un reemplazo de tejido y usa componentes *in vivo* como una matriz, tales como constituyentes de matriz extracelular (ECM) y un polímero natural como un reemplazo de matriz.

La interacción entre los condrocitos y la matriz promueve directamente la adhesión, migración, crecimiento, diferenciación y apoptosis celular.

- 10 Además, tal interacción regula la actividad de citoquinas y factores del crecimiento y activa un procedimiento de transducción de señal intracelular que da como resultado el crecimiento rápido y el restablecimiento de tejidos de interés.

- 15 Mientras tanto, un procedimiento de uso de una composición terapéutica para cartílago de acuerdo con la presente invención implica preparar componentes de condrocitos aislados y expandidos o diferenciados a partir de seres humanos o animales y preparar trombina que se usa como un factor de coagulación.

Esto viene seguido por la preparación de una matriz de fibrinógeno que se tiene que mezclar con los componentes de condrocito y la trombina, es decir, componentes tales como fibrinógeno, colágeno, ácido hialurónico, glicosaminoglicano (en los sucesivos en el presente documento, "GAG") y aprotinina.

- 20 En este sentido, como la matriz de fibrinógeno que necesariamente contiene fibrinógeno, se puede usar fibrinógeno en solitario en una concentración apropiada o la matriz de fibrinógeno se puede formar mezclando fibrinógeno y otros componentes de matriz tales como colágeno, ácido hialurónico, GAG y aprotinina en una proporción adecuada.

- 25 La aprotinina sirve para inhibir la degradación de fibrinógeno por plasmina, posibilitando de ese modo una forma del agente terapéutico de cartílago (una mezcla de trombina, componentes de condrocito y fibrinógeno) que se ha de mantener en una forma predeterminada, durante un periodo de tiempo mayor, cuando los componentes del agente terapéutico de cartílago se mezclan y solidifican.

En este momento, la región de defecto de cartílago, a la cual se trasplantará el agente terapéutico de cartílago, en primer lugar se recorta y después se realiza un agujero que tiene un diámetro de 2 a 3 mm y una profundidad de 3 a 5 mm dentro de un sitio de trasplante para trasplantar, seguido por pulverización de trombina.

- 30 Después, el agente terapéutico de cartílago compuesto de una mezcla de componentes de condrocito, trombina y una matriz de fibrinógeno se inyecta en la región de defecto del cartílago en la que se pulverizó trombina.

Posteriormente, se pulveriza una concentración elevada de trombina para el injerto y el mantenimiento de la forma del agente terapéutico de cartílago en el lado superior de la región de defecto del cartílago en el que se ha inyectado el agente terapéutico de cartílago.

- 35 En la presente invención, los componentes de condrocito se preparan y usan separando los condrocitos de tejido de cartílago normal usando una enzima adecuada e incubando las células separadas en un medio de cultivo para obtener un cultivo que contiene más de 10^6 células/ml.

- 40 Adicionalmente, el fibrinógeno se restablece a su estado original a partir de fibrinógeno liofilizado usando medios de cultivo celular convencionales tales como DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco), medio F-12 de Ham, DMEM/F-12, IMDM (Medio de Dulbecco Modificado de Iscove), Medio 5A de McCoy, MEM (Medio Esencial Mínimo), α -MEM, medio RPMI 1640, Medio L-15 de Leibovitz y Medio basal de Eagle.

La trombina también se restablece a su estado original a partir de trombina liofilizada usando los medios de cultivo mencionados anteriormente incluyendo medio DMEM.

Además, la matriz de fibrinógeno se forma mezclando fibrinógeno con al menos uno de colágeno, ácido hialurónico y GAG y aprotinina en una concentración predeterminada.

- 45 En este sentido, el fibrinógeno es una sustancia presente en la sangre, que juega un papel en la coagulación ya que reacciona con trombina y después se convierte en fibrina que después se coagula mediante CaCl_2 y un factor XIII añadido a trombina, consiguiendo de esta manera una función hemostática.

