

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 668**

51 Int. Cl.:

A61F 2/02

(2006.01)

A61K 35/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07862720 .5**

96 Fecha de presentación: **11.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2101681**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PEQUEÑAS PARTÍCULAS DE TEJIDO VIABLES Y SU USO PARA LA REPARACIÓN TISULAR.**

30 Prioridad:
20.12.2006 US 613250

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
**ZIMMER ORTHOBIOLOGICS, INC.
9301 AMBERGLEN BLVD. BLDG. J., SUITE 100
AUSTIN, TX 78729, US**

72 Inventor/es:
**YAO, Jian Q. y
ZAPOROJAN, Victor**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 370 668 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

Procedimiento de obtención de pequeñas partículas de tejido viables y su uso para la reparación tisular.

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La preparación y el uso de partículas de tejido fragmentadas a partir de diversas fuentes para la reparación de defectos tisulares, como los defectos tisulares del aparato locomotor.

10 ANTECEDENTES

El cartílago articular es una superficie fina, suave, de baja fricción y deslizante, compuesta de cartílago hialino, resistente a fuerzas de compresión. Aunque solamente tiene un espesor de pocos milímetros, presenta unas excelentes características de desgaste. Su capacidad mecánica y estructural depende de la integridad de su matriz extracelular, en la que los condrocitos están distribuidos de forma dispersa entre macromoléculas estructurales, como colágeno, proteoglucanos y proteínas no colágenas. Aunque las células condrocíticas producen la matriz extracelular, componen menos del 5% del peso húmedo del cartílago.

La composición y la interacción de estos componentes, de gran complejidad, hacen que las técnicas de regeneración y sustitución sean problemáticas. Por ejemplo, la ausencia de un suministro sanguíneo directo y las pocas células distribuidas ampliamente entre una densa matriz extracelular conducen a una capacidad de curación limitada del cartílago articular dañado. Esto ha llevado a una amplia diversidad de enfoques de tratamientos para defectos, por ejemplo, en la rodilla, con distintos grados de éxito.

Los procedimientos tales como perforación, abrasión, microfractura y desbridamiento proporcionan un alivio sintomático del dolor y mejoran la funcionalidad. Puede hacerse referencia a estos procedimientos colectivamente como técnicas de estimulación de la médula ósea subcondral, en las que se hace sangrar al hueso situado bajo el cartílago, que tiene abundante suministro sanguíneo. El objetivo de estos procedimientos es la movilización de células madre mesenquimáticas de la sangre para su diferenciación en células similares a condrocitos que sintetizan el tejido de reparación. Una vez que se rompe el hueso esponjoso vascularizado, se forma un coágulo de fibrina y células pluripotentes migran a la zona. Eventualmente, estas células se diferencian en células similares a condrocitos que segregan colágeno del tipo I, del tipo II y de otros tipos, así como proteoglucanos específicos del cartílago, después de recibir las señales mecánicas y biológicas apropiadas. Las células producen un tejido fibroblástico de reparación que, en apariencia y en una biopsia inicial, puede ser de tipo hialino, pero que, con el tiempo, se demuestra histológicamente que se trata predominantemente de tejido fibrocartilaginoso. El fibrocartílago es una red relativamente desorganizada de fibras de colágeno, a diferencia del cartílago hialino natural y, por lo tanto, rellena parcialmente el defecto con un tejido estructuralmente débil que también presenta una durabilidad limitada.

Otros procedimientos opcionales como el injerto perióstico, los autoinjertos y aloinjertos osteocondrales y el autoimplante de células condrocíticas se han usado para la reparación de defectos de cartílago con el propósito de reducir el dolor y restablecer la funcionalidad. En general, el éxito de estos procedimientos disminuye con el tiempo, posiblemente debido a la formación de fibrocartílago, un desarrollo inadecuado del tejido de reparación, escasa diferenciación celular y/o escasa unión a los bordes del cartílago articular circundante. Los injertos de espesor total intactos, como los autoinjertos y aloinjertos osteocondrales pueden fracasar también a causa de tamaños dispares, rechazo inmunológico y escasa adhesión del cartílago a las superficies óseas. Para el autoimplante de células condrocíticas se necesitan dos intervenciones quirúrgicas: primeramente, los condrocitos se obtienen de un área de cartílago no involucrada y se cultivan durante 14 a 21 días y después, las células cultivadas se inyectan en el defecto expuesto por medio de una incisión abierta y se cubren con un colgajo perióstico extirpado de la tibia medial proximal.

Se han sugerido diversos procedimientos para promover el crecimiento y la reparación tisular, y en particular, la reparación de cartílago, que incluyen el uso de partículas de tejido derivadas de la trituración de cartílago articular no desmineralizado en piezas de aproximadamente 60 µm a aproximadamente 500 µm (Malinin, solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20050196460); el picado del tejido en partículas mediante dos cuchillas paralelas, lo que da lugar a partículas de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mm³ de tamaño que contienen al menos una célula viable (Binette y col., solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20040078090); la pulverización de tejido blando en pedazos de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µm que pueden combinarse con elementos (células) viables y/o moléculas bioactivas (Awad y col., solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20050288796); y la molienda de cartílago de aloinjerto que se liofiliza después para crear partículas de un tamaño de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 1 mm que pueden formularse en una pasta (Gomes y col., solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20040219182). También se han desvelado diversos procedimientos de preparación de tejidos, incluido un procedimiento para generar piezas de tejido dérmico de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 1.500 µm mediante un rodillo con cuchillas múltiples (Mishra y col., solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20040175690).

La viabilidad de las células y/o los tejidos para implantes necesita mejorarse. Por ejemplo, con los homogeneizadores usados para generar las partículas de tejido, aproximadamente el 5% de las células permanece viable después de la homogeneización. La digestión enzimática, que se usa con frecuencia para generar células para el autotrasplante de células condrocíticas, resulta en una escasa viabilidad de las células después del aislamiento inicial.

Son de desear composiciones y procedimientos mejorados para la reparación de defectos tisulares y, en particular, defectos del cartílago articular.

