

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 116**

51 Int. Cl.:  
**A61L 27/36** (2006.01)  
**A61L 27/56** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08737451 .8**  
96 Fecha de presentación: **16.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2164536**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2010**

54 Título: **Método para la preparación de un tejido orgánico acelular**

30 Prioridad:  
**31.05.2007 IT VI20070159**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.07.2012**

73 Titular/es:  
**Telea Biotech S.r.l.**  
**Via Leonardo Da Vinci, 13**  
**36066 Sandrigo (VI), IT**

72 Inventor/es:  
**Marzaro, Maurizio**

74 Agente/Representante:  
**GÓMEZ CALVO, Marina**

**ES 2 385 116 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**

La presente invención se refiere a un método para la preparación de un tejido acelular para la revitalización.

5 Es bien conocido en el sector médico, y más específicamente en el sector quirúrgico, que cada vez es más importante disponer de tejidos para el injerto en seres vivos con el fin de satisfacer la creciente necesidad de reemplazar partes de órganos u órganos completos.

La creación de sustitutos biológicos que se preparan en el laboratorio y posteriormente se trasplantan a receptores animales o humanos es un procedimiento médico que normalmente se designa mediante el término "ingeniería tisular".

De acuerdo con una técnica conocida, se preparan tejidos para injertos en el laboratorio implantando células en una matriz consistente en un medio de soporte inorgánico que normalmente se denomina un "andamio".

10 El "andamio", que se utiliza para compensar una pérdida de sustancia del órgano que se está tratando, facilita la organización tridimensional de las células hasta que se haya completado la formación de nuevo tejido.

El andamio debe experimentar a continuación un proceso de degradación hasta que desaparece por completo y es reemplazado por el tejido regenerado, proceso que se ve facilitado por las células implantadas en dicho andamio.

15 Este método permite la obtención de trasplantes con andamios artificiales o naturales (es decir, procedentes de un donante) que pueden obtenerse de seres humanos o de animales, como por ejemplo la pared esofágica.

Para utilizar un andamio natural obtenido de un donante para el trasplante en otro ser humano, en primer lugar es necesario tratar el tejido con el fin de eliminar todas las células existentes entre las fibras del tejido conectivo y, a continuación, reimplantar células humanas pertenecientes al receptor del injerto (el "anfitrión") con el fin de evitar el fenómeno del rechazo.

20 Puesto que las técnicas utilizadas para crear un andamio, es decir, una matriz acelular, comenzando a partir de tejidos recogidos de un donante son bien conocidas, no se describirán detalladamente en este documento; de una manera resumida, dichas técnicas consisten en la inmersión del tejido que vaya a tratarse en un fluido que contenga sustancias enzimáticas capaces de digerir y destruir las células vivas contenidas en el tejido sin dañar las fibras conectivas del tejido.

25 Una vez se ha creado una matriz de tejido acelular, lista para recibir las células obtenidas del anfitrión, dicho tejido, o andamio, se prepara en lo que se denomina un "plato de Petri" (o un recipiente similar), que consiste en una bandeja utilizada habitualmente en los laboratorios médicos en cuyo fondo se coloca el tejido que se ha de revitalizar.

El tejido se revitaliza implantando células madre del futuro receptor y nutriéndolas con un caldo de cultivo celular que alimenta las células, manteniéndolas vivas y permitiendo que se multipliquen y se diseminen.

30 Básicamente, las células madre situadas inicialmente en la superficie superior del tejido se desplazan a través de los intersticios naturales del tejido del andamio – intersticios que previamente estaban ocupados por las células del donante.

35 Una vez transcurrido un cierto período de tiempo, bajo temperaturas controladas y en presencia de las sustancias nutritivas contenidas en el caldo de cultivo, las células vivas se reposicionan en los intersticios del tejido, quedando éste listo para el trasplante en el órgano anfitrión.

Hay que señalar que las células que se utilizan normalmente para revitalizar el andamio son células madre, que subsiguientemente se diferencian (o quizás ya lo habían hecho anteriormente) y adquieren la función específica del órgano en el que se injerta el tejido revitalizado).

40 El éxito o el fracaso del trasplante de tejido tratado de esta manera dependen de la difusión capilar de las células a través de la matriz tisular.