- 50 Adicionalmente, el medio de cultivo para lisar el fibrinógeno liofilizado puede contener menos del 10% de FBS (suero fetal bovino), FCS (suero fetal de ternero), suero de ternero, suero de caballo o suero humano y con el fin de prevenir la infección con microorganismos, se pueden añadir antibióticos tales como penicilina G, kanamicina, gentamicina y estreptomycinina o agentes antifúngicos tales como anfotericina B y nistatina al mismo en una cantidad apropiada.

Adicionalmente, como los medios de cultivo para lisar el fibrinógeno liofilizado, se pueden usar todos los medios convencionales para cultivo celular incluyendo medio 5A de McCoy, Medio basal de Eagle, medio esencial mínimo de Glasgow, medio F-12 de Ham, medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio L-15 de Leibovitz y medio RPMI 1640.

- 5 En una realización específica de la matriz de fibrinógeno, el fibrinógeno se usa en solitario dentro de una concentración de 20 mg/ml a 200 mg/ml, dependiendo de las condiciones de un sitio de trasplante y del paciente.

10 Cuando está presente en concentración elevada, el fibrinógeno es relativamente duro y forma una matriz densa, pero conduce a un tiempo de degradación aumentado que da como resultado la sensación de materia extraña en el organismo después del uso del mismo. Por el contrario, cuando está presente en una concentración baja, la degradación de fibrinógeno dentro del tejido avanza rápidamente, pero se forma una matriz suelta, dando como resultado de este modo dificultad de reemplazo con cartílago.

Además, la matriz de fibrinógeno puede contener 0,01 mg/ml a 20 mg/ml de colágeno, 0,1 mg/ml a 20 mg/ml de ácido hialurónico y 0,1 mg/ml a 20 mg/ml de GAG (glicosaminoglicano) y 1 a 3.000 KUI/ml de aprotinina en solitario o en cualquier combinación de los mismos, además de 20 mg/ml a 200 mg/ml de fibrinógeno.

- 15 El colágeno, ácido hialurónico, GAG y aprotinina mencionados anteriormente son sustancias presentes en animales huéspedes e incluso cuando las mismas se administran por encima de una concentración predeterminada, los efectos sobre las células no varían significativamente pero el tiempo de endurecimiento aumenta lo que conduce al retardo del tiempo de operación quirúrgica.

20 Adicionalmente, la aprotinina es una sustancia que inhibe la degradación de fibrina *in vivo* y por lo tanto ayuda en una función hemostática y cuando la cantidad añadida de la aprotinina aumenta, la velocidad de degradación de la fibrina disminuye. Por lo tanto, es posible controlar una velocidad de degradación de la matriz ajustando la concentración de aprotinina.

25 En general, el cartílago de los animales vertebrados consiste en condrocitos y una matriz. La matriz está compuesta en gran parte por GAG que contiene colágeno y ácido hialurónico y no tiene vasos sanguíneos de tal modo que recibe los nutrientes del líquido sinovial.

El componente principal del líquido sinovial es el ácido hialurónico y, por lo tanto, el uso de una mezcla que contiene un componente de este tipo proporciona capacidades de regeneración de cartílago excelentes.

30 0,01 UI/ml a 50 UI/ml de la trombina preparada se mezclan en el agente terapéutico de cartílago de la presente invención y por lo tanto, cuando se mezclan componentes de cartílago con la matriz de fibrinógeno, la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina.

Por lo tanto, ajustando la concentración de la trombina añadida a la mezcla del agente terapéutico del cartílago, es posible controlar una velocidad de endurecimiento del agente terapéutico de cartílago y también controlar las propiedades físicas de la matriz de fibrinógeno.

35 Cuando la concentración de trombina es baja, la matriz está compuesta de materiales fibrosos gruesos y tiene un tamaño de poro grande. Por lo tanto, es provechoso incorporar células y materiales fisiológicamente activos pero esto conduce al retardo del tiempo de endurecimiento impidiendo de este modo la consecución de los objetos deseados.

40 Por el contrario, cuando la concentración de trombina es elevada, la matriz está compuesta de materiales fibrosos delgados y tiene un tamaño de poro pequeño. Por lo tanto, es provechoso para permitir el crecimiento interno fácil mientras que bloquea la penetración de células, pero esto conduce a un tiempo de endurecimiento rápido que da como resultado funcionalidad extremadamente baja debido al endurecimiento de la matriz durante la mezcla de los componentes respectivos.