10 RESUMEN DE LA INVENCION

Una realización es una composición que incluye pequeñas partículas de tejido aisladas, compuestas de células y de sus moléculas extracelulares asociadas (por ejemplo, proteínas, polisacáridos, proteoglicanos, etc.), conocidas como la matriz extracelular (MEC). Las partículas de tejido se fragmentan de modo que en algunas realizaciones dichas partículas tienen al menos una dimensión inferior a aproximadamente 60 μm . En otra realización, las partículas tienen al menos una dimensión inferior a aproximadamente 1 mm. En otra realización, las partículas se fragmentan de modo que su volumen es inferior a aproximadamente 1 mm³. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50% de las células en las partículas de tejido es viable. En otras realizaciones, al menos el 80% de las células en las partículas de tejido es viable. En algunas realizaciones, la composición puede contener también aditivos como adhesivos, disoluciones y agentes bioactivos. Algunos ejemplos de adhesivos incluyen cola de fibrina, Tisseal (Baxter BioScience, Deerfield IL, EE. UU.) y Surgicel (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, EE. UU.). Algunos ejemplos de agentes bioactivos incluyen fibrinógeno, trombina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factores de crecimiento transformantes (TGF), incluida la forma β (TGF β), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y aspirado de médula ósea.

Otra realización es un procedimiento para la creación de pequeñas partículas de tejido, en el que una muestra de tejido se pone en un dispositivo de corte que contiene al menos dos cuchillas en paralelo en una realización y al menos tres cuchillas en paralelo en otra realización. En las realizaciones que contienen al menos tres cuchillas, el espaciamiento entre las cuchillas puede ser uniforme o variable. El espaciamiento entre las cuchillas puede definir una dimensión de la partícula. En una realización, al menos una de las cuchillas es curva. En otra realización, al menos dos de las cuchillas no son paralelas. En una realización, el aparato de fragmentación comprende al menos tres cuchillas montadas en paralelo y separadas por espaciadores con una anchura de aproximadamente 60 μm . Cambiando la relación espacial relativa entre la muestra de tejido y el aparato de corte, pueden hacerse cortes en los planos horizontal, vertical y frontal. Dado que el ángulo entre estos planos puede variarse, las partículas de tejido resultantes pueden fragmentarse con diversas formas, como cubos, triángulos, cuadriláteros y otros polígonos.

Otra realización son las composiciones descritas para la mejora de un defecto tisular. En una realización, el tejido defectuoso puede ser un cartílago, hueso, ligamento, menisco, tendón, músculo, núcleo pulposo, encía, anillo fibroso, periostio, pericondrio, fascia y/o perineuro. En una realización, el tejido defectuoso puede ser cartílago articular. En general, el uso incluye poner las partículas de tejido fragmentadas y aisladas en el sitio del defecto tisular. La retención de las partículas de tejido en el sitio del defecto se facilita por el pequeño tamaño de las partículas. En ciertas realizaciones, la retención de las partículas de tejido en el sitio del defecto puede aumentarse por medio de técnicas como la microfractura y el uso de adhesivos.

Otra realización es el uso de las pequeñas partículas de tejido de la invención en condiciones de cultivo celular y, por ejemplo, como parte de un experimento *in vitro* y/o para la propagación de células en cultivo.

El procedimiento y la composición se comprenderán mejor con referencia a las figuras y la descripción siguientes.

50 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1A es una fotografía de partículas con tinción solamente de las células vivas.

La figura 1B es una fotografía de partículas con tinción solamente de las células muertas.

La figura 2 muestra un aparato para la fragmentación de partículas de tejido.

La figura 3A muestra el porcentaje de células viables en una realización del procedimiento.

La figura 3B muestra el porcentaje de células viables con digestión enzimática en comparación con una realización de la invención.

La figura 4 muestra una representación esquemática de los tres planos de una partícula definidos por el eje x, el eje y y el eje z.

La figura 5A es una fotografía que muestra una superficie de una articulación de rodilla porcina que ha sido sometida a una realización de la invención.

La figura 5B es una fotografía que muestra una superficie de una articulación de rodilla porcina que ha sido sometida a otra realización de la invención.

La figura 5C es un dibujo de la fotografía de la figura 5A.

La figura 5D es un dibujo de la fotografía de la figura 5B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En una realización, se desvela una composición que comprende una pluralidad de partículas de tejido aisladas. Las partículas comprenden células y sus moléculas extracelulares asociadas (por ejemplo, proteínas, polisacáridos, proteoglicanos, etc.), que se denominan colectivamente como matriz. En otra realización, las partículas de tejido están compuestas de células en las que al menos aproximadamente el 50% de las células es viable. En otra realización, las partículas de tejido están compuestas de células en las que al menos aproximadamente el 60% de las células es viable. En otra realización, las partículas de tejido están compuestas de células en las que al menos aproximadamente el 65% de las células es viable. En otra realización, las partículas de tejido están compuestas de células en las que al menos aproximadamente el 70% de las células es viable. En otra realización, las partículas de tejido están compuestas de células en las que al menos aproximadamente el 75% de las células es viable. En otra realización, las partículas de tejido están compuestas de células en las que al menos aproximadamente el 80% de las células es viable. La viabilidad de la célula indica que la célula está viva y es capaz de realizar una o más funciones biológicas intrínsecas (por ejemplo, señalización celular, mantenimiento de la homeostasis celular, etc.) y puede incluir también células durmientes o paradas en una etapa del ciclo celular. Las células que no son viables son células muertas. El número absoluto de células viables puede variar en función de, por ejemplo, el tipo de tejido usado para producir las partículas y/o el tamaño de las partículas. La presencia de células viables en la composición de partículas de tejido facilita el uso de la composición para la mejora de los defectos tisulares como se describe más detalladamente a continuación. Por ejemplo, las células viables proporcionan estimulantes y/o señales para la remodelación, el crecimiento y/o la reparación del tejido. Los procedimientos para medir la viabilidad de las células son conocidos por el experto en la técnica e incluyen el suministro de colorantes y ensayos bioquímicos. Por ejemplo, la viabilidad de las células en las partículas de tejido se midió mediante el ensayo de viabilidad LIVE/DEAD® (Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.), en el que el colorante calceína es retenido por las células vivas y emite una fluorescencia verde y el homodímero de etidio es capaz de penetrar en las células con la membrana dañada y emitir una fluorescencia roja al interactuar con los ácidos nucleicos. La figura 1A muestra células muertas que emiten fluorescencia roja en partículas de tejido en una realización de la invención. La figura 1B muestra células vivas que emiten fluorescencia verde en partículas de tejido en una realización de la invención. Los resultados en las figuras 1A y 1B mostraron una absorción satisfactoria de los colorantes en las pequeñas partículas de tejido.