Si la difusión resultara difícil o se produjera en la superficie, pero no en profundidad, la revitalización del tejido transplantado no es adecuada y se inicia un proceso necrótico que provoca el fallo del trasplante.

45 En base a lo expuesto anteriormente, resulta evidente que es esencial e importante, por no decir imprescindible, asegurar la revitalización en profundidad de todas las partes del tejido, especialmente a través de la totalidad de su grosor.

Por el momento, incluso cuando los tratamientos preparatorios y revitalizantes se aplican durante un período de tiempo lo suficientemente largo, sigue siendo imposible asegurar la obtención de unos resultados lo suficientemente fiables como para garantizar que no se produzcan fallos de los injertos.

Esto se debe a la escasa penetración de las células vivas que se reimplantan en el andamio.

En términos prácticos, este inconveniente limita considerablemente las posibilidades de preparar tejidos adecuados para el trasplante puesto que los tejidos de mayor grosor no se revitalizan totalmente después del trasplante debido a la imposibilidad de que produzca la penetración hasta la suficiente profundidad.

5 Resulta por lo tanto evidente que la técnica actual solo es adecuada para el trasplante de tejidos de grosor muy limitado, que no supere aproximadamente 0,1 mm.

En la Patente de los Estados Unidos 5 112 354 se describe la preparación de un aloinjerto óseo en la que en primer lugar se retira todo el tejido blando y, a continuación, se texturiza la superficie con el fin de producir un patrón de orificios adaptados para facilitar la desmineralización del hueso e incrementar la superficie para la interacción con células mesenquimales introducidas subsiguientemente. Los orificios se efectúan mediante taladrado mecánico o por láser.

10 El propósito de la presente invención consiste en desarrollar un método para la preparación de tejidos acelulares que supere los inconvenientes arriba indicados.

15 Más específicamente, el propósito de la invención consiste en desarrollar un método para la preparación de tejido orgánico acelular de manera que, cuando dicho tejido se revitalice con células madre, a dichas células les resulte más fácil penetrar y colonizar todo el espacio posible en la red de fibras de tejido conectivo, con el fin de recrear sustancialmente las mismas condiciones del tejido antes de que se desvitalizara.

Otro propósito de la presente invención consiste en conseguir una reducción significativa e importante del tiempo de tratamiento necesario para revitalizar el andamio acelular una vez se han añadido las células vivas con el fin de preparar el tejido para el trasplante.

20 Los propósitos de la invención se consiguen mediante un método para la preparación de tejido orgánico acelular según el contenido de la reivindicación 1.

Más específicamente, este método consiste en la creación de un número de orificios en la superficie del tejido que se esté preparando; estos orificios penetran hasta al menos una parte del grosor y preferiblemente la totalidad del grosor del tejido en cuestión.

25 Estos orificios se obtienen mediante un dispositivo que contiene agujas con una corriente adecuada que las atraviesa y sin inducir ninguna alteración (desgarro, necrosis, reducción o incremento del grosor, cambios en el contenido de fluido o coagulación) en el tejido conectivo que rodee el orificio que se está creando. Los orificios pueden practicarse a través del grosor del tejido que se está tratando utilizando diversos dispositivos y métodos, siempre que la preparación de dichos orificios no provoque ningún deterioro tanto del tejido conectivo que rodee el orificio como del andamio en general.

30 De acuerdo con la descripción que se ofrece a continuación, el propósito de la presente invención y los mejores resultados en términos cualitativos para los orificios creados en el tejido se consiguen mediante la aplicación de tensión de alta frecuencia (normalmente 4 MHz) a la punta de cada aguja utilizada para crear dichos orificios, de manera que se induzca el paso de una corriente eléctrica que, aunque débil, sea lo suficientemente fuerte para romper las uniones entre las moléculas del tejido conectivo, creando así un orificio pero sin inducir ninguna rotura de las moléculas.

35 De esta manera se producen orificios de pequeño diámetro, básicamente de las mismas dimensiones que el calibre de la aguja que se esté insertando.

Es importante utilizar agujas de calibre muy estrecho, por ejemplo del orden de 50  $\mu\text{m}$ , pero suficiente para facilitar la penetración de las células en el interior de dichos orificios con el fin de revitalizar el tejido adyacente.