45 Por lo tanto, la concentración de trombina está preferentemente dentro del intervalo de 0,01 UI/ml a 50 UI/ml y la trombina inyectada se endurece de 1 a 10 min. Adicionalmente, preferentemente, cuando la trombina se mezcla con la matriz de la presente invención, la trombina se usa a una concentración baja y cuando se usa antes o después de la inyección de la composición, la trombina se usa a una concentración elevada.

Como un resultado, es posible obtener una matriz que tenga resistencia mecánica y flexibilidad adecuada para regeneración de tejidos de cartílago.

50 También es posible modificar fácilmente la forma de la matriz de forma que la misma se adapte a las diversas configuraciones posibles presentes en la región de cartílago dañado, potenciando de ese modo la comodidad de la operación quirúrgica asociada y también permitiendo que la matriz se posicione continuamente en una región dañada mientras se mantiene una forma predeterminada de la misma después del trasplante, conduciendo a la promoción de expansión y diferenciación *in vivo* de los condrocitos injertados.

En la región de defecto del cartílago en la que se ha de trasplantar una composición para trasplantar condrocitos de

a cuerdo con la presente invención, la región de defecto en primer lugar se recorta, se realizan cero a cinco agujeros que tienen un diámetro de 2 a 3 mm y una profundidad de aproximadamente 3 a 5 mm dentro del sitio de trasplante dependiendo del tamaño de la parte afectada, seguido por restañado y después 100 UI/ml a 1.000 UI/ml de trombina de concentración elevada se pulverizan sobre la superficie de la parte afectada para aumentar la adhesividad del agente terapéutico de cartílago.

En este momento, la trombina sirve para inducir la unión próxima entre el agente terapéutico de cartílago y la región de defecto de cartílago a la que el agente terapéutico del cartílago se tiene que trasplantar, aumentando de este modo la densidad de regeneración del cartílago a la vez que soporta impacto externo.

Adicionalmente, una composición terapéutica para cartílago se inyecta en una región de defecto de cartílago de un paciente humano o animal.

La inyección de la composición terapéutica del cartílago se realiza mediante inyección lenta en la parte perforada de la región de defecto de cartílago seguido por inyección para rellenar todas las partes de defecto restantes.

Debido a que el tiempo necesario para la conversión de fibrinógeno en fibrina a continuación de la mezcla entre fibrinógeno y trombina es dependiente de la concentración, el agente terapéutico de cartílago se inyecta en la región de defecto dentro de un periodo de tiempo adecuado entre aproximadamente 1 y 10 min.

Además, cuando se trasplanta la composición terapéutica para cartílago en la región de defecto de cartílago, 100 UI/ml a 1.000 UI/ml de trombina de concentración elevada se pulverizan sobre la composición terapéutica para cartílago trasplantada compuesta de componentes de condrocito, trombina y fibrinógeno, con el fin de ayudar al injerto y al mantenimiento de la forma del mismo, formando de ese modo una película protectora para proteger el agente terapéutico de cartílago durante la regeneración del cartílago.

El sitio trasplantado se deja durante aproximadamente 5 min de forma que se endurezca completamente durante la conversión de fibrinógeno en fibrina mediante la acción de trombina.

Modo de invención

Ahora, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del alcance y el espíritu de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo Experimental 1

Con el fin de determinar las propiedades fisicoquímicas apropiadas de diversas matrices usadas en el trasplante de un agente terapéutico de cartílago, se lisó trombina liofilizada disponible en el mercado hasta una concentración de 2 UI/ml a 10 UI/ml.

Se añadieron 2 UI/ml a 10 μ l/ml de trombina para convertir fibrinógeno, una matriz principal, en fibrina.

Adicionalmente, se añadieron respectivamente colágeno, ácido hialurónico y GAG a 0,01 mg/ml a 20 mg/ml, 0,1 mg/ml a 20 mg/ml y 0,1 mg/ml a 20 mg/ml para preparar la matriz respectiva.

Cada matriz preparada de este modo se mezcló y se midió la dureza, la resistencia y la resistencia a la flexión resultante de la misma.