Además de células, las partículas de tejido contienen también moléculas extracelulares, a las que frecuentemente se hace referencia como la matriz extracelular (MEC). La MEC rodea y soporta las células dentro de los tejidos de mamíferos y está compuesta de tres clases principales de biomoléculas: (i) proteínas estructurales como colágeno y elastina; (ii) proteínas especializadas como fibrilina, fibronectina y laminina; y (iii) proteoglicanos. Los proteoglicanos están compuestos de un núcleo de proteína que está unido a largas cadenas de unidades repetidas de disacáridos denominadas glucosaminoglicanos (GAG) y forman componentes complejos de alto peso molecular de la MEC. La MEC tiene muchas funciones, incluidas la organización celular, la dirección de la migración y el crecimiento celular y la estructura; la prominencia de estas funciones puede variar en función del tejido. Por ejemplo, la MEC desempeña un papel importante en la transmisión de fuerza y en el mantenimiento de la estructura tisular, en particular en el cartílago, los tendones, los ligamentos, el hueso y el músculo. La composición precisa de la MEC en las partículas depende de factores como el tejido del que se obtienen las partículas y de todos los tratamientos o modificaciones de las mismas. Por lo tanto, la composición de la MEC variará en función de la composición endógena de ese tipo de tejido. Además de las variaciones en la composición de la MEC basadas en el tipo de tejido, la MEC también puede modificarse. Como ejemplo, las partículas pueden tratarse con proteínas bioactivas, como BMP, IGF, TGF, PDGF, aspirado de médula ósea, etc., para aumentar la capacidad de reparación tisular de dichas partículas. Asimismo, las partículas pueden tratarse con enzimas que hidrolizan proteínas y/o glucanos, como tripsina y hialuronidasa para aumentar la accesibilidad de la MEC.

El tamaño de las partículas de tejido de la composición de la invención puede variar en función de factores tales como el tipo de tejido original usado, la edad del tejido y el uso posterior deseado para la composición. En una realización, las partículas de tejido se fragmentan de modo que al menos una dimensión de la partícula es inferior a 1 mm. En otra realización, las partículas de tejido se fragmentan de modo que al menos una dimensión es inferior a 60 μm . En otra realización, las partículas de tejido se fragmentan de modo que las partículas son sustancialmente cúbicas, con cada lado de aproximadamente 60 μm o inferior. En otra realización, el tejido deriva de una fuente juvenil y las partículas de tejido tienen un volumen inferior a 1 mm^3 . En otra realización, las partículas de tejido tienen un volumen de aproximadamente $2 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$. Las partículas de tejido pueden tener cualquier forma, incluyendo pero sin limitarse a cubos y tiras alargadas. La fragmentación se refiere al corte de la muestra de tejido en el tamaño

y/o la forma deseados y se describe adicionalmente a continuación.

Las partículas de tejido pueden derivarse de diversos tipos de tejidos y fuentes de tejidos. El tejido puede ser autogénico, alogénico o xenogénico, con respecto al receptor de la composición de la invención, como se explica a continuación. Cualquier tejido es potencialmente adecuado para el uso y los tipos de tejidos pueden incluir cartílago, hueso, ligamento, menisco, tendón, músculo, núcleo pulposo, encía, anillo fibroso, periostio, pericondrio, fascia y/o perineuro. En una realización, el tejido es cartílago articular. En otra realización, el cartílago articular es cartílago hialino y/o fibrocartílago.

- 10 En una realización, el tejido es tejido manipulado. La manipulación del tejido se refiere a la alteración de la fisiología del tejido de manera que adquiere características que normalmente no tendría, con un aumento y/o silenciamiento de las características del tejido existentes y/o al crecimiento del tejido *in vitro*. El tejido manipulado puede incluir tejido derivado de un donante transgénico. Un donante transgénico se refiere a fuentes de tejido, como animales, en las que un material genético exógeno se ha incorporado en el genoma de la fuente. El material genético incorporado puede producir la expresión de un gen no endógeno o puede alterar los niveles de expresión de un gen endógeno.
- 15 En otra realización, el tejido donante puede alterarse genéticamente después de su extirpación del donante. Algunos ejemplos de alteraciones de tejidos después de la extirpación y antes o simultáneamente con el cultivo incluyen alteraciones provocadas por la introducción de material genético y/o agentes bioactivos. En el caso de la manipulación genética, el tejido puede tratarse con vectores genéticos mediante diversos procedimientos de introducción de material genético, por ejemplo, por medio de virus y lípidos, como se conoce en la técnica, para provocar alteraciones en la expresión de genes endógenos o exógenos. Los agentes bioactivos, como factores de crecimiento, pueden incubarse con el tejido cultivado para provocar alteraciones en la fisiología del tejido. Un tejido manipulado puede referirse también al tejido que se ha propagado o crecido *in vitro*. El tejido crecido *in vitro* se refiere a la creación y/o propagación de tejido fuera de un animal hospedador. Por ejemplo, un tejido crecido *in vitro*
- 20 puede resultar de manipulaciones de cultivos de tejidos en que las células, por ejemplo, se estimulan para formar un tejido en un recipiente de incubación. Los procedimientos para la producción de tejido *in vitro* son conocidos por el experto en la técnica.

