

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 403**

51 Int. Cl.:  
**A61L 27/52** (2006.01)  
**C08L 5/04** (2006.01)  
**A61L 27/28** (2006.01)  
**A61L 27/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06779725 .8**  
96 Fecha de presentación: **16.06.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1901791**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **Composición biocompatible para reemplazar o regenerar tejidos**

30 Prioridad:  
**20.06.2005 IT PI20050071**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.12.2012**

73 Titular/es:  
**CALVOSA, GIUSEPPE (100.0%)**  
**VIA RANDACCIO, 24**  
**56123 PISA, IT**

72 Inventor/es:  
**BERNARDINI, NUNZIA;**  
**LAZZERI, LUIGI y**  
**CASCONE, MARIA GRAZIA**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 393 403 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**

Composición biocompatible para reemplazar o regenerar tejidos

Campo del invento

5 El presente invento se refiere al sector médico/quirúrgico y con mayor exactitud se refiere a una composición biocompatible destinada a reemplazar o regenerar tejidos biológicos.

En particular, pero no de manera exclusiva, dichos tejidos pueden ser tanto tejidos articulares, por ejemplo tejidos de discos intervertebrales, como tejidos no articulares, tales como huesos del esqueleto.

10 En el caso de los discos intervertebrales, el campo de interés del invento es el de recuperar la funcionalidad de la columna vertebral de los pacientes con una cirugía espinal mínimamente invasiva y, en particular, para pacientes sujetos a un proceso involutivo del disco debido a una degeneración del núcleo pulposo.

Antecedentes del invento

15 En el tratamiento de los tejidos se percibe que el problema es el de regenerar unos huesos que tienen una estructura biológica y unas características biomecánicas especiales, en particular, tejidos articulares, tales como por ejemplo tejidos de los discos intervertebrales, pero también tejidos no articulares, tales como el tejido óseo del esqueleto.

20 Unos tejidos articulares están presentes en la columna vertebral y tienen una función relevante. Tal como es sabido, la columna vertebral se compone de una sucesión de estructuras óseas, las vértebras, que están enlazadas mediante discos fibrosos - elásticos, los denominados discos intervertebrales. Estos discos tienen la función de los absorbentes de choques entre las partes de vertebras, y se componen de un tejido fibro-cartilaginoso organizado con el fin de formar: una parte periférica laminar, normalmente denominada anillo, y una parte central blanda, denominada núcleo pulposo. Los discos intervertebrales están conectados firmemente con las superficies orientadas hacia las vertebras, denominadas placas cartilaginosas, o placas terminales, que llevan a cabo una tarea clave dentro del tropismo de los discos. El anillo, también denominado anillo fibroso, se compone de una sucesión de capas concéntricas de tejido fibroso en las que están presentes unas fibras organizadas de colágeno. Esta estructura permite que el anillo consiga un alto módulo de tracción.

30 En el núcleo pulposo, está presente una masa gelatinosa ovoidea embebida en el anillo. Ella tiene una consistencia elástica y resiliente y, debido a su alto contenido de agua, es deformable pero no compresible. Ella contiene células conjuntivas y células cartilaginosas, a solas o agrupadas. También están presentes unas células vesiculosas que ponen en evidencia su derivación a partir de la espina dorsal. La parte sustancial tiene una naturaleza mucoproteínica; con la edad disminuye el contenido de agua y de mucoproteínas del núcleo, mientras que aumenta el contenido de colágeno.

35 El componente principal de la matriz de tejido conjuntivo amorfo del núcleo es un polímero muy hidrófilo denominado "agrecano", que pertenece a la familia de los proteoglicanos, y que es capaz de absorber una cantidad considerable de agua y luego formar una matriz similar a un gel. La cantidad de agua adsorbida por el núcleo depende no solamente de la composición de la matriz polimérica sino también de la presión externa normalmente soportada por el disco. En un disco sano de un individuo joven (de 18 años) el 80 % del núcleo se compone de agua, pero esta proporción disminuye hasta 69 con la edad (a los 77 años). La característica mecánica de un disco resulta de la morfología y de la firmeza de las dos estructuras que lo constituyen: el anillo y el núcleo pulposo. Dicha característica hace posible que los discos intervertebrales lleven a cabo dos funciones esenciales; mantener la estabilidad y firmeza de la columna vertebral y al mismo tiempo darle una flexibilidad suficiente.

