

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 060**

51 Int. Cl.:
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07820768 .5**
96 Fecha de presentación: **01.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2089075**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Injerto acelular de matriz y gel**

30 Prioridad:
06.10.2006 DE 102006047346

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.07.2012

73 Titular/es:
BioTissue AG
Seefeldstrasse 279 A
8008 Zürich, CH

72 Inventor/es:
KAPS, Christian y
TÁNCZOS, Eszter

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 385 060 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

Injerto acelular de matriz y gel.

La presente invención se refiere a un injerto acelular de matriz y gel para la regeneración de tejidos y, en particular, para regeneración de cartílagos, a un procedimiento para su fabricación y al uso del injerto para la regeneración de tejidos.

Estado de la técnica

Para un funcionamiento normal de las articulaciones es imprescindible el cartílago articular como superficie de deslizamiento. Aparecen lesiones del cartílago articular, por ejemplo, en osteoartritis, traumatismo u osteocondritis desecante. Las células del cartílago articular que forman el cartílago articular presentan en adultos sólo una pequeña capacidad de regeneración.

El cartílago articular es una forma de tejido mesodérmico derivada del tejido conjuntivo que se atribuye a células progenitoras mesenquimales multipotentes no diferenciadas. El cartílago hialino es la forma cartilaginosa más extendida y se encuentra, por ejemplo, en las superficies articulares. Los defectos en cartílagos debidos al desgaste o a lesiones representan un problema médico muy extendido. Por lo tanto, ya anteriormente, pero sobre todo en los últimos años, se han desarrollado procedimientos y técnicas para reemplazar zonas defectuosas condrales o también osteocondrales de cartílago articular. Por lo tanto, como productos de reemplazo de cartílagos articulares se han usado injertos periósticos y pericóndricos osteocondrales alogénicos y autólogos, meniscos alogénicos o también prótesis de materiales sintéticos.

En el injerto autólogo de condrocitos se multiplican condrocitos tomados del paciente en cultivo celular y se administran de nuevo al paciente. Esta administración puede realizarse en forma de distintos injertos. Ejemplos de ello son soluciones de inyección que se inyectan en el tejido, con matrices inoculadas con células de cartílago y similares.

Por ejemplo, el documento WO 97/15655 describe tejidos sintéticos que están constituidos por matrices extracelulares tridimensionales y células manipuladas por ingeniería genética, pudiendo liberar las matrices factores inmunosupresores o de diferenciación celular. Preferentemente se trata de matrices en forma de un material no tejido polimérico, en las que se distribuye una suspensión celular que puede estar suspendida en una solución de fibrinógeno. A la matriz pueden añadirse, además, factores o componentes de la matriz extracelular correspondiente que sean convenientes para los procesos de crecimiento y/o diferenciación. Para mantener las células en la matriz, puede endurecerse la suspensión celular mediante la adición de trombina, para obtener un injerto listo para su uso.

El documento DE 44 31 598 describe un procedimiento de fabricación de un injerto a partir de cultivos celulares en el que primeramente se recubren estructuras de soporte tridimensionales, en las que se fijan las células y, a continuación, se perfunden usando una solución nutritiva. En las estructuras de soporte se han introducido microcuerpos reabsorbibles que en la reabsorción liberan los factores que influyen en la formación de tejido.

El documento DE 100 06 822 describe un procedimiento de fabricación de un injerto óseo o cartilaginoso en el que las estructuras de soporte biorreabsorbibles y biocompatibles están compuestas por células y factores osteógenos reticulados mediante fibrina o hidrogel y se han moldeado en forma de cuerpos geométricos que pueden disponerse unos al lado de otros.

El documento DE 43 06 661 describe una estructura de soporte tridimensional, preferentemente de un material no tejido polimérico, en la que se introducen células. La estructura de soporte se imbuye a continuación de solución nutritiva para promover el crecimiento celular y la formación de una matriz extracelular a través de las células. Para impedir una migración al exterior o un arrastre por lavado de las células, la estructura soporte se recubre con agarosa.

Por el documento DE 101 39 783 se conoce también la preparación de células mesenquimales en líquido sinovial. Esta composición, si se desea, puede aplicarse sobre un soporte tal como un material no tejido o un material sintético y usarse de esta forma como injerto. Si no, la suspensión de células en líquido sinovial se inyecta como tal en la articulación afectada.

Alternativamente se sintetizan estructuras de matriz que no contienen en sí mismas ninguna célula. De este modo, el documento US 2003/0003153, por ejemplo, describe membranas de matriz reforzadas que contienen una o varias proteínas que forman un soporte, que son adecuadas para el crecimiento celular. En estos casos se deduce que las células migran desde el tejido del propio organismo al interior de la estructura de matriz. Esto se logra, por ejemplo, mediante perforaciones de Pridie convencionales o microfracturas. En estas técnicas se realizan perforaciones o fracturas pequeñas en los huesos articulares hasta la médula ósea. Mediante estas perforaciones se produce una hemorragia en el defecto, llenándose el defecto con un coágulo de sangre. En el coágulo se encuentran células progenitoras mesenquimales, que mediante el estímulo correspondiente estimulan un tejido de tipo cartilaginoso, que pueden formar el denominado cartílago fibroso. Si se prepara un material de matriz mediante perforaciones de Pridie, las células sanguíneas pueden migrar al interior de este material y disponerse en el mismo.