- El estado de desarrollo o madurez del tejido usado en la invención también puede variar. Por ejemplo, las partículas de tejido pueden derivar de tejido embrionario, fetal, neonatal, juvenil o adulto. En una realización en la que se usa tejido juvenil, se define juvenil como de menos de 12 años de edad en el caso de humanos. Además, el tejido puede aislarse en fresco o cultivarse antes de su fragmentación en partículas. En el caso de muestras de tejido cultivado, el tejido se mantiene en un entorno que preserva la viabilidad de las células del tejido. Sin embargo, un experto en la técnica comprenderá también que puede producirse la muerte de algunas células como resultado del cultivo *in vitro*
- 30 del tejido. El tejido, bien en preparación o cultivo o después de un aislamiento en fresco, puede fragmentarse en piezas más pequeñas que facilitan la fragmentación posterior, por ejemplo, resultan en un tamaño más fácil de manejar en la creación posterior de las partículas de tejido, o fomentan la viabilidad de las células en el cultivo del tejido, por ejemplo, incrementan el área superficial del tejido y, de este modo, la accesibilidad del oxígeno y los nutrientes a las células. En otra realización, el tejido se fragmenta al tamaño de partículas deseado antes del cultivo.

- 40 La composición puede incluir también componentes adicionales. En una realización, las partículas de tejido de la composición se mantienen o suspenden en una disolución. La disolución puede ser un tampón que mantiene el pH de la disolución en un intervalo deseado. Por ejemplo, el tampón puede mantener las partículas de tejido en una disolución en el intervalo entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,5. En otras realizaciones, el tampón puede mantener el pH en el intervalo entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7. El tampón y el intervalo de pH tamponante que resulta elegido dependen de factores conocidos para el experto en la técnica, incluidos el tipo de tejido y los efectos de cierto pH en ese tipo de tejido.

- En otra realización, la composición incluye agentes bioactivos. Los agentes bioactivos pueden ser residuales del cultivo de la muestra de tejido como se ha descrito anteriormente o pueden añadirse a las partículas de tejido en otro momento. Algunos ejemplos de agentes bioactivos incluyen, pero no se limitan a factores de crecimiento, hormonas y nutrientes.

- La composición de la invención puede comprender también un adhesivo que contribuye a la unión de las partículas de tejido al sitio del defecto tisular. El adhesivo puede ser un bioadhesivo de origen natural como fibrina. La trombina transforma el fibrinógeno soluble del plasma en moléculas de fibrina que polimerizan y forman un coágulo de fibrina. La fibrina puede encapsular y/o rodear en una malla a las partículas de tejido en los sitios del defecto tisular. Sin embargo, debe señalarse asimismo que debido al pequeño tamaño de las partículas de tejido de la invención, las partículas son intrínsecamente adhesivas en el sitio del defecto tisular. En otra realización, las partículas de tejido
- 55 pueden tratarse de modo se carguen positivamente. Las partículas de tejido pueden cargarse mediante diversos tratamientos, como la exposición de dichas partículas a un detergente iónico o a un campo magnético, lo que resulta en la creación de una carga positiva global de las partículas. La carga positiva global de las partículas facilita la adhesión de las partículas al defecto tisular, de carga predominantemente negativa. El aumento de la adhesión de las partículas al defecto tisular puede reducir el tiempo requerido para la reparación del defecto tisular.

En una realización se desvela un procedimiento para la preparación de una composición que comprende tejido fragmentado en partículas. La muestra de tejido se corta inicialmente en piezas más pequeñas para facilitar la fragmentación posterior en partículas de tejido, por ejemplo, mediante instrumentos quirúrgicos conocidos por el experto en la técnica, como un escalpelo. En una realización, el tejido se ha cortado inicialmente en piezas de 5 aproximadamente entre 5 y 11 mm. En una realización, el tejido, que puede haberse cultivado, ha sido ya sometido al proceso de corte inicial y presenta el tamaño aproximado para la fragmentación posterior. Tal como se muestra en el esquema de la figura 2 (no está a escala), una vez que el tejido 10 tiene el tamaño inicial apropiado, se monta en una embocadura 12 de un cilindro axial. Mediante la extensión del cilindro axial a lo largo del eje A, el tejido 10 se pone en contacto con las cuchillas 14 montadas enfrentadas a la embocadura. En una realización, el tejido se pone en contacto con al menos dos cuchillas montadas paralelas en una superficie sustancialmente plana. En otra realización, el tejido se pone en contacto con tres cuchillas montadas en paralelo en una superficie sustancialmente plana. En otra realización, las cuchillas 14 no son paralelas entre sí y pueden incluir también cuchillas que no son rectas, por ejemplo, curvas. La configuración de las cuchillas 14 puede incluir también espaciadores 16 entre las cuchillas, cuya anchura corresponderá a la dimensión deseada entre los cortes paralelos. En ciertas realizaciones, los espaciadores 16 entre las cuchillas 14 serán del mismo tamaño y, en otras realizaciones, los espaciadores 16 pueden ser de tamaños diferentes. Las cuchillas estarán lo suficientemente afiladas para que se minimicen el daño y/o las pérdidas de tejido.

El procedimiento puede llevarse a cabo en ausencia de enzimas digestivas añadidas exógenamente. Aunque las enzimas digestivas fomentan la disociación celular, también pueden disminuir el porcentaje de células viables que resulta del tratamiento. En la figura 3, la viabilidad de las células después una realización del procedimiento de la invención, determinada por el ensayo de viabilidad LIVE/DEAD®, fue de aproximadamente el 85% (figura 3A), mientras que la viabilidad de las células después de un tratamiento enzimático con colagenasa fue de aproximadamente el 25% de células viables (figura 3B). Sin el deseo de limitarse a una teoría, se cree que la enzima digestiva daña los componentes de la membrana celular, lo que contribuye a la muerte de la célula.