En primer lugar, 1 ml de fibrinógeno que tiene una concentración de 20 mg/ml a 200 mg/ml y 1 ml de trombina que tiene una concentración de 2 UI/ml a 10 UI/ml se mezclaron y se midió la dureza y la resistencia de la composición respectiva resultante.

Adicionalmente, el agente terapéutico de cartílago práctico y la matriz que tiene la concentración mencionada anteriormente se mezclaron y después se midió la resistencia de la composición resultante.

Como resultado, como se muestra en la Figura 1, a través de diversos ensayos clínicos, cuando se trasplanta una composición terapéutica para cartílago que consiste en una mezcla de componente de condrocito-trombina-fibrinógeno, una resistencia adecuada de la misma fue aproximadamente 160 a 170 g/cm². En base a los resultados medidos como se ha descrito anteriormente, la resistencia de la composición se obtuvo de la manera siguiente: 166 g/cm² para 2 UI/ml de trombina y 20 mg/ml de fibrinógeno; 170 g/cm² y 165 g/cm² para 4 UI/ml de trombina y 160 mg/ml y 200 mg/ml de fibrinógeno, respectivamente; 170 g/cm² y 166 g/cm² para 8 UI/ml de trombina y 160 mg/ml y 200 mg/ml de fibrinógeno, respectivamente; y 171 g/cm² y 169 g/cm² para 10 UI/ml de trombina y 160 mg/ml y 200 mg/ml de fibrinógeno, respectivamente. Por consiguiente, se obtuvieron las concentraciones de fibrinógeno y trombina para trasplante y las características mostradas en la Figura 2.

Las diferencias entre las propiedades físicas con respecto a las concentraciones de fibrinógeno de la composición

presentaron las características mostradas en la fotografías de la Figura 2 (A: 200 mg/ml, B: 160 mg/ml, y C: 20 mg/ml de izquierda a derecha).

5 Cuando se midió la dureza de cada composición en la que cada matriz, es decir colágeno, ácido hialurónico y GAG se mezclaron con concentraciones apropiadas de fibrinógeno y trombina, la resistencia medida de la composición terapéutica para cartílago que consiste en una mezcla de componente de condrocito-trombina-fibrinógeno, a la cual se añadieron ácido hialurónico, colágeno y GAG, respectivamente, fue aproximadamente 154 a 159 g/cm², con una disminución de aproximadamente 1 a 6 g/cm² en la resistencia, en comparación con los resultados medidos anteriormente.

10 Tal disminución en la resistencia se puede controlar ajustando las concentraciones de componentes de matriz tales como colágeno, ácido hialurónico y GAG o usando cualquier combinación de los mismos.

Adicionalmente, ya que la composición de la matriz varía dependiendo de las concentraciones y características del paciente, el intervalo mencionado anteriormente de concentraciones de fibrinógeno y trombina se usa en combinación con componentes de matriz tales como colágeno, ácido hialurónico y GAG.

15 Además, los efectos de generación de cartílago se pueden obtener mediante la adición de colágeno o ácido hialurónico en el caso de pacientes de edad avanzada y mediante el uso de composición en combinación con GAG y ácido hialurónico en el caso de pacientes jóvenes que sufren de trauma grave, por ejemplo, debido a un accidente de tráfico.

Ejemplo Experimental 2

20 El tiempo de polimerización necesario para impartir al fibrinógeno y trombina inyectados la resistencia de 160 a 170 g/cm², adecuado para uso como agente terapéutico de cartílago se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Conc. de Fibrinógeno (mg/ml) \ Conc. de Trombina (UI/ml)	Conc. de Trombina (UI/ml)			
	2	4	8	10
20	225	213	160	118
40	246	236	181	126
80	281	275	208	179
120	312	299	231	199
160	359	325	269	216
200	379	367	301	290

25 Es decir, una concentración baja de trombina mostró un tiempo de polimerización lento y formó una estructura fibrosa delgada que tiene un tamaño de poro de más de aproximadamente 5 µm, mientras que una concentración elevada de trombina mostró un tiempo de polimerización rápido y formó una estructura que tiene una estructura de poro pequeño de menos de aproximadamente 1 µm.