45 La degeneración del disco comienza con frecuencia con unos cambios estructurales de la sustancia intercelular amorfa: hay una pérdida de agrecano debida a una proteólisis, el núcleo pierde su capacidad de combinarse con agua y entonces el disco crece más delgado, perdiendo su capacidad de resistencia. A su vez esto causa una compresión más alta sobre el anillo, que hace que su estructura sea más susceptible a una deslaminación o disgregación y luego a un deterioro. Este deterioro para el anillo acelera a su vez la degeneración del disco, con una pérdida de resistencia mecánica del mismo.

La reparación de un disco intervertebral se puede hacer reemplazando todo el disco ("disco artificial total") o reemplazando solamente el núcleo ("núcleo artificial").

50 El hecho de cambiar solamente el núcleo puede tener muchas ventajas con respecto al hecho de cambiar todo el disco. Ante todo, permanecen el anillo y las placas cartilaginosas originales y por lo tanto continúan llevando a cabo

5 su función. Además, la operación quirúrgica puede ser mucho más simple, puesto que una prótesis de núcleo puede ser implantada con una cirugía mínimamente invasiva. De acuerdo con la configuración y con el material que se escojan, es posible implantar el dispositivo usando una técnica endoscópica que requiere solamente una pequeña incisión del anillo. Todo esto puede reducir los riesgos asociados con el implante con respecto a los que están asociados con el implante de un disco artificial total.

10 No obstante, este tipo de método se puede usar solamente en unos pacientes en donde una degeneración del disco está en una etapa temprana o intermedia, cuando el anillo es todavía perfectamente integral o enterizo. En lo que concierne al material, puesto que las prótesis metálicas serían demasiado duras para el núcleo, se han ensayado muchos elastómeros (tanto los previamente formados como los formados in situ). Sin embargo, la mayor parte de éstos tienen problemas de biocompatibilidad y/o unas características mecánicas inadecuadas.

Unos ejemplos del uso de estos elastómeros para reemplazar al núcleo pulposo, tanto por medio de unos implantes, como por aplicación de un hidrogel, se dan en el documento de solicitud de patente internacional WO 2004/098756, por medio de unos materiales no naturales, capaces de proporcionar problemas de biocompatibilidad.

15 Se conocen también unos sistemas de "andamiaje" de células, como se describen en el documento de patente de los EE.UU. US 6872387, para reconstruir tejidos in vitro, incluso si se requiere un tratamiento invasivo para implantar los tejidos regenerados en los pacientes.

El documento WO 03/087303 describe una composición para el reemplazo de piel, que comprende un alginato, una gelatina y unas células tales como condrocitos, osteoblastos o fibroblastos, en donde el alginato o la gelatina se ha reticulado por  $\text{CaCl}_2$ .

20 El documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2001/016772 describe un material compuesto para la reparación de cartílagos, que comprende una matriz de colágeno, un alginato y condrocitos en donde el alginato se ha reticulado por la adición de  $\text{CaCl}_2$ .

25 El documento WO 02/057355 describe una composición para la reparación de juntas y articulaciones, que comprende un polisacárido reticulable químicamente y un segundo polisacárido y condrocitos en donde el alginato es reticulado por la adición de  $\text{CaCl}_2$ .

El documento WO 96/40304 describe una composición de hidrogel para la reparación de tejidos tales como defectos de cartílagos, que comprende un alginato y células tales como condrocitos y un agente de reticulación, p.ej. calcio; además pueden estar presentes unos factores de crecimiento.