- Los documentos DE 199 57 388 y WO 2005/014027 aprovechan este efecto y lo potencian disponiendo en la estructura de la matriz factores de crecimiento y de diferenciación (documento DE 199 57 388), quimiocinas (documento WO 2005/014027) o suero sanguíneo (documento DE 10 2005 030 614) como agentes de reclutamiento. Todos los factores deben provocar una potenciación del reclutamiento de células progenitoras mesenquimales formadoras de cartílago, con lo que finalmente se debe lograr una regeneración rápida del cartílago.
- Por el documento WO 02/00272 se conoce, finalmente, la posibilidad de fabricar injertos correspondientes también a partir de sangre y un componente polimérico. Este documento se basa en el problema de que el coágulo sanguíneo generado habitualmente en la perforación de Pridie, se estrecha con la coagulación y, con ello, la forma se modifica. El polímero añadido impide esta modificación de la forma y permite, por lo tanto, una curación sin alteración de la forma. Para fabricar el injerto se mezcla un polímero con sangre o un componente sanguíneo tal como eritrocitos, leucocitos, monolitos, plaquetas, fibrinógeno, trombina y plasma rico en plaquetas y se introduce en el defecto. No obstante, en el uso de un componente sanguíneo la existencia de material coagulante es un componente esencial para lograr el efecto deseado.
- El documento EP 1 273 312 A2 divulga un injerto para la regeneración de tejido cartilaginoso que comprende condrocitos o sus células progenitoras y un soporte. Este soporte comprende un material compuesto que comprende una red o una esponja porosa de polímero sintético biodegradable y una esponja porosa de un polímero natural que se forma sobre y/o en la red o esponja porosa.
- El documento WO 2006/104901 A2 describe un soporte que presenta una matriz porosa tridimensional de policaprolactona que opcionalmente está recubierta con al menos un material extracelular elegido.
- El documento WO 01/54735 A2 da a conocer una matriz de esponja infundido con gel así como un procedimiento de fabricación de un material de matriz infundido con gel. Este procedimiento comprende que un gel con agentes bioactivos se pueda introducir en un material de matriz biodegradable poroso.
- El documento US 2002/0119179 A1 divulga un dispositivo biodegradable injertable que contiene una matriz de fibras, fabricándose la matriz de fibras a partir de fibras A y fibras B. A este respecto, las fibras A son más rápidamente biodegradables que las fibras B. Además, las fibras A y B están presentes en cantidades relativas elegidas.
- Por el documento US2005/0043814 se conoce, finalmente, un injerto de matriz acelular con una composición opcional inductora ósea que comprende un gel termorreversible de colágeno, un ácido orgánico aromático o una matriz de soporte de polímero de caprolactona adsorbible. La composición inductora ósea puede estar compuesta por polímeros de poli(ácido glicólico) y aplicarse sobre una matriz de colágenos o poli(ácidos glicólicos). En el uso de este injerto de matriz acelular la termorreversibilidad del gel es un componente esencial, ya que así la composición puede aplicarse en forma líquida. Sólo después de la inyección de la composición líquida se endurece éste en el organismo del paciente.
- En las tecnologías descritas anteriormente aparecen desventajas que provocan que cuando el injerto mismo contiene células, éstas frecuentemente se dañan debido a la manipulación durante el manejo; el injerto, en caso de uso de células, en particular células autólogas, debe fabricarse mediante un procedimiento de cultivo largo y los controles sobre impurezas realizarse cuidadosamente y, finalmente, no posee capacidad de almacenamiento o sólo puede almacenarse en condiciones poco económicas.
- Estas desventajas se potencian con el uso de células extrañas al organismo alogénicas haciendo que sea necesaria una investigación cara bacteriológica y virológica de las células del donante para evitar la transmisión de enfermedades por medio del injerto que contiene células. Además, se tiene el riesgo de una reacción de rechazo en el uso de células extrañas al organismo.
- Otras desventajas de las tecnologías descritas anteriormente son que los injertos acelulares añaden factores que aceleran o posibilitan la migración al interior de células. Estos factores pueden ser, por ejemplo, bien factores de crecimiento y de diferenciación o bien quimiocinas. Estos factores son de origen animal, es decir, aislados de animales o se preparan recombinantemente por bacterias o levaduras. No obstante, en la preparación recombinante se producen principalmente factores que se atribuyen a una estructura de origen animal. Esto es desventajoso ya que debido a la diferencia entre "donante" y "aceptor" de estos componentes del injerto después de la operación de injerto pueden producirse fácilmente intolerancias o reacciones alérgicas.
- El uso de sangre, componentes de la sangre o suero para el reclutamiento de células en el injerto acelular es en este aspecto insuficiente, debido a que en el uso de sangre extraña al organismo alogénica también son necesarios análisis bacteriológicos y virológicos caros para evitar la transmisión de enfermedades. El uso de sangre, componentes de la sangre o suero propios supone, por el contrario, una manipulación adicional del injerto (introducción del componente) y en el paciente (extracción de sangre). Cada manipulación en el injerto acarrea el riesgo de contaminación del injerto en sí, lo que también puede provocar intolerancias por parte del paciente. Además, la extracción adicional de material del paciente necesaria para ello está unida a un consumo de tiempo alto y a costes adicionales no deseados.

En el uso de injertos que se solidifican después del injerto, existe la desventaja de que un injerto sólido endurecido daña mecánicamente el tejido circundante de rigidez/dureza inferior. Adicionalmente, un injerto sólido impide la migración al interior de células y precisa de periodos de degradación o periodos de reabsorción muy largos.

5 Otra desventaja del injerto acelular descrito anteriormente es que éste en el estado de la técnica se usa después de una perforación de Pridie o microfractura, para alojar de forma no selectiva en el injerto acelular todas las células introducidas o aportadas por la hemorragia. Con ello puede provocarse una sobreproliferación en el injerto de células atípicas de tejido y/o componentes, que podría impedir la formación del tejido deseado o promueve la formación de un tejido mixto. Una hemorragia de este tipo en el defecto es, por lo tanto, desventajosa, debido a que puede provocar irritaciones e inflamaciones del tejido circundante. De este modo, Hooiveld y col. describen que la
10 puesta en contacto de cartilago con sangre o componentes sanguíneos durante 4 días provoca una lesión de las células cartilaginosas [Hooiveld M.J. y col.: Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an in vitro study, Rheumatology 43, 784-790, 2003]. Hooiveld describe también que una hemorragia en la articulación puede provocar una inflamación de la piel interna de la articulación [Hooiveld M.J. y col.: Immature articular cartilage is more susceptible to blood-induced damage than mature articular cartilage: an in vivo animal study, Arthritis Rheum 48, 396-403, 2003].
15

Es particularmente desventajoso en los injertos del estado de la técnica que éstos debido a las células o componentes biológicos que contienen sólo pueden almacenarse de forma muy limitada y adicionalmente necesitan condiciones específicas de almacenamiento.