Adicionalmente, se puede observar que la composición compuesta de trombina y fibrinógeno tomó de 2 a 7 minutos para mostrar una resistencia de 150 a 180 g/cm², adecuada para uso en el agente terapéutico de cartílago.

Ejemplo 1

30 Inyección de composición terapéutica para cartílago mediante artroscopio

En primer lugar, se recogió tejido de cartílago a partir de un huésped animal o humano y se aislaron condrocitos a partir del tejido. Después, las células aisladas se cultivaron para preparar un agente terapéutico de cartílago que consistía en 0,3 a 0,5 ml de DMEM y 9x10⁶ a 1,5x10⁷ condrocitos.

35 Después, como un producto médico disponible en el mercado se preparó un sellador de fibrina y se añadió un DMEM a un vial que contenía fibrinógeno liofilizado de forma que el fibrinógeno se lisó hasta una concentración de 100 mg/ml a 200 mg/ml.

Adicionalmente, la trombina liofilizada se lisó hasta una concentración de 500 UI/ml y después la solución de trombina resultante se añadió al agente terapéutico de cartílago en la concentración de 1 UI/ml a 10 UI/ml.

5 Después de la finalización del procedimiento mencionado anteriormente, una región de defecto de cartílago de la rodilla del paciente estuvo lista para el trasplante mediante el corte de la región de defecto de cartílago usando el artroscopio.

A continuación, la región de cartílago dañado del paciente se cortó limpiamente usando instrumentos quirúrgicos y después se realizaron tres a cinco agujeros que tienen un diámetro de 3 mm y una profundidad de 5 mm dentro de la región dañada usando un taladro quirúrgico, dependiendo del tamaño del área de defecto.

10 Después, se retiraron los residuos de cartílago y hueso de la región de defecto y se restañaron para finalizar las etapas necesarias para el trasplante.

Después de la finalización de las etapas necesarias para el trasplante, los componentes de condrocito, trombina y una matriz que contiene al menos fibrinógeno se mezclaron para preparar un agente terapéutico de cartílago.

Con respecto a esto, ya que el fibrinógeno reacciona con trombina seguido por conversión en fibrina que a su vez se coagula, el agente terapéutico de cartílago se debe trasplantar en 5 minutos a un sitio de trasplante.

15 Posteriormente, 500 UI/ml de la solución de trombina preparada previamente se pulverizaron en el sitio de trasplante de la composición terapéutica para cartílago usando una boquilla y después de secó suavemente con una gasa.

Después, la composición terapéutica para cartílago, compuesta de una mezcla de componentes de condrocito, trombina y fibrinógeno, se inyectó lentamente usando una jeringa a través de los agujeros perforados previamente en la parte afectada de la zona completa en secuencia.

20 La inyección de la composición se debe realizar rápidamente sin formación de burbujas e inmediatamente después de la finalización de la inyección, se pulverizaron igualmente 500 UI/ml de solución de trombina de concentración elevada usando la boquilla.

Ejemplo 2

25 Trasplante de agente terapéutico de cartílago en el que se añadió colágeno a una composición de componentes de condrocito, trombina y mezcla de fibrinógeno, bajo artroscopio

Como se ha descrito anteriormente, se prepararon componentes de condrocito, trombina y fibrinógeno.

Con el fin de reforzar la elasticidad y para obtener efectos de regeneración de cartílago en un paciente que muestra elasticidad articular reducida, se puede usar una matriz de fibrinógeno mezclada con colágeno para trasplante.

30 La matriz de fibrinógeno está hecha de fibrinógeno y colágeno, ácido hialurónico y GAG añadidos a la misma. Tras el uso combinado de fibrinógeno y colágeno, para un paciente hombre de 50 años de edad, se puede usar una décima o una quinta parte de la concentración de colágeno en solitario o en una mezcla, con relación a la concentración de matriz de fibrinógeno, aunque la concentración de colágeno varía dependiendo de las condiciones del paciente.