40 Resulta lógico y evidente que la creación de un gran número de orificios equivale a preparar nuevas rutas para el injerto de células en las partes más profundas del tejido, asegurando así la revitalización completa del tejido en cuestión.

45 Utilizando el método según la presente invención no existe prácticamente ningún límite para el grosor de los tejidos que pueden prepararse para el trasplante, ya que los orificios pueden efectuarse a través de la totalidad del grosor del tejido y en toda su superficie, permitiendo su revitalización completa puesto que las células vivas reimplantadas en el andamio acelular pueden penetrar a través del tejido. En la descripción de una realización preferente de la invención, ofrecida a modo de ejemplo sin carácter limitador, se resaltarán con mayor detalle otras características y propiedades adicionales de la invención.

La invención se describe a continuación con la ayuda de los planos adjuntos, en los que:

- La Figura 1 muestra una sección transversal esquemática de un dispositivo que incluye un soporte con un conjunto ordenado de agujas apoyadas sobre el grosor del tejido que se está preparando para la revitalización.
- 50 - La Figura 2 muestra una de las agujas en el soporte.
- La Figura 3 muestra la disposición del conjunto ordenado de agujas.

- La Figura 4 muestra una vista esquemática del dispositivo para el desplazamiento del soporte de las agujas.

De acuerdo con la presente invención, un tejido orgánico acelular previamente tratado, lo que se denomina el andamio, se deposita en el fondo de un plato de Petri (u otro recipiente similar) de manera que se sitúe extendido sobre una superficie plana.

5 Varias agujas, como la indicada por el número 1 y mostrada en la Figura 2, están dispuestas formando un conjunto ordenado, por ejemplo para formar un cuadrado, indicado todo el conjunto por el número 3, de manera que se asegure una disposición ordenada de las agujas que preferiblemente están separadas por la misma distancia, es decir, se sitúan equidistantes unas de otras.

10 El cabezal 11 de cada aguja 1 está conectado eléctricamente, es decir, mediante una placa conductora de metal fijada al soporte 20 de dicho conjunto ordenado de agujas. Dicha placa 2 está conectada a un hilo eléctrico 21 que a su vez recibe la salida de un generador (4).

Dicho generador 4 es un generador de tensión, preferiblemente generando 200 – 230 voltios, pero a una frecuencia de onda de 4 MHz, que se obtiene mediante el uso de circuitos eléctricos. Puesto que dichos circuitos eléctricos son bien conocidos, en aras de la brevedad no se describen en este documento.

15 La onda senoidal de tensión generada en la salida 41 del generador es preferiblemente una onda senoidal distorsionada y, por lo tanto, con armónicos de al menos primer, segundo y tercer orden.

La potencia del generador 4 se ajusta de manera que la corriente disponible en la punta de cada 1 sea de entre 2 y 2,5 mA.

20 Cuando la punta de cada aguja se apoya sobre la superficie 51 del tejido orgánico 5, el contacto entre la punta de cada aguja 1 y el tejido orgánico permite el paso de una corriente de aproximadamente 2 – 2,5 mA, tal como se ha mencionado anteriormente.

Dicha corriente transmite una energía a las moléculas adyacentes que corresponde (tal como se ha demostrado experimentalmente) a lo que se denomina “resonancia molecular”.

25 La energía es justo lo bastante intensa como para romper las uniones entre las moléculas afectadas por el paso de la corriente, mientras que en el área circundante no provoca desgarros, necrosis, reducción o incremento del grosor, cambios en el contenido de fluido, coagulación u otra degeneración tisular.

Básicamente, esta apertura creada en las uniones moleculares equivale a la creación de un orificio extremadamente pequeño que, en términos prácticos, tiene el mismo diámetro que cada aguja 1, es decir, aproximadamente 50 – 55 µm.

30 Naturalmente puede utilizarse agujas de diferente calibre, mayor o menor, siempre que el usuario tenga en cuenta que el calibre mínimo de la aguja no puede ser menor que el diámetro de las células utilizadas para la revitalización.

El soporte 20 del conjunto ordenado de agujas 3 se empuja en la dirección hacia la que apuntan las agujas y avanza a un ritmo lo suficientemente lento de manera que, cuando la aguja se desplaza hacia delante, la punta de la aguja encuentra el orificio ya creado por el flujo de corriente y la consiguiente ruptura de las uniones moleculares.