El primer contacto entre las cuchillas y el tejido resulta en cortes paralelos, por ejemplo, en el plano del eje x de la muestra de tejido, como se muestra en la figura 4. En distintas realizaciones, el tejido puede empujarse contra las cuchillas o, alternativamente, las cuchillas pueden empujarse contra el tejido. En otra realización, la cuchilla y la muestra de tejido se mueven la una hacia la otra. En ciertas realizaciones, las cuchillas pueden no ser paralelas y, por lo tanto, no resultarán en cortes paralelos. Sin embargo, por simplicidad, el procedimiento de la invención se describirá con respecto a cuchillas paralelas que hacen cortes paralelos pero, en todos los casos, las cuchillas y los cortes resultantes pueden no ser paralelos y además pueden no ser rectos sino, por ejemplo, curvos. Después del primer contacto entre las cuchillas y el tejido, la muestra y/o las cuchillas pueden moverse traslacionalmente a lo largo del eje B, por ejemplo sin rotación, de modo que pueden hacerse otros cortes paralelos a los cortes previos todavía en el mismo plano. En una realización, las cuchillas se mueven traslacionalmente con una precisión de aproximadamente 1 μm mediante un micrómetro digital 18, como se muestra en la figura 2. Después, las cuchillas y/o la muestra de tejido se hacen rotar relativamente entre sí en una rotación C alrededor del eje A, lo que define una segunda orientación y las cuchillas y el tejido se ponen de nuevo en contacto haciendo cortes, por ejemplo, en el plano del eje y, como se muestra en la figura 4. En esta segunda orientación, las cuchillas y/o el tejido pueden moverse de nuevo traslacionalmente de modo que pueda hacerse una serie de cortes paralelos. En una realización, el segundo contacto entre las cuchillas y el tejido resulta en cortes sustancialmente perpendiculares en el tejido, en que el ángulo entre el primer y el segundo corte es de aproximadamente 90°. Sin embargo, el ángulo entre el primer y el segundo corte puede variar desde aproximadamente 1° hasta aproximadamente 179°. En una realización, las cuchillas y/o la muestra de tejido se mueven para alcanzar una tercera orientación en la que las cuchillas cortan la muestra de tejido, por ejemplo, en el plano del eje z, como se muestra en la figura 4. La tercera orientación puede alcanzarse moviendo el tejido en la dirección D, como se muestra en la figura 2. En una realización, el plano definido por esta tercera orientación corta el tejido en dirección sustancialmente perpendicular al plano del primer o del segundo corte, por ejemplo, el plano del eje x o del eje y, y da lugar a partículas sustancialmente cúbicas. Sin embargo, el ángulo entre el tercero y uno de los planos de corte primero o segundo puede variar desde aproximadamente 1° hasta aproximadamente 179°. Por consiguiente, mediante la elección de los ángulos entre los planos de corte puede variarse la geometría de las partículas de tejido resultantes.

Es posible producir partículas de tejidos de diversos tamaños variando el tamaño de los espaciadores entre las cuchillas y el ángulo entre los cortes. En una realización, el tejido se corta mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que tres cuchillas se ponen en contacto con el tejido y las partículas de tejido resultantes están fragmentadas de modo que al menos una dimensión es inferior a 60 μm . En otra realización, el tejido se corta mediante el procedimiento descrito anteriormente en el que tres cuchillas se ponen en contacto con el tejido, el tejido deriva de una fuente juvenil no dérmica y las partículas de tejido resultantes están fragmentadas de modo que al menos una dimensión es inferior a 1 mm. En otra realización, el tamaño de las partículas resultantes es inferior a 1 mm³. El procedimiento produce partículas de tejido de las dimensiones deseadas y también mantiene un alto porcentaje de células viables, por ejemplo superior a aproximadamente el 85% (véase la figura 3A).

Como se ha descrito anteriormente, el tejido usado por el procedimiento de la invención para generar las partículas de tejido puede proceder de cualquier fuente y ser cualquier tipo de tejido, incluidos tejidos autogénicos, alogénicos,

xenogénicos, cultivados y manipulados y de cualquier estado de madurez.

- En una realización, la composición se usa para la mejora de un tejido dañado en un mamífero. La composición de partículas de tejido se introduce en un tejido dañado o en su proximidad en condiciones suficientes para mejorar el tejido dañado. La composición puede incluir una pluralidad de partículas de tejido fragmentadas del tejido. Además, las partículas pueden incluir células y moléculas extracelulares organizadas en una matriz, como se ha descrito anteriormente. En una realización, el tejido dañado puede ser cartílago articular. En el caso de cartílago articular dañado, la lesión del cartílago puede desbridarse hasta alcanzar una base de cartílago estable y el cartílago suelto o fibrilado puede cortarse. En una realización, en el caso del cartílago articular, la base subcondral se microfractura hasta que el hueso subcondral sangre. La microfractura supone la creación de una serie de pequeñas fracturas en el hueso de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 4 mm de profundidad mediante un punzón. Alternativamente, puede usarse un perforador para crear agujeros en el hueso subcondral, con cuidado de no causar una necrosis térmica en el sitio. La composición se aplica al área del defecto y/o en su proximidad.
- En una realización, la composición se usa para la mejora de un tejido dañado e incluye también la adhesión de la composición de la invención al tejido dañado. Si esto se realiza junto con la microfractura, las propiedades adhesivas del hueso sangrante fijan las partículas del tejido en el sitio, como se muestra en las figuras 5A y 5C. Específicamente, el coágulo sanguíneo resultante del hueso sangrante sirve como una cola biológica que mantiene las partículas en la superficie cercana al defecto. Además, debido al pequeño tamaño de las partículas de tejido, las partículas permanecen de manera natural en el defecto, como se muestra en las figuras 5B y 5D, posiblemente como resultado de la tensión superficial. La composición de la invención puede incluir también adhesivos como fibrina, ácido hialurónico, cola de fibrina, coágulo de fibrina, gel de colágeno, gel de alginato, adhesivo de gelatina, resorcina y formaldehído, adhesivo a base de moluscos, adhesivo a base de dihidroxifenilalanina (DOPA), quitosano, transglutaminasa, adhesivo a base de poli(aminoácidos), adhesivo a base de celulosa, adhesivo a base de polisacáridos, adhesivos sintéticos a base de acrilato, plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), coágulo de PRP, coágulo de PPP, MATRIGEL® (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.), los copolímeros monoestearilglicerol-co-succinato (MGSA) y monoestearilglicerol-co-succinato/polietilenglicol (MGSA/PEG), laminina, elastina, proteoglucanos y combinaciones de los mismos.
- En una realización, las partículas de tejido de la composición de la invención pueden haberse tratado de modo que dichas partículas presentan una carga neta, como se ha descrito anteriormente, que facilita la adhesión electrostática al defecto tisular. Para mantener las partículas en el sitio del defecto pueden usarse también otras técnicas conocidas por el experto en la técnica, como los colgajos.
- En una realización, la composición para la mejora del tejido dañado puede aplicarse por medio de un procedimiento de mínima invasión, por ejemplo, artroscopia. El uso de un procedimiento de mínima invasión permite una incisión menor, lo que resulta en menos dolor, un acortamiento de la estancia hospitalaria del paciente y una recuperación más rápida en comparación con los procedimientos más invasivos tradicionales. El uso de un procedimiento de mínima invasión como la artroscopia puede contribuir también a la disminución de posibles complicaciones postoperatorias como la fibrosis de los tejidos blandos.