20 La presente invención tiene entre otros el objetivo de proporcionar un injerto que se fabrique fácilmente, que precise de las menos etapas de manipulación posibles para su fabricación y que se pueda almacenar muy bien. Además, debe poder usarse rápida y fácilmente, pero a pesar de ello garantice un éxito terapéutico comparable y/o al menos igual de bueno que los injertos conocidos en el estado de la técnica. Además, sería deseable que pudiera renunciarse en la medida de lo posible al uso de factores de crecimiento extraños, dado el caso incluso recombinantes, que representen alérgenos potenciales. También sería deseable poder renunciar en la medida de lo
25 posible a una extracción de sangre adicional o al uso de sangre, componentes de la sangre o suero, debido a que con ello se provoca un riesgo de contaminación y una carga adicionales del paciente. Además, sería deseable poder impedir en la medida de lo posible la hemorragia en el defecto después de una perforación de Pridie o una microfractura, para poder evitar una lesión del tejido articular circundante. También sería deseable que el injerto acelular presente la rigidez o elasticidad del tejido circundante, para impedir una lesión mecánica del tejido
30 circundante. Sería deseable en este contexto una adaptación posible de la dureza/elasticidad del injerto a cada paciente individualmente para minimizar movimientos no armónicos debidos a diferentes durezas del material.

Sumario de la invención

La presente invención soluciona los problemas del estado de la técnica. Para ello proporciona un injerto acelular de matriz y gel compuesto por

35 (i) una matriz cohesiva que forma un soporte con porosidad abierta de un material biológica y farmacéuticamente aceptable, comprendiendo la matriz un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(glicólido, lactato) y mezclas de los mismos, y

(ii) un gel de un material biológica y farmacéuticamente aceptable, estando aplicado el gel sobre al menos una cara de la matriz y/o al menos parcialmente penetra en la misma y el gel es gel de ácido hialurónico.

40 En un segundo aspecto se proporciona un procedimiento de fabricación de un injerto acelular de matriz y gel de este tipo, que comprende las etapas siguientes:

(v) poner en contacto la matriz con el gel, aplicándose el gel sobre al menos una cara de la matriz y/o penetrando al menos parcialmente en la misma y el gel es gel de ácido hialurónico, y comprendiendo la matriz un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(glicólido, lactato) y mezclas de los mismos, y
45

(vi) secar el complejo de matriz y gel formado en (v).

En un tercer aspecto la presente invención proporciona finalmente un injerto acelular de matriz y gel para usarlo para recubrir y aumentar la viscoelasticidad de defectos para la regeneración de tejido y en particular para la regeneración de tejido mesenquimal, en particular de cartílagos y/o huesos.

Breve descripción de las figuras:

50 La figura 1 muestra el peso correspondiente de un injerto acelular antes y después del secado por liofilización y el peso del líquido desalojado. En el presente documento las abreviaturas "AH" y "mg" significan ácido hialurónico y miligramo, respectivamente. La disposición exacta del ensayo en el que se basa esta figura se describe en el ejemplo 1.

55 La figura 2 muestra la viscosidad dinámica de ácido hialurónico e injertos acelulares antes y después del secado

por liofilización. La abreviatura "sol. fis. de sal común" significa solución fisiológica de sal común, "AH" significa ácido hialurónico y "mPa*s" es la unidad de la viscosidad dinámica en milipascales por segundo. La disposición exacta del ensayo en el que se basa esta figura se describe en el ejemplo 2.

5 La figura 3 muestra la actividad quimiotáctica (reclutamiento) de líquido sinovial humano sobre células madre mesenquimales humanas *in vitro*. La abreviatura "SBF" significa suero de bovino fetal, "SH" representa suero humano, "sin OA" es líquido sinovial de pacientes con osteoartritis y "sin DN" es líquido sinovial de donantes sanos (donantes normales). Los datos exactos en los que se basa esta figura se describe en el ejemplo 4.

Descripción exacta de la invención

10 La presente invención se refiere a un injerto acelular compuesto por (i) una matriz cohesiva que forma un soporte con porosidad abierta de un material biológica y farmacéuticamente aceptable, comprendiendo la matriz un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(glicólido, lactato) y mezclas de los mismos, y (ii) un gel de un material biológica y farmacéuticamente aceptable, estando aplicado el gel sobre al menos una cara de la matriz y/o penetrando al menos parcialmente en la misma y el gel es gel de ácido hialurónico.

15 La matriz del injerto acelular según la invención es una matriz cohesiva que forma un soporte con porosidad abierta. Con el término "cohesiva" se pretende decir en el presente documento que la matriz permite un manejo del injerto sin que, a este respecto, se descomponga en elementos o componentes. No es necesario que todos los componentes de la matriz estén unidos unos con otros mediante enlaces químicos o interacciones. Una unión mecánica, por ejemplo, mediante tejido, batanado, cableado o similar es suficiente.

20 Con la expresión "que forma un soporte" se pretende indicar la propiedad de la matriz de actuar como formador de estructura para la matriz de tejido que se va a crear con las células migradas al interior. Además, la matriz forma un andamiaje o reja en el que las células pueden fijarse y encontrar un soporte para no verse arrastradas fuera de la matriz, por ejemplo, por el fluido sinovial o la sangre.

25 Con "porosidad abierta" se pretende decir, finalmente, en el sentido de la invención, que los espacios intersticiales entre las estructuras soporte de la matriz permiten un intercambio de materia y, en particular, de fluido con el entorno de la matriz. Preferentemente, el tamaño de poro de los poros se mide de modo que también se posibilite la entrada o un arrastre de las células. No obstante, por porosidad abierta, se entiende también, en el sentido de la invención, una estructura tal como la presente en geles. Aquí se preparan a través del esqueleto del formador de gel las estructuras de soporte de la matriz. Entre las mismas se encuentran capas de hidrato y fluido, en los que una entrada de las células y con los que un intercambio de fluido es posible. Las estructuras de gel correspondientes se entienden también como matrices con porosidad abierta en el sentido de la presente invención.

30 Las estructuras soporte con porosidad abierta se seleccionan preferentemente entre tejidos tejidos (tejidos de punto) o no tejidos, en particular estructuras de material no tejido y de fieltro, membranas, esponjas, guata, espumas de célula abierta, algodón, material trenzado, haces de fibras ordenadas y no ordenadas, materiales esponjosos y geles, así como combinaciones de los mismos. Preferentemente, la matriz presente una estructura de material no tejido o de fieltro. Las combinaciones de distintas estructuras, por ejemplo en disposición laminar son posibles y se encuentran en el ámbito de la presente invención.

35 El material de matriz es un material adecuado, biológica y farmacéuticamente aceptable. El material de la matriz que se usa en la matriz según la invención puede ser reabsorbible o no reabsorbible. Son preferentes los materiales reabsorbibles. La matriz comprende un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(glicólido, lactato) y mezclas de los mismos. Se trata de modo muy particularmente preferente de poli(ácido glicólico (PGA)) o poli(ácido láctico).