35 Es fácil constatar que no se produce por lo tanto desgarramiento del tejido conectivo y que se consigue un orificio estrecho correspondiente al calibre de la aguja que se esté insertando.

Tal como se ha explicado anteriormente, esto es especialmente importante y útil debido a que así las células que se reimplantan en el tejido pueden penetrar en profundidad a través del tejido e injertarse en las paredes de los orificios, donde pueden multiplicarse y revitalizar muy rápidamente la totalidad del grosor del tejido orgánico.

40 Tal como se muestra en la Figura 1, las agujas 1 penetran, preferible pero no necesariamente, oblicuamente a la superficie 51 del andamio 5, con el fin de incrementar la longitud de los orificios y, por lo tanto, de obtener el máximo efecto de canalización en el andamio.

Los experimentos realizados han demostrado que un ángulo de 60 grados con respecto a la vertical es más efectivo en el proceso de revitalización debido a que los orificios resultantes tienen una longitud mayor que el grosor del andamio.

45 Los ensayos de laboratorio realizados han demostrado que aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> son unas dimensiones útiles para el conjunto ordenado de agujas 3 que contiene las agujas 1, en un número de aproximadamente 200 agujas. En ese caso, la corriente suministrada por el generador 4 no es superior a 500 mA.

Naturalmente, el procedimiento de perforación debe repetirse por toda la superficie 51 del andamio con el fin de obtener una distribución homogénea de las agujas a través del grosor y en la totalidad de la superficie útil del tejido para trasplante.

Para ello, la presente invención utiliza un dispositivo para practicar los orificios que ofrece la ventaja de incluir un medio 30 para el desplazamiento del soporte 20 a lo largo de tres ejes cartesianos, es decir, a lo largo del eje vertical, o eje oblicuo Z, y a lo largo de los ejes cartesianos X e Y, paralelamente al plano de la superficie 51, tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 4.

- 5 Una vez se han efectuado los orificios en una cierta parte del andamio 5, el soporte 20 puede desplazarse y puede repetirse el procedimiento de una manera ordenada con el fin de cubrir la totalidad de la superficie 51.

Obviamente, si el soporte 20 que sustenta el conjunto ordenado de agujas 3 se conecta a un medio de desplazamiento programable 30, como por ejemplo motores paso a paso gobernados por una unidad de control electrónico, el procedimiento puede repetirse de manera automática y secuencial y con el máximo nivel de precisión.

- 10 Una vez completada la serie de orificios en el tejido acelular 5, tal como se ha explicado anteriormente, resulta evidente que dicho tejido acelular puede colocarse en un plato de Petri, u otro recipiente similar, al que entonces pueden añadirse las células vivas, que normalmente son células madre tomadas del anfitrión destinado a recibir injerto.

- 15 Nutridas adecuadamente con un caldo de cultivo, dichas células madre pueden ocupar rápida y fácilmente todos los orificios efectuados por las agujas 1, asegurando así una revitalización efectiva y completa de la totalidad del tejido para el trasplante.

Resulta evidente que el método de la presente invención cumple satisfactoriamente todos los objetivos de la invención, ya que se asegura una revitalización efectiva y perfecta y se evita cualquier riesgo de fallo del trasplante subsiguiente.

Además, el proceso de revitalización se produce con mucha mayor rapidez que cuando se utiliza la técnica conocida y con unos resultados extremadamente satisfactorios.

- 20 Cuando las características técnicas mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones van seguidas por signos de referencia, dichos signos de referencia se han incluido exclusivamente con el fin de facilitar la comprensión de las reivindicaciones y, por lo tanto, dichos signos de referencia no tienen ningún efecto limitador sobre la interpretación de cada elemento identificado a modo de ejemplo mediante dichos signos de referencia.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de un tejido orgánico acelular para la revitalización mediante la reimplantación de células vivas, que incluye las siguientes etapas:
  - preparación de dicho tejido acelular sobre una superficie fundamentalmente plana;
- 5       • creación de un gran número de orificios sobre la superficie de dicho tejido, distribuidos por la totalidad de dicha superficie, posicionados de manera que se extiendan al menos a través de parte del grosor de dicho tejido y siendo adecuados para contener las células vivas cuando éstas se reimplanten,
 