En una realización, el tejido dañado puede ser tejido del aparato locomotor como cartílago, hueso, ligamento, menisco, tendón y/o músculo. En otra realización, el tejido dañado puede ser núcleo pulposo, encía, anillo fibroso, periostio, pericondrio, fascia y/o perineuro. En una realización, el tejido dañado y el tejido que se usa como fuente para la composición de la invención son el mismo tipo de tejido, por ejemplo, cartílago articular. En otra realización, el tejido dañado y el tejido que se usa como fuente para la composición de la invención son diferentes tipos de tejido, incluidos tejidos autogénicos, alogénicos, xenogénicos, cultivados y manipulados y de cualquier estado de madurez.

Una realización desvela una composición implantable biocompatible que comprende una pluralidad de partículas de tejido biológico fragmentadas a partir de un tejido derivado de un cartílago juvenil viable, en que las partículas están compuestas de condrocitos con al menos aproximadamente el 80% de viabilidad y proteínas extracondrocíticas, en que cada partícula es inferior a 60 µm y la composición puede implantarse en un mamífero.

En una realización, se crean y se usan composiciones particuladas de cartílago para la regeneración de cartílago mediante estimulación de la condrogénesis. El cartílago articular puede obtenerse de las superficies articulares de articulaciones tales como fémures distales, tibia proximal, acetábulo, cabezas de los fémures y/o cabezas de los radios, así como de otros sitios en los que haya cartílago hialino, por ejemplo, auricular, nasal, de la articulación temporomandibular y del borde costal. El cartílago puede extirparse, por ejemplo, con un escalpelo, unas pinzas gubias u otros instrumentos quirúrgicos. En una realización, el cartílago se extirpa hasta alcanzar el hueso subcondral, sin extirpar hueso. El cartílago articular puede incluir cartílago hialino articular y/o fibrocartílago y puede comprender cartílago alogénico y/o xenogénico.

El ejemplo siguiente ilustra adicionalmente algunas realizaciones de la invención.

EJEMPLO

Las partículas de tejido de cartílago se evaluaron en cuanto a su viabilidad celular y la reparación de un defecto de cartílago. Todos los procedimientos se llevaron a cabo con cumplimiento de las regulaciones pertinentes para el uso de tejido animal. Las articulaciones de rodilla porcina se obtuvieron de un matadero local. Una articulación de rodilla se abrió con un escalpelo, exponiendo el cartílago articular del área de carga del cóndilo. Mediante un escariador hueco de 7,5 mm de diámetro se obtuvo una muestra osteocondral en forma de tapón.

El tapón osteocondral se montó en la embocadura del dispositivo de corte (figura 2) y se hicieron una serie de cortes mediante tres cuchillas múltiples para obtener pequeñas partículas de tejido viables.

Las partículas de tejido se tiñeron mediante la tinción LIVE/DEAD® para determinar la viabilidad de las células. La tinción LIVE/DEAD® usa calceína AM, que penetra a través de la membrana y es escindida por esterasas endógenas en las células vivas para dar una fluorescencia citoplásmica verde y el homodímero-1 de etidio, que no penetra a través de la membrana y marca los ácidos nucleicos de las células con la membrana dañada, por ejemplo, células muertas, con una fluorescencia roja. Las fotografías de las preparaciones teñidas se analizaron mediante un software de imágenes del NIH y se calculó el número de células totales y viables. Para el procedimiento de digestión enzimática, el cartílago se peló de la superficie articular y se recogió en una placa de Petri. Se registró el peso del tejido. Los bloques de tejido de cartílago se digirieron en una relación masa:volumen de 1:10 en el 0,15% de colagenasa del tipo II durante aproximadamente 12-16 horas hasta que no quedaron fragmentos visibles. La disolución de células y colagenasa se filtró y se lavó con tampón de fosfato salino. Se contaron las células aisladas y su viabilidad se determinó mediante la tinción LIVE/DEAD®. El número de células viables se normalizó en relación al peso del tejido y se representó como el porcentaje del número absoluto de células en una unidad de tejido dada, como se muestra en la figura 3A. El análisis estadístico de la prueba t por parejas se llevó a cabo mediante el software Sigma Stat 2.0.

Los resultados demostraron que las partículas de tejido tenían una geometría regular. El tamaño de la mayoría de las partículas fue de 50 µm a 240 µm. Los experimentos de tinción LIVE/DEAD® demostraron una buena penetración de los colorantes en el tejido debido al tamaño de las partículas. Aunque un pequeño porcentaje, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15% del tejido se perdió durante el procedimiento de corte, la viabilidad de las células en las partículas de tejido fue significativamente superior al porcentaje de células viables obtenido por el procedimiento de digestión (compárense la figuras 3A y 3B). Las partículas de tejido sembradas en la superficie de la articulación permanecieron unidas a la superficie en contra de la gravedad por un periodo de tiempo indefinido, mientras se mantuvieron las condiciones (figura 5B) y la adhesión aumentó al simular una microfractura por compresión del hueso subcondral y hacerle sangrar (figura 5A).

Los resultados anteriores demostraron que se obtuvieron pequeñas partículas vivas de tejido de una fuente autóloga. Los resultados demostraron también que la viabilidad de las células dentro de las partículas se mantuvo superior al 85%.