35 Por ejemplo, en el caso de la matriz para trasplante en un paciente hombre de 52 años de edad, se prepararon fibrinógeno y colágeno a concentración de 80 mg/ml a 160 mg/ml y concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml, respectivamente. Después, 0,3 ml de fibrinógeno y 0,1 ml de colágeno se mezclaron para preparar una matriz de fibrinógeno para trasplante.

40 A continuación, se realizó un agujero para insertar un artroscopio en la parte afectada, como en el Ejemplo1 y el artroscopio se insertó después a través del mismo para recortar limpiamente el sitio de trasplante. Después el trasplante estuvo listo realizando aproximadamente 4 agujeros que tienen un diámetro de 3 mm y una profundidad de 5 mm en la parte afectada (el tamaño de la lesión del paciente es aproximadamente 4 cm²).

Posteriormente, se añadió 1 UI/ml a 10 UI/ml de trombina a componentes de condrocito y después, la composición terapéutica para cartílago, en la que se mezcló la matriz de fibrinógeno que contiene una mezcla de componentes de condrocito y colágeno, se inyectó y rellenó en la región de defecto de cartílago.

45 Los procedimientos posteriores son los mismos que en el Ejemplo 1.

Mientras tanto, cuando se trasplanta la matriz de fibrinógeno formada añadiendo otras mezclas al fibrinógeno, los tipos de las mezclas añadidas al fibrinógeno pueden variar dependiendo de las condiciones y edad del paciente. Para pacientes de edad avanzada, los componentes de matriz tales como colágeno y ácido hialurónico se pueden mezclar y usar con el agente terapéutico de cartílago.

50 La Figura 7 muestra el patrón de diferenciación de condrocitos en la matriz de fibrinógeno como se ha descrito

anteriormente. Los patrones de diferenciación de condrocitos en la matriz de fibrinógeno que contiene colágeno al 10% y ácido hialurónico al 10% se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 3

Inyección de una composición terapéutica para cartílago usando periostio

5 En primer lugar, se recogió tejido de cartílago a partir de un paciente y se aislaron condrocitos a partir de tejido y se cultivaron. Esto se siguió por preparación de un agente terapéutico de cartílago que consiste en más de aproximadamente $1,2 \times 10^7$ condrocitos y 0,4 ml de DMEM.

Después, como un producto médico disponible en el mercado, se preparó un sellador de fibrina y se añadió DMEM a un vial que contenía fibrinógeno liofilizado de forma que el fibrinógeno se disolvió hasta una concentración de 50 mg/ml a 80 mg/ml.

Adicionalmente, se añadió DMEM a un vial que contiene trombina liofilizada de forma que la trombina se disolvió hasta una concentración de 500 UI/ml.

Después, se recortó suavemente un sitio para trasplante de una composición terapéutica para cartílago usando un instrumento quirúrgico.

15 Después de la finalización del procedimiento mencionado anteriormente, se recogió un periostio de la rodilla del paciente y después se suturó cuidadosamente en el sitio de trasplante.

Después de la finalización de la sutura, se aplicó un sellador al sitio suturado.

Después, se determinó si la integridad de estanqueidad del periostio suturado estaba completa o no.

20 A continuación, se añadió a los componentes de condrocito preparados previamente una solución de trombina disuelta en la concentración de 1 UI/ml a 10 UI/ml, seguido por buena mezcla.

A continuación, 0,4 ml de los componentes de condrocitos mezclados con trombina se mezcló bien con 0,4 ml de una solución de fibrinógeno para formar una composición de trasplante. La composición resultante se inyectó en el periostio de la parte afectada usando una jeringa, como se muestra en la Figura 5.

25 Con respecto a esto, debido a que el fibrinógeno reacciona con trombina seguido por conversión en fibrina que a su vez se coagula, la inyección se debe realizar rápidamente.

Ejemplo 4

Inyección de una composición hecha de una mezcla de matriz de fibrinógeno en la que se ha añadido ácido hialurónico y GAG a componentes de fibrinógeno y celulares a los cuales se ha añadido trombina

30 Se recogió una parte de tejido de cartílago de un hombre de 27 años de edad que sufre de daño de cartílago debido a un accidente de tráfico y se cultivó para preparar aproximadamente 3×10^7 células/ml.