**caracterizado por el hecho de que** los numerosos orificios se crean mediante una o más agujas de metal conectadas a una fuente de alimentación eléctrica que induce, en la punta de cada aguja, el paso de una corriente con la intensidad y la forma de onda precisas para proporcionar la energía suficiente para romper las uniones entre las moléculas que forman el tejido orgánico en las proximidades de la punta de la aguja, creándose cada orificio mediante dicho paso de corriente y teniendo cada orificio unas dimensiones lo suficientemente grandes como para que la punta de dicha aguja se introduzca en el espacio creado por la apertura de dichas uniones moleculares.
- 10       2. Método según la reivindicación 1), **caracterizado por el hecho de que** dicha aguja o agujas de metal están alimentadas eléctricamente con una corriente alterna de tipo de onda senoidal con una frecuencia de aproximadamente 4MHz.
- 15       3. Método según la reivindicación 2), **caracterizado por el hecho de que** dicha fuente de alimentación a la aguja o las agujas tiene armónicos de hasta al menos tercer orden.
- 20       4. Método según las reivindicaciones 2) o 3), **caracterizado por el hecho de que** dicha tensión eléctrica aplicada a la agujas o las agujas es del orden de 200 – 230 voltios.
- 25       5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por el hecho de que** la profundidad de dichos orificios corresponde a la totalidad del grosor de dicho tejido orgánico.
- 25       6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1) a 4), **caracterizado por el hecho de que** la longitud de dichos orificios es mayor que el grosor de dicho tejido orgánico acelular.
- 30       7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1) a 5), **caracterizado por el hecho de que** los numerosos orificios se sitúan en una dirección fundamentalmente perpendicular a la superficie de dicho tejido.
- 30       8. Método según la reivindicación 6), **caracterizado por el hecho de que** los numerosos orificios se sitúan oblicuamente con respecto a la superficie de dicho tejido.
- 35       9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que todos los numerosos orificios de la superficie el tejido orgánico acelular, adecuados para albergar células para la revitalización de dicho tejido, se efectúan utilizando un dispositivo consistente en:
  - dicha aguja o agujas de metal (1) dispuestas en un soporte (20);
  - una fuente de alimentación eléctrica (4) que suministra la alimentación eléctrica mencionada anteriormente y que está conectada a dicha aguja o agujas, siendo dicha fuente de alimentación adecuada para suministrar una corriente a la punta de cada aguja con la intensidad y la forma de onda precisas para proporcionar la energía suficiente para inducir la apertura de las uniones entre las moléculas del tejido orgánico que entre en contacto con la punta de dicha aguja.
- 40       10. Método según la reivindicación 9), **caracterizado por el hecho de que** dicha fuente de alimentación eléctrica consiste fundamentalmente en un generador de tensión de onda senoidal a una frecuencia de aproximadamente 4 MHz.
- 45       11. Método según la reivindicación 9), **caracterizado por el hecho de que** dicho dispositivo incluye un número de agujas dispuestas en un soporte (20) de manera que se cree un conjunto ordenado de filas de agujas (3), fundamentalmente paralelas entre sí y situándose dichas agujas equidistantes unas de otras.
- 45       12. Método según la reivindicación 9), **caracterizado por el hecho de que** el calibre de las aguja o las agujas es de al menos 50 – 55  $\mu\text{m}$ .
- 45       13. Método según la reivindicación 9), **caracterizado por el hecho de que** el calibre de la aguja o agujas es mayor que las dimensiones máximas de una célula revitalizadora.

14. Método según la reivindicación 11), **caracterizado por el hecho de que** dichas agujas se sitúan en una disposición fundamentalmente paralela con respecto a dicho soporte (20).
15. Método según la reivindicación 11), **caracterizado por el hecho de que** dicho soporte (20) se sitúa oblicuamente con respecto a la superficie del tejido orgánico que se esté perforando.
- 5 16. Método según la reivindicación 9), **caracterizado por el hecho de que** dicho dispositivo incluye un medio (30) para desplazar dicha aguja o agujas a lo largo de al menos un eje incidente sobre la superficie de dicho tejido y a lo largo de al menos un eje paralelo a dicha superficie de dicho tejido orgánico.
- 10 17. Método según la reivindicación 16), **caracterizado por el hecho de que** dicho medio de desplazamiento induce un movimiento a lo largo de dos ejes cartesianos que se sitúan fundamentalmente paralelos a la superficie de dicho tejido orgánico.