30 El documento WO 96/28539 describe una composición para la reparación de defectos de cartílagos o huesos, que comprende un hidrogel tal como un alginato que es reticulado con cationes de calcio y células madres mesenquimales.

#### Sumario del invento

35 Entonces, una característica del presente invento es la de proporcionar una composición destinada a reemplazar o regenerar tejidos, que sea completamente biocompatible y que se pueda aplicar con una cirugía espinal mínimamente invasiva.

40 Una característica particular del invento es la de proporcionar una composición que esté adaptada para reemplazar o regenerar al núcleo pulposo de un disco intervertebral y que permita una plena recuperación de la funcionalidad de la columna vertebral de un individuo afectado por patologías de la columna vertebral, a través de una metodología biocompatible y mínimamente invasiva.

Estos y otros objetivos se alcanzan mediante la composición biocompatible de acuerdo con el invento para reemplazar o regenerar tejidos, en particular, tejidos articulares tales como el núcleo pulposo de discos intervertebrales, o también otros tejidos no articulares tales como tejidos óseos, comprendiendo esta composición:

- 45
- una matriz de hidrogel que comprende unos polímeros naturales primero y segundo, en donde uno entre dichos polímeros naturales primero y segundo es un alginato de sodio;
  - unas células adaptadas para regenerar a dichos tejidos;
  - un agente de reticulación adaptado para reticular por lo menos a uno de dichos polímeros naturales in situ, dando a la composición biocompatible por consiguiente una resistencia apropiada;

50 cuya característica principal es la de que el agente de reticulación está contenido en partículas poliméricas biodegradables con liberación controlada, liberando dichas partículas poliméricas biodegradables a dicho agente de reticulación de una manera controlada para efectuar selectivamente una acción reticulante sobre dicho alginato de sodio.

Preferiblemente, se añaden a dicha composición unas moléculas adaptadas para estimular el crecimiento y/o la diferenciación de células. En particular, las moléculas adaptadas para estimular el crecimiento y/o la diferenciación de células se seleccionan entre el conjunto que se compone de:

- 5
- factores de crecimiento;
  - moléculas de la matriz extracelular conjuntiva;
  - una insulina,
  - un ascorbato-2-fosfato.

Ventajosamente, la composición, que se ha descrito más arriba, tiene, antes de la etapa de reticulación, una densidad de partida tal que ella es inyectable.

- 10
- En particular, la acción reticulante sobre un alginato de sodio se consigue mediante un agente de reticulación contenido en partículas poliméricas biodegradables, liberadas de una manera controlada a partir de polímeros naturales, por ejemplo una gelatina, o comenzando a partir de polímeros sintéticos, por ejemplo un poli(ácido láctico) o unos copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico.

Ventajosamente, el segundo polímero natural se selecciona entre el conjunto que se compone de:

- 15
- un polímero de naturaleza polisacáridica;
  - un polímero de naturaleza proteínica.

En particular, dicho polímero de naturaleza polisacáridica se selecciona entre el conjunto que se compone de:

- 20
- ácido hialurónico;
  - ésteres del ácido hialurónico;
  - quitosano.

Preferiblemente, dicho polímero de naturaleza proteínica se selecciona entre el conjunto que se compone de:

- 25
- un colágeno;
  - una gelatina;
  - una elastina.

En particular, los factores de crecimiento se seleccionan entre el conjunto que se compone de las siguientes familias:

- 30
- un EGF (acrónimo de Epidermal Growth Factor = factor de crecimiento epidérmico), en particular, TGF-alfa;
  - un TGF (acrónimo de Transforming Growth Factor = factor de crecimiento de transformación), en particular, TGF-beta;
  - un FGF (acrónimo de Fibroblast Growth Factor = factor de crecimiento de fibroblastos);
  - un PDGF (acrónimo de Platelet-Derived Growth Factor = factor de crecimiento derivado de plaquetas);
- 35
- un IGF (acrónimo de Insulin-like Growth Factor = factor de crecimiento similar a insulina).

Preferiblemente, las moléculas de la matriz celular conjuntiva