Como constituyentes de una matriz de fibrinógeno, se prepararon 50 mg/ml a 100 mg/ml de fibrinógeno, 10 mg/ml de ácido hialurónico y 5 mg/ml a 10 mg/ml de GAG.

35 Debido a que la lesión del paciente debido al daño del cartílago que se produjo como resultado del accidente de tráfico tenía un tamaño de 4 a 8 cm², se mezclaron 0,5 ml de 50 mg/ml a 100 mg/ml de fibrinógeno, 0,2 ml de 10 mg/ml de ácido hialurónico y 0,2 ml de 5 mg/ml a 10 mg/ml de GAG.

Un sitio para el trasplante del agente terapéutico del cartílago se recortó limpiamente y se realizaron dos a cinco agujeros que tenían un diámetro de 3 mm y una profundidad de 5 mm, dependiendo del tamaño del área dañada.

Después, se prepararon componentes de condrocito mezclados con 5 UI/ml de trombina y una matriz de fibrinógeno mezclada de tres componentes.

40 Posteriormente, 500 UI/ml de trombina de concentración elevada se pulverizaron igualmente sobre el sitio de trasplante usando una boquilla. Después, 0,9 ml de componente de condrocito y la matriz de fibrinógeno mezclada de tres componentes se mezclaron.

La composición hecha del componente de condrocito mezclado con la matriz de fibrinógeno (ácido hialurónico + GAG) se aplicó lentamente a través de los agujeros del sitio de trasplante.

45 Nuevamente, 500 UI/ml de trombina de concentración elevada se pulverizaron sobre el sitio de trasplante y se dejaron durante aproximadamente 5 min. El procedimiento de trasplante se finalizó con la terminación del endurecimiento.

Con respecto a esto, debido a que el paciente joven muestra buena elasticidad de tejidos de cartílago pero tiene menos uniformidad de la parte de cartílago debido al trauma, el uso de ácido hialurónico o GAG puede aliviar tal desventaja promoviendo de este modo una regeneración de cartílago fácil.

Aplicabilidad industrial

5 Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con la presente invención se proporcionan ventajas tales como la prevención de filtración de agente terapéutico de cartílago, un procedimiento quirúrgico simplificado para mantener una forma predeterminada y la capacidad de mantener excelente generación de cartílago debido a la combinación de trasplante de componentes de matriz *in vivo*.

10 Además, se proporcionan efectos tales como reducción del tiempo de operación quirúrgica cuando no se sutura el periostio, un procedimiento quirúrgico simplificado debido a la utilización de un artroscopio, capacidad de mantener una regeneración de cartílago excelente debido al trasplante de combinación con componentes de matriz *in vivo* y sin necesidad de incisión en la rodilla.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito con fines ilustrativos, los expertos en la materia apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica para cartílago que comprende una mezcla de componentes de condrocitos aislados y expandidos o diferenciados a partir de un huésped, y trombina y una matriz de fibrinógeno que contiene fibrinógeno,
- 5 en la que la trombina se usa en la cantidad de 0,01 a 50 UI/ml,
- en la que la matriz de fibrinógeno contiene de 0,01 mg/ml a 20 mg/ml de colágeno y de 0,01 mg/ml a 20 mg/ml de ácido hialurónico,
- en la que la matriz de fibrinógeno contiene de 20 mg/ml a 200 mg/ml de fibrinógeno.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que los componentes celulares se preparan separando células a partir de un tejido de cartílago normal aislado de un huésped usando una enzima e incubando las células en un medio de cultivo para obtener un cultivo que contiene más de 10^6 células/ml.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, en la que la matriz de fibrinógeno contiene al menos uno seleccionado entre antibióticos tales como penicilina G y estreptomina y agentes antifúngicos tales como kanamicina, anfotericina B, nistatina y gentamicina.