Lo que se reivindica es lo siguiente:

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de partículas de tejido aisladas viables, en que las partículas comprenden células con al menos el 80% de viabilidad y proteínas extracelulares asociadas a las células,
5 en que cada partícula ha sido fragmentada para tener al menos una dimensión inferior a 60 µm.
2. La composición de la reivindicación 1, en que las proteínas extracelulares son un componente de una matriz extracelular.
- 10 3. La composición de la reivindicación 2, en que las proteínas extracelulares se seleccionan del grupo que consta de colágeno, elastina, fibrilina, fibronectina y laminina.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que las partículas comprenden tejido seleccionado del grupo que consta de cartílago, hueso, ligamento, menisco, tendón, músculo y combinaciones
15 de los mismos.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que las partículas comprenden tejido manipulado.
- 20 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que las partículas comprenden tejido juvenil.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que las partículas comprenden cartílago articular.
- 25 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el cartílago articular comprende al menos uno de cartílago hialino o fibrocartílago.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende al menos
30 un adhesivo, un tampón o un agente bioactivo.
10. La composición de la reivindicación 9, en que el adhesivo se selecciona del grupo compuesto por fibrina, ácido hialurónico, cola de fibrina, coágulo de fibrina, gel de colágeno, gel de alginato, adhesivo de gelatina, resorcina y formaldehído, adhesivo a base de moluscos, adhesivo a base de dihidroxifenilalanina (DOPA), quitosano,
35 transglutaminasa, adhesivo a base de poli(aminoácidos), adhesivo a base de celulosa, adhesivo a base de polisacáridos, adhesivos sintéticos a base de acrilato, plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), coágulo de PRP, coágulo de PPP, los copolímeros monoestearilglicerol-co-succinato (MGSA) y monoestearilglicerol-co-succinato/polietilenglicol (MGSA/PEG), laminina, elastina, proteoglucanos y combinaciones de los mismos.
- 40 11. La composición de la reivindicación 9, en que el agente bioactivo se selecciona del grupo que consta de factores de crecimiento hormonas, nutrientes, BMP, IGF, TGF, PDGF y aspirado de médula ósea.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende trombina.
- 45 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la mejora de un tejido dañado en un mamífero.
14. La composición para el uso según la reivindicación 13, en que el tejido dañado se selecciona del
50 grupo que consta de cartílago, hueso, ligamento, menisco, tendón, músculo y combinaciones de los mismos.
15. La composición para el uso según la reivindicación 14, en que el tejido dañado es cartílago articular.