40 Como poli(ácidos glicólicos) se usan preferentemente poli(ácidos glicólicos) puros con pesos moleculares > 20.000, preferentemente de 30.000 a 70.000 g/mol, del modo más preferente de aproximadamente 50.000 g/mol. Como material de la matriz puede usarse, por ejemplo, un material no tejido de poli(ácido glicólico), tal como el que se comercializa por Alpha Research Switzerland GmbH con la denominación comercial PGA-Soft Felt®. Este material está certificado por la UE y, por lo tanto, es adecuado para fines farmacéuticos. Para este producto, el tiempo de reabsorción in vivo es aproximadamente de 40 a 60 días. Después de siete días in vitro, la resistencia mecánica es, como consecuencia de la hidrólisis de aproximadamente el 50 % del valor inicial.

45 El injerto acelular según la invención comprende, además de la matriz, un gel. Este gel está aplicado al menos sobre una cara de la matriz y/o penetra en la misma al menos parcialmente. Preferentemente, el gel penetra en la matriz totalmente. La matriz misma presenta preferentemente una estructura diferente a la de un gel. De modo muy particularmente preferente son estructuras más rígidas tal como se ha mencionado explícitamente anteriormente con excepción de los geles. El gel tiene preferentemente, por lo tanto, una rigidez inferior a la de la matriz. Del modo más preferente son estructuras de material no tejido y de fieltro, en las que se introduce un gel.

50 El gel puede ser un hidrogel natural o sintético. Presenta preferentemente una rigidez más reducida que la matriz. El gel puede ser ácido hialurónico. Sales adecuadas son, por ejemplo sales de metales alcalinos y alcalinotérreos de los geles mencionados. Del modo más preferente se trata de ácido hialurónico o un derivado de ácido hialurónico, en particular sal de ácido hialurónico tal como hialuronato de Na. Tal como se representa en la figura 1,

el uso de ácido hialurónico en combinación con una matriz según la invención muestra en particular relaciones particularmente ventajosas de peso en húmedo y peso en seco y es, por lo tanto, en el procesamiento del injerto, el secado y/o almacenamiento particularmente adecuado.

5 Mediante la adición de una determinada cantidad de una solución fisiológicamente adecuada puede adaptarse la dureza/rigidez del injerto a la dureza del cartílago y/o hueso del tejido del paciente.

10 Como cualidades del ácido hialurónico pueden usarse las cualidades preparadas de forma fermentativa. Alternativamente también es posible el uso de ácido hialurónico obtenido de animales. El peso molecular promedio de las cualidades usadas es habitualmente de entre 250 y 6.000 kDa, preferentemente de 1.000 a 2.000 kDa, del modo más preferente de aproximadamente 1.200 kDa. En el mercado se pueden obtener productos de ácido hialurónico adecuados. Por ejemplo, es adecuada la calidad de ácido hialurónico comercializado por TRB Chemedika AG con la denominación comercial Ostenil®. Este material está certificado por la UE y, por lo tanto, es adecuado para fines farmacéuticos.

15 Los geles pueden formarse por hinchamiento, precipitación o polimerización de un formador de gel adecuado en una solución fisiológicamente adecuada. Ejemplos de soluciones adecuadas de este tipo son agua y soluciones acuosas de sales (por ejemplo halogenuros (Cl, Br, I), carbonatos, fosfatos, citratos, acetatos de metales alcalinos y alcalinotérreos y similares), ácidos orgánicos, sustancias tampón y sus mezclas. Alternativamente pueden usarse soluciones complejas tales como medios de cultivo o fluidos corporales o soluciones derivadas de las mismas tales como fluido sinovial. La cantidad usada de formador de gel se mide de modo que se proporcione una viscosidad determinada al gel. Para ácido hialurónico esta se encuentra habitualmente en el intervalo de 0,5-50 mg/ml, preferentemente de 0,5-20 mg/ml, del modo más preferente de 10 mg/ml.

20 Del modo más preferente un injerto es de material no tejido o de fieltro de poli(ácido glicólico) como matriz en el que se introduce un gel de ácido hialurónico.

25 Las dimensiones del injerto acelular según la invención depende en general de las dimensiones del defecto que se desea tratar o del tamaño exigido del injerto. Las dimensiones se adaptan según necesidad por el médico que realiza el tratamiento. Para lesiones en tejido cartilaginoso, en particular en la articulación de la rodilla, estas medidas se encuentran habitualmente en el intervalo de 10 a 50 mm de longitud, de 10 a 50 mm de anchura y de 0,5 a 3 mm de espesor, preferentemente de 10 a 30 mm de longitud, de 10 a 30 mm de anchura y de 1 a 2 mm de espesor. Las más preferentes son medidas de 20 x 30 mm de anchura y longitud y de 1,1 a 2 mm de espesor. Las dimensiones correspondientes se adaptan para formas no cuadráticas, por ejemplo rectangulares, redondas, ovaladas, polilédricas, etc.

30 La matriz puede secarse después de ponerla en contacto con el gel. El secado del injerto según la invención permite por una parte el almacenamiento a largo plazo y por otra el uso sencillo del injerto en sí. De este modo el injerto puede usarse directamente después de un almacenamiento en estado seco o ponerse en contacto de nuevo con una solución solución.

35 El injerto secado posibilita la captación sencilla de solución acuosa antes del uso del injerto mediante un "efecto esponja". El injerto absorbe la solución acuosa por aplicación de la misma de forma sencilla sobre el injerto o por introducción del injerto en la solución acuosa. Para la introducción de una solución acuosa en el injerto antes de su uso es preferente una solución fisiológica de sal común y/o líquido sinovial.

40 Concentraciones adecuadas de la solución fisiológica de sal común y/o líquido sinovial son del 1 al 100 % en volumen del volumen contenido por la matriz de gel y fluido. Preferentemente son concentraciones del 10 al 90 %, preferentemente del 40 al 70 % y del modo más preferente del 50 % del volumen de líquido contenido mediante, entre otras cosas, fuerzas capilares. Para reducir la concentración de líquido sinovial por debajo del 100 % puede usarse líquido sinovial diluido con la solución acuosa. Preferentemente, el líquido sinovial se diluye con solución fisiológica de sal común.

45 El uso del injerto acelular según la invención no secado o secado sin ponerlo en contacto previamente con una solución acuosa para su injerto en un defecto posibilita mediante los gradientes de concentraciones presentes en pacientes la introducción pasiva de líquidos corporales, tales como líquido sinovial, en el injerto. El líquido sinovial introducido en el injerto de este modo con material mensajero contenido eventualmente en la solución acuosa aumenta la eficacia del injerto para el reclutamiento de células progenitoras mesenquimales de la médula ósea al injerto o al sitio del defecto.