15

Fig. 1

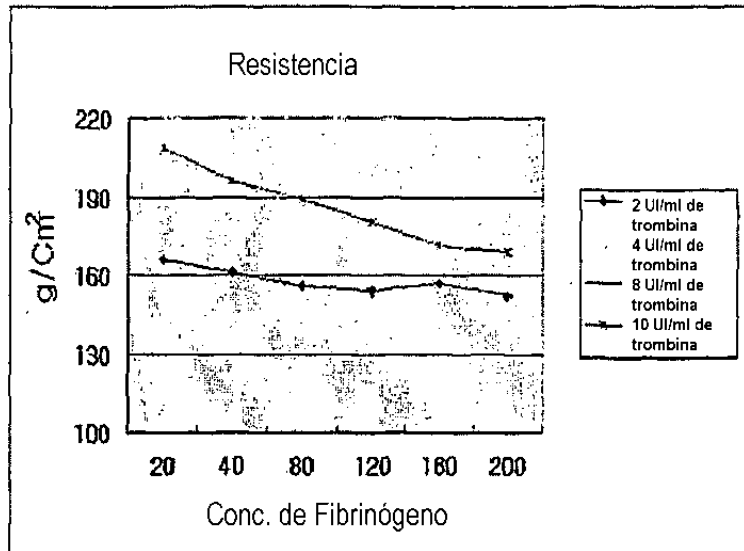


Fig. 2

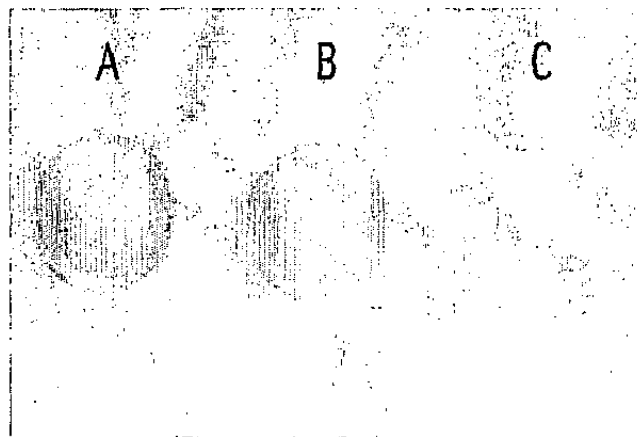


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

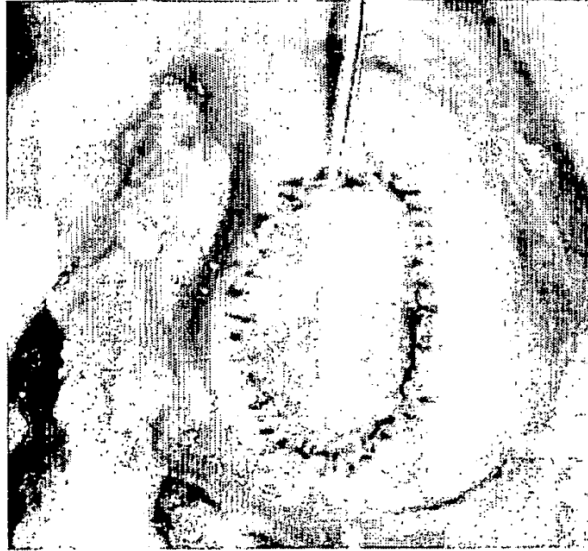


Fig. 6



Fig. 7

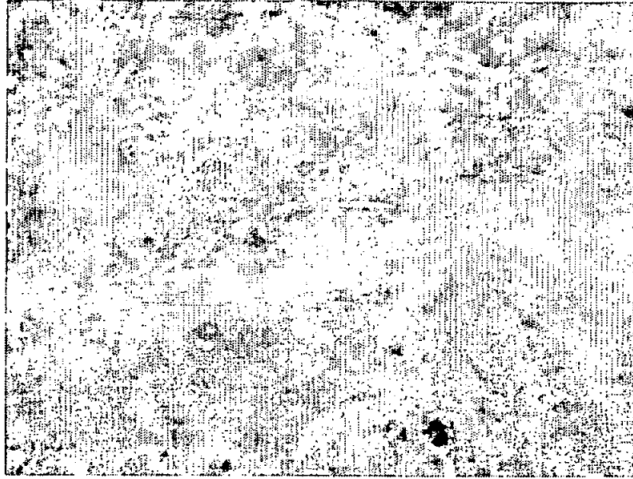


Fig. 8