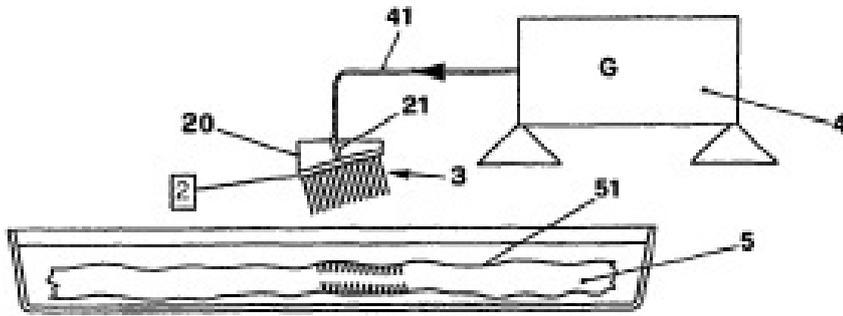


FIG. 1

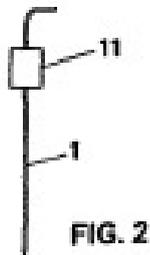


FIG. 2

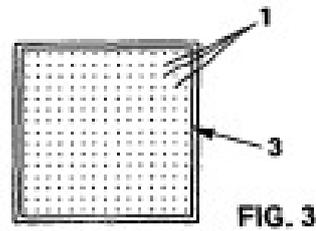


FIG. 3

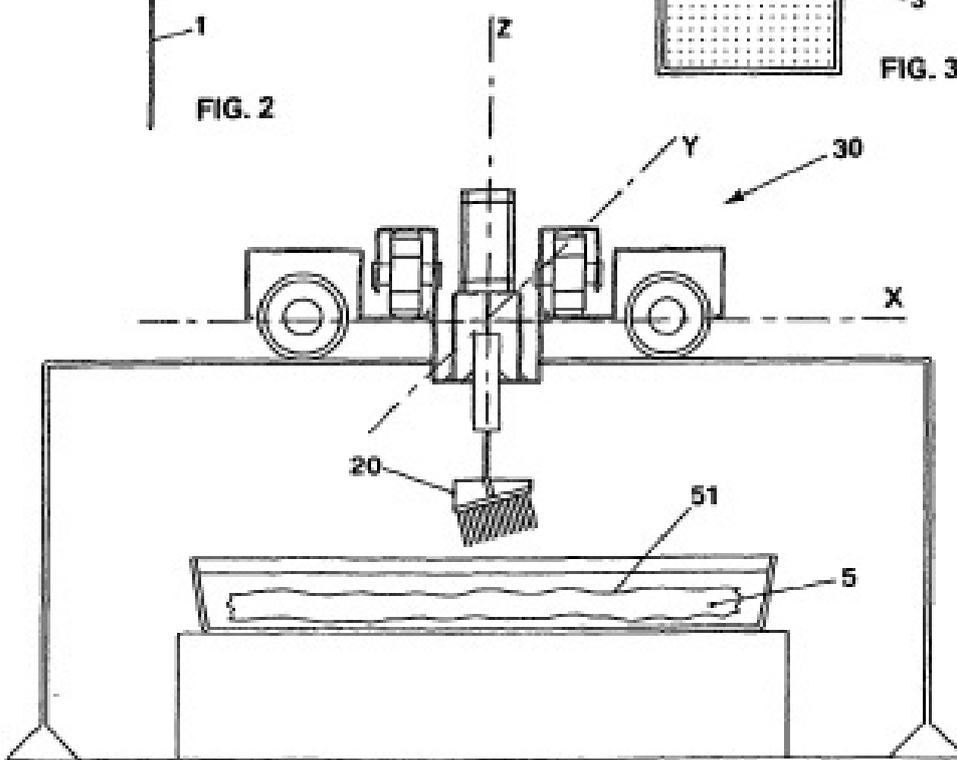


FIG. 4