50 El uso del injerto acelular según la invención no secado o secado después de la puesta en contacto con solución fisiológica de sal común antes del injerto para su injerto en un defecto posibilita la formación de un gradiente de concentraciones en sustancias mensajeras/sustancias propias del organismo en solución acuosa, tales como factores de crecimiento y de diferenciación y/o quimiocinas. Con ello se introducen sustancias mensajeras propias del organismo procedentes del líquido sinovial de forma pasiva mediante difusión en el injerto acelular, lo que aumenta la eficacia del injerto para el reclutamiento de células progenitoras mesenquimales de la médula ósea.

55 La actividad quimiotáctica de factores de crecimiento y de diferenciación tales como, por ejemplo, "la proteína-1 morfogénica derivada de cartílago" (CDMP1) o "el factor-5 de crecimiento y diferenciación" (GDF5) y "la proteína-2

5 morfogénica derivada de cartílago" (CDMP2) o "el factor-6 de crecimiento y diferenciación" (GDF6) sobre células madre y progenitoras mesenquimales se describe en el documento DE 199 57 388. La actividad quimiotáctica o el uso de quimiocinas tales como, por ejemplo, "el factor-1 α derivado de células estromales" (SDF1- α) o interleucina-8 (IL8), para el reclutamiento de células madre o progenitoras mesenquimales también se describe en el documento DE 103 33 901. La actividad quimiotáctica o el uso de suero humano para el reclutamiento de células progenitoras de la médula ósea se divulga en el documento DE 10 2005 030 614. El procedimiento de análisis para determinar la actividad quimiotáctica de sustancias también es conocido por el documento DE 10 2005 030 614.

10 El análisis de la actividad quimiotáctica de líquido sinovial de donantes normales y donantes con osteoartritis sobre células progenitoras mesenquimales de la médula ósea en el procedimiento de análisis descrito en la figura 3 dio como resultado sorprendentemente que el líquido sinovial humano de donantes sanos y de donantes con osteoartritis recluta una cantidad comparable de células progenitoras, en comparación con el suero. La cantidad de células de células progenitoras mesenquimales reclutadas en promedio con las correspondientes desviaciones típicas se representa en la figura 3. Los resultados están compilados en el Ejemplo 4.

15 El uso de líquido sinovial en el injerto acelular según la invención permite sorprendentemente un aumento de la eficacia del reclutamiento de células progenitoras mesenquimales de la médula ósea penetrada en comparación con factores de crecimiento y de diferenciación y/o quimiocinas en varios órdenes de magnitud (véase la figura 3). Esta eficacia de reclutamiento sorprendentemente aumentada permite renunciar a la introducción por separado de células o células progenitoras diferenciadas en el injerto mismo. Con ello se facilita enormemente la manipulación del injerto, la preparación del injerto se vuelve más sencilla debido a que no es necesaria ninguna etapa de manipulación en el injerto. Con ello se reduce mucho su tiempo de preparación, la preparación se vuelve más económica en el caso de una eficacia de reclutamiento comparable o igual de buena.

20 Sorprendentemente se ha demostrado que la eficacia de reclutamiento de líquido sinovial corresponde a la eficacia de reclutamiento del suero sanguíneo. El líquido sinovial es un componente integral de la articulación y se puede obtener de un modo sencillo a través de vías habituales. Esto puede realizarse preferentemente, en el caso de una puesta en contacto antes de la operación de injerto, directamente durante la operación de injerto del paciente. Al paciente se le puede reinjertar, por lo tanto, material autólogo, mientras que no es necesaria una adición de otros factores potencialmente alérgicos y/o inmunoactivos. Se evita una segunda actuación para extraer sangre del paciente para obtener suero.

25 Debido a que se posibilita la migración de las células y/o factores al interior del injerto sin el uso de células extrañas o sin el uso de sustancias comunicadoras biológicamente extrañas, se minimiza fuertemente el riesgo de infección y alérgico para el paciente. Además, este injerto "facilitado" según la invención puede secarse y/o almacenarse muy bien. Con ello éste es particularmente económico y fácil de usar.

30 La combinación de matriz y gel en el injerto acelular de la presente invención también tiene la ventaja de que el gel forma una barrera mecánica frente a otras células diferentes a las células progenitoras mesenquimales de la sangre que se introduce a través de las perforaciones de Pridie o fracturas similares. Con ello se posibilita una migración selectiva al interior del injerto de las células progenitoras mesenquimales. Ahora éstas, por lo tanto, se disponen de forma fija en la matriz y diferencian las células hícticas deseadas. Una sobreproliferación de las células formadoras de tejido deseadas no tiene lugar, por lo tanto, por medio de otras células o pueden evitarse esencialmente.

35 Simultáneamente, el gel proporciona, mediante su viscosidad, una propiedad viscoelástica al injerto, adaptándose las propiedades mecánicas del injerto a las propiedades de la matriz biológica natural del cartílago. Esta adaptación de las propiedades mecánicas o de la rigidez del injerto al tejido circundante protege el tejido cartilaginoso circundante y en caso de la articulación el opuesto y posibilita una carga más temprana de la articulación después de introducir el injerto en el paciente. Además, las propiedades viscoelásticas del injerto obtenidas por medio de la viscosidad del gel protegen el tejido inferior de cargas de impacto o presión mecánicas que favorecen una curación del defecto.

40 Debido a que mediante el secado puede ajustarse el contenido de humedad del injerto de matriz y gel antes del injerto de forma dirigida, es posible adaptar la elasticidad/dureza del injerto al paciente de modo que este no tenga ningún sentimiento de cuerpo extraño después del injerto.

45 Además, el injerto acelular según la invención, debido a la porosidad abierta de la matriz, posibilita una introducción de los componentes no celulares de la sangre mediante difusión, que posibilita la coagulación eficaz de la sangre y, con ello, la hemostasia en el defecto después de una microfractura o perforación de Pridie. El recubrimiento del defecto después de una microfractura con el injerto según la invención conduce a la hemostasia, que posibilita la curación más temprana del defecto.

50 El injerto acelular descrito anteriormente puede prepararse según un procedimiento en el que se ponen en contacto la matriz con el gel. Esta puesta en contacto puede realizarse por goteo, remojo, impregnación y/o empapamiento.