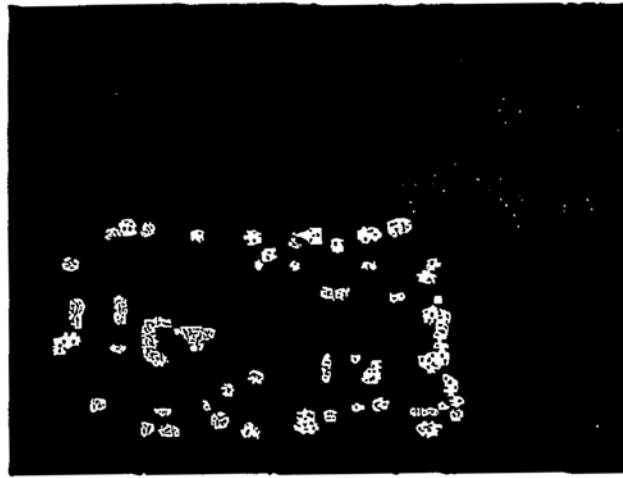


FIG. 1A

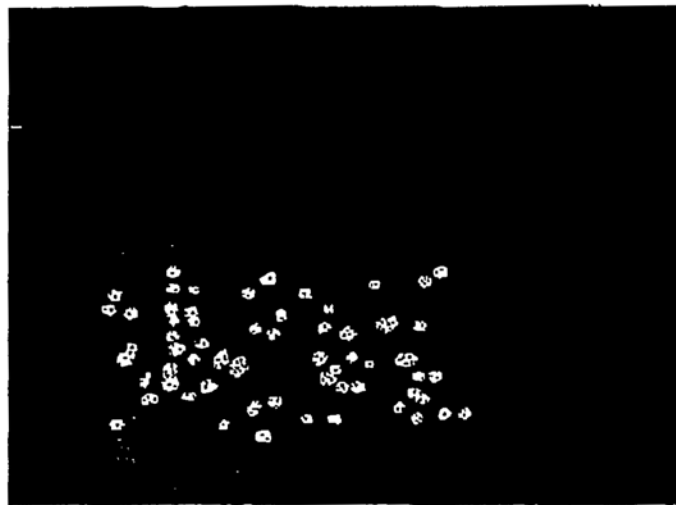


FIG. 1B

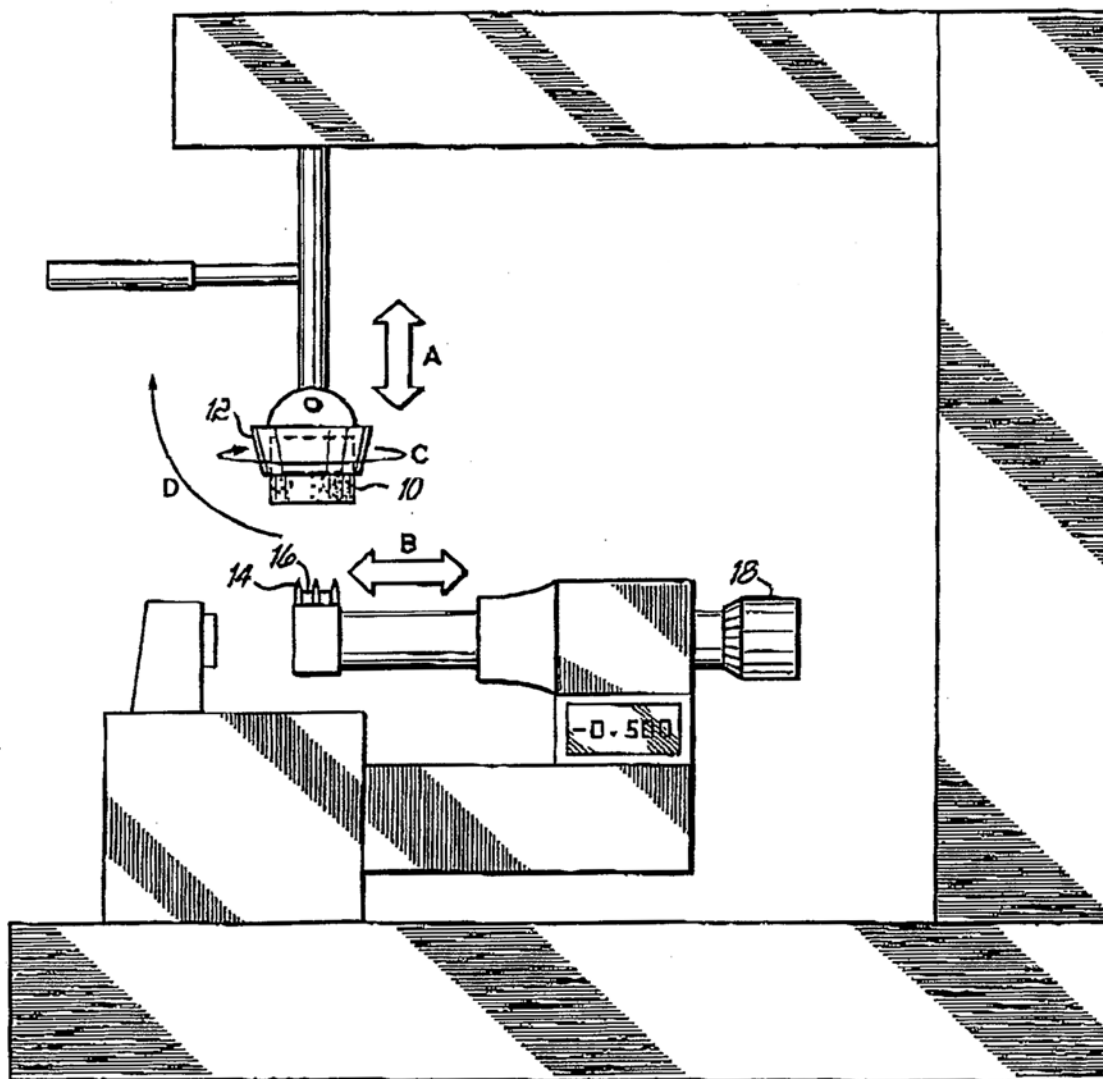


FIG. 2

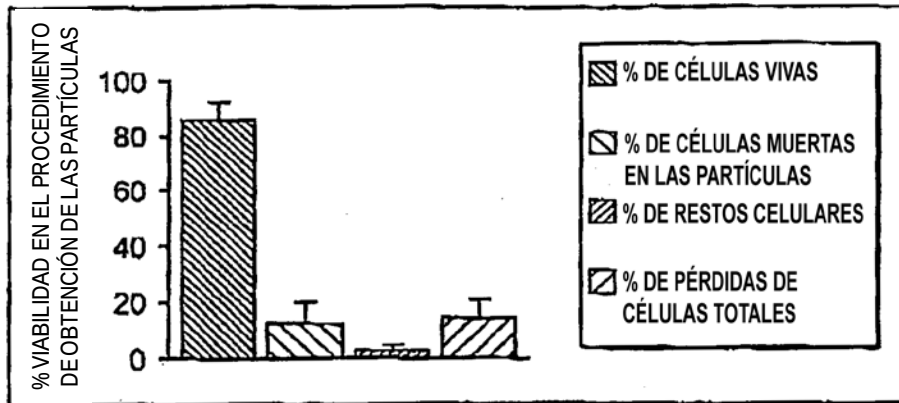


FIG. 3A

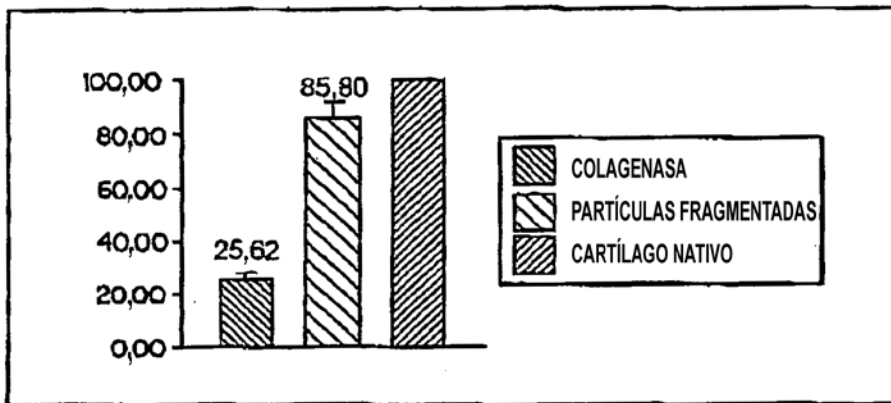


FIG. 3B

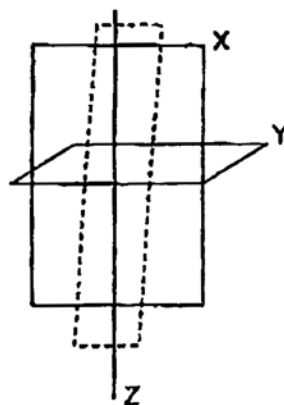


FIG. 4



FIG. 5A



FIG. 5B

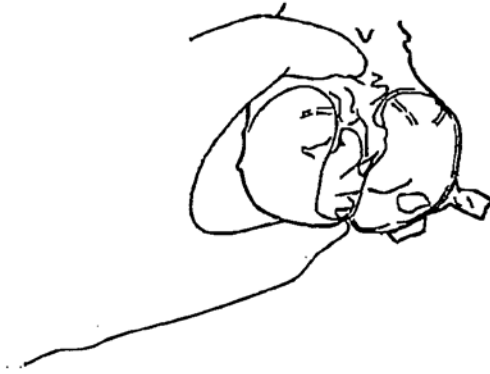


FIG. 5C



FIG. 5D