55 El procedimiento según la invención comprende una etapa de secado. El uso de una etapa de secado tiene la ventaja de que el injerto tiene capacidad de almacenamiento a largo plazo en forma seca. En caso de que el injerto acelular secado antes de su uso para el injerto se combine con una solución acuosa tal como una solución fisiológica de sal común y/o líquido sinovial, esto puede realizarse, por ejemplo, mediante empapamiento o remojo.

Mediante la nueva puesta en contacto del injerto secado con una solución acuosa puede adaptarse también simultáneamente la elasticidad/dureza del injerto individualmente al paciente.

5 El secado del injerto acelular puede realizarse mediante secado por convección, secado al aire, secado al vacío, secado por condensación, secado por microondas, secado por liofilización, secado por calor, secado químico o secado dieléctrico. Preferentemente se realiza el secado por liofilización.

10 Para la forma de realización preferente mencionada, a partir de material no tejido de poli(ácido glicólico) con gel de ácido hialurónico se introducen en el caso de unas dimensiones del material no tejido de 20 mm x 30 mm x 1,1 mm aproximadamente 600 µl de una solución de ácido hialurónico (10 mg/ml) en solución fisiológicamente adecuada en el material y se seca mediante secado por liofilización. Los injertos acelulares secados pueden humectarse mediante empapamiento con 1 a 2 ml de solución. Preferentemente, el empapamiento se realiza con solución fisiológica de sal común, con líquido sinovial y/o con líquido sinovial diluido.

15 El injerto de matriz y gel acelular según la invención puede usarse para cubrir el defecto y aumentar la viscoelasticidad del mismo para la regeneración histórica de tejidos mesenquimales y, en particular, para la regeneración de cartílagos y/o huesos. Preferentemente se usa para la regeneración de tejido mesenquimal. Es el más preferente el uso para la regeneración de cartílagos, en particular después de una perforación de Pridie o microfractura. El injerto actúa como recubrimiento inteligente, que se introduce exactamente en el cartílago después de una perforación de Pridie o microfractura para restaurar la superficie de la articulación. El material de la matriz, preferentemente material de fieltro proporciona estabilidad mecánica y funciona como estructura anatómica, que promueve la distribución homogénea tridimensional de células del paciente que migran al interior procedentes de la médula ósea o de huesos esponjosos y actúa hemostáticamente. El gel, tal como, por ejemplo, ácido hialurónico, actúa como barrera para impedir la migración al interior de glóbulos rojos y leucocitos e proporciona al injerto sus propiedades viscoelásticas, que protegen el tejido circundante o situado por debajo de esfuerzos mecánicos. Mediante el secado del injerto se logra una capacidad de almacenamiento a plazo más largo y se posibilita una introducción pasiva de líquidos sinoviales propios o sustancias mensajeras. Sorprendentemente se ha demostrado que el uso de líquido sinovial aumenta claramente el número de reclutamiento frente al uso de factores de crecimiento y de diferenciación, así como de quimiocinas o posibilita un número de reclutamiento comparable al suero (véase la figura 3).

Los ejemplos siguientes son para ilustrar la presente invención, pero no la limitan.

Ejemplo 1:

30 Un material no tejido de poli(ácido glicólico) comercializado con la denominación comercial PGA-Soft Felt® de la empresa Alpha Research Switzerland GmbH se cortó con las dimensiones 20 mm x 30 mm x 1,1 mm. El material se empapó con 0,6 ml de ácido hialurónico comercializado con la denominación comercial Ostenil® de la empresa TRB Chemedica AG a una concentración de 10 mg/ml usando un perfusor automático. La combinación de matriz y gel obtenida de este modo se secó durante aproximadamente 17 horas con el secador por liofilización Epsilon 2-6 LSC. Para ello la combinación gel-matriz se enfrió en 90 minutos de 20 °C a -20 °C y se dejó durante 3 horas a -20 °C. Como otra etapa de secado se dispuso un vacío de 1,03 hPa a -20 a°C durante 45 minutos. Después se realiza el calentamiento del injerto de matriz y gel de -20 °C a 20 °C en 2 horas 1,03 hPa, para secar durante otras 6,5 horas a 20 °C y 1,03 hPa. En la última etapa de secado se aumenta la temperatura en un intervalo de 1 hora a 25 °C y la presión a 0,011 hPa. Después de otras 2 horas a 25 °C y 0,011 hPa concluye la última etapa de secado.

40 La cantidad de líquido desalojado o secado en el injerto de matriz y gel acelular se estableció mediante determinación de peso. El peso correspondiente determinado se representa en la figura 1. En promedio se pesaron 0,6 ml de ácido hialurónico; 0,589 mg (AH). El Soft PGA Felt® de tamaño 20 x 30 x 1,1 mm pesó en promedio 0,155 mg (matriz). El peso en húmedo de la combinación de matriz y gel antes del secado en el secado por liofilización fue en promedio de 0,744 mg (peso en húmedo AH + matriz). El peso en seco de la combinación de matriz y gel después del secado por liofilización fue en promedio de 0,166 mg (peso en seco AH + matriz). El peso del líquido desalojado por secado de la combinación de matriz y gel fue en promedio de 0,579 mg (líquido desalojado).

Después del secado de la combinación de matriz y gel, el injerto acelular está listo para su uso o almacenamiento.

Ejemplo 2:

50 Un material no tejido de poli(ácido glicólico) comercializado con la denominación PGA-Soft Felt® de la empresa Alpha Research Switzerland GmbH se cortó con las dimensiones 20 mm x 15 mm x 1,1 mm. El material se empapó con 0,3 ml de ácido hialurónico comercializado con la denominación comercial Ostenil® de la empresa TRB Chemedica AG a una concentración de 10 mg/ml. El injerto de matriz y gel obtenido de este modo se secó durante 17 horas en el secador por liofilización.

55 Se demostró el mantenimiento de las propiedades viscoelásticas del injerto acelular de matriz y gel después del secado por liofilización mediante medición de la viscosidad dinámica. Los valores de la medición de la viscosidad obtenidos se muestran en la figura 2. Para medir la viscosidad dinámica se añadieron al injerto acelular de matriz y gel secado 0,3 ml de solución fisiológica de sal común y se incubó durante 16 horas a 4 °C con una ligera agitación. Para recuperar el ácido hialurónico rehidratado contenido en el injerto se transfirió el injerto a una punta de pipeta

dispuesta en un recipiente de reacción (1.000 Pl) y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos. La medición de la viscosidad dinámica se realizó en una dilución 1:10 con solución fisiológica de sal común en un microviscosímetro automático AMVn a 20 °C.

5 Para la comparación se determinó la viscosidad dinámica de solución fisiológica de sal común, del ácido hialurónico Ostenil® en dilución 1:10 con solución fisiológica de sal común y del ácido hialurónico de la combinación de matriz y gel antes del secado por liofilización en dilución 1:10 con solución fisiológica de sal común. Para la solución fisiológica de sal común se determinó en promedio una viscosidad dinámica de 1,09 mPa*s (sol. fis. de sal común) y para el ácido hialurónico Ostenil® en dilución 1:10 con solución fisiológica de sal común de, en promedio, 5,48 mPa*s (AH). La viscosidad dinámica del ácido hialurónico de la combinación de matriz y gel antes del secado en el secador por liofilización fue en promedio de 5,54 mPa*s (AH + matriz antes del secado). Después del secado por liofilización la viscosidad dinámica del ácido hialurónico del inferto acelular fue, en promedio, de 5,69 mPa*s (AH + matriz después del secado). Esto demuestra que el proceso de fabricación las propiedades viscoelásticas del ácido hialurónico no se alteran.

Después del secado del injerto de matriz y gel éste está listo para su uso o almacenamiento.

15 Ejemplo 3:

Un material no tejido de poli(ácido glicólico) con las medidas 20 mm x 30 mm x 1,1 mm se empapa con 0,6 ml de ácido hialurónico a una concentración de 10 mg/ml. La combinación de matriz y gel obtenida se seca en el liofilizador tal como se ha expuesto en el Ejemplo 1.

20 Para su uso se incubó el injerto acelular de matriz y gel seco durante 5 minutos en solución fisiológica de sal común.

25 Se limpia artroscópicamente un defecto del cartílago articular de la rodilla y se trata mediante microfractura según el procedimiento habitual. El injerto de matriz y gel acelular se introduce en la articulación y se usa para cubrir el defecto microfracturado y para la hemostasia. La fijación del recubrimiento en el defecto puede realizarse mediante adherencia con adhesivo de fibrina, cosiendo la matriz con el cartílago articular circundante (cosido de cartílago), anclando la matriz al hueso subcondrial (fijación transósea) o fijando la matriz al defecto por medio de un alfiler o aguja reabsorbible introducido en el hueso.

Ejemplo 4:

30 El análisis de la actividad quimiotáctica de líquido sinovial de donantes normales y donantes con osteoartritis sobre células progenitoras mesenquimales de la médula ósea dio como resultado sorprendentemente que el líquido sinovial humano de donantes sanos y de donantes con osteoartritis recluta una cantidad comparable de células progenitoras, en comparación con el suero. La cantidad de células de células progenitoras mesenquimales reclutadas en promedio con las correspondientes desviaciones típicas se representa en la figura 3.

35 El uso de suero bovino fetal al 10 % pudo activar en promedio 11.143 células progenitoras para la migración in vitro (SBF al 10 %). El suero humano al 5 % activó en promedio 10.715 células progenitoras para la migración (SH al 5 %). El líquido sinovial de donantes con osteoartritis activó en una dilución 1:2 con el medio de cultivo celular DMEM en promedio 8.907 células y el líquido sinovial de donantes normales, también en una dilución 1:2 con MEM, activó en promedio 9.920 células progenitoras para la migración.

40 En el documento DE 10 2005 030 614 se indica el número de células madre y progenitoras mesenquimales que se han reclutado con los factores de crecimiento y de diferenciación CDMP1 y CDMP2, con un máximo de 156 y un máximo de 38 células. Además se da a conocer que la quimiocina SDF1- α activado para la migración un máximo de 79 y mediante la quimiocina IL-8 un máximo de 814 células por 25 mm². El suero humano activó, en función de su formulación, entre 2.135 y 10.332 células mesenquimales para la migración.

Ejemplo 5:

45 Un material no tejido de poli(ácido glicólico) con las medidas 20 mm x 30 mm x 1,1 mm se empapa con 0,6 ml de ácido hialurónico a una concentración de 10 mg/ml. El injerto de matriz y gel obtenida se seca en el liofilizador tal como se ha expuesto en el Ejemplo 1.

Para su uso el injerto acelular seco se sumerge durante 10 minutos en líquido sinovial antológico diluido con una relación 1:2 con solución fisiológica de sal común, que se ha extraído intraoperativamente de pacientes que se desean tratar.

50 Se limpia artroscópicamente un defecto del cartílago articular de la rodilla y se trata mediante microfractura según el procedimiento habitual. El injerto acelular empapado en líquido sinovial se introduce en la articulación y se usa para cubrir el defecto microfracturado. La fijación del recubrimiento en el defecto puede realizarse mediante adherencia con adhesivo de fibrina, cosiendo la matriz con el cartílago articular circundante (cosido de cartílago), anclando la matriz al hueso subcondrial (fijación transósea) o fijando la matriz al defecto por medio de un alfiler o aguja reabsorbible introducido en el hueso.

REIVINDICACIONES

1. Injerto acelular constituido por
- 5 (i) una matriz cohesiva que forma un soporte con porosidad abierta de un material biológica y farmacéuticamente aceptable, comprendiendo la matriz un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(glicólido, lactato) y mezclas de los mismos, y
- (ii) un gel de un material biológica y farmacéuticamente aceptable, estando aplicado el gel sobre al menos una cara de la matriz y/o al menos parcialmente penetra en la misma y el gel es gel de ácido hialurónico.
2. Injerto acelular según la reivindicación 1, en el que la matriz es reabsorbible.
- 10 3. Injerto acelular según la reivindicación 1 ó 2, en el que la matriz presenta una estructura seleccionada entre tejidos o tejidos de punto, en particular estructuras de materiales no tejidos y de fieltro, membranas, esponjas, guata, espumas de células abiertas, algodón, material trenzado, haces de fibras ordenadas y no ordenadas, materiales esponjosos y geles, así como combinaciones de los mismos.
4. Injerto acelular según una de las reivindicaciones anteriores en el que la matriz comprende un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) y mezclas de los mismos.
- 15 5. Injerto acelular según una de las reivindicaciones anteriores en el que la matriz comprende poli(ácido glicólico) o es poli(ácido glicólico).
6. Injerto acelular según la reivindicación 1, en el que el gel es un hidrogel natural o sintético.
7. Injerto acelular según la reivindicación 1 ó 6, en el que el gel se ha secado sobre la matriz.
- 20 8. Injerto acelular según la reivindicación 7, realizándose el secado del gel mediante secado por convección, secado al aire, secado al vacío, secado por condensación, secado por microondas, secado por liofilización, secado por calor, secado químico o secado dieléctrico y, preferentemente, mediante secado por liofilización.
9. Procedimiento para la fabricación de un injerto acelular según una de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas siguientes:
- 25 (v) poner en contacto la matriz con el gel, aplicándose el gel sobre al menos una cara de la matriz y/o penetrando al menos parcialmente en la misma y el gel es gel de ácido hialurónico, y comprendiendo la matriz un material seleccionado del grupo constituido por poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(glicólido, lactato) y mezclas de los mismos, y
- (vi) secar el complejo de matriz y gel formado en (v).
- 30 10. Injerto acelular según una de las reivindicaciones 1 a 8 para usarlo para cubrir y aumentar la viscoelasticidad de defectos.
11. Injerto acelular según la reivindicación 10 para usarlo para cubrir defectos de tejido mesenquimal, particularmente cartílagos y/o huesos.
12. Injerto acelular según una de las reivindicaciones 1 a 8 para usarlo para la regeneración de tejidos.
- 35 13. Injerto acelular según la reivindicación 12 para usarlo para la regeneración de tejido mesenquimal, particularmente cartílagos y/o huesos.

Figura 1

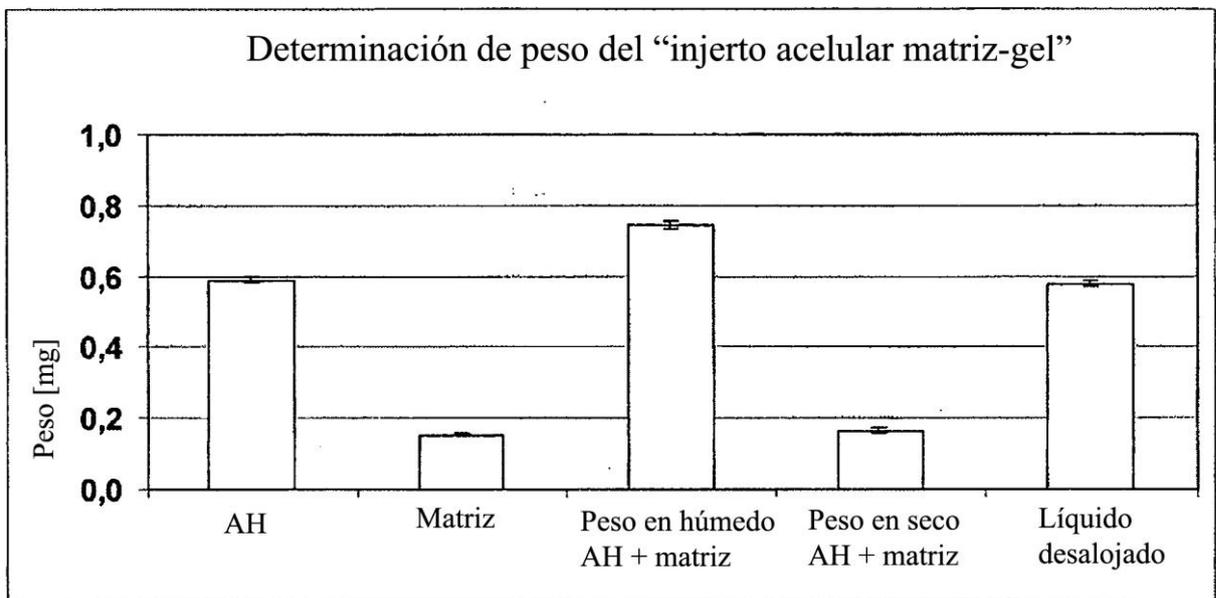


Figura 2

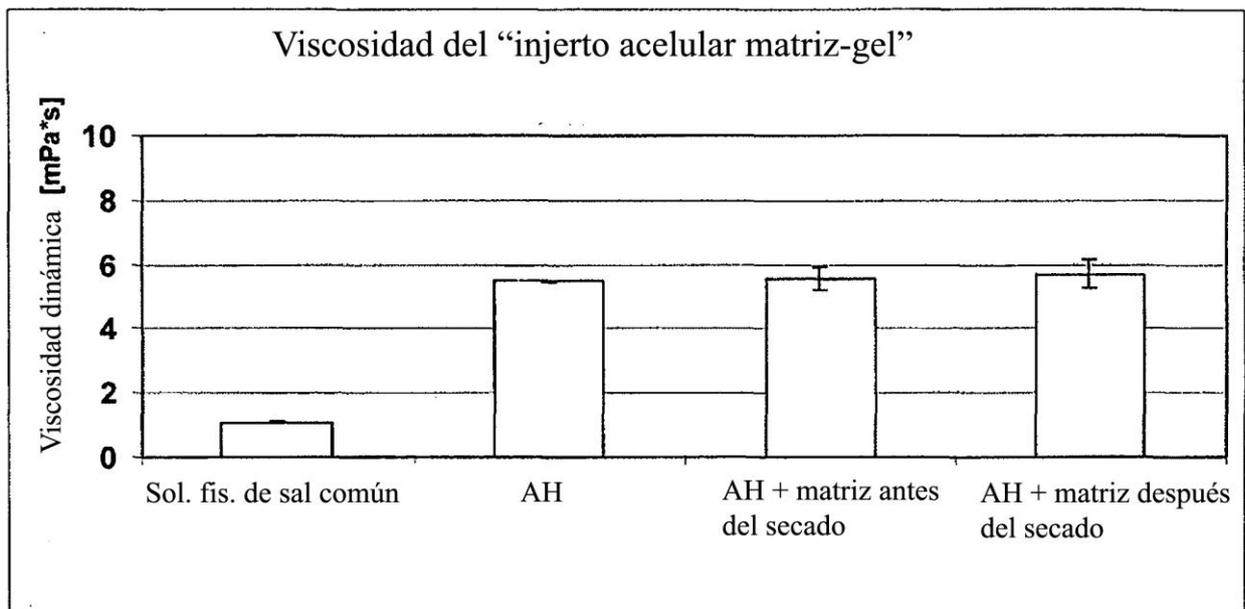


Figura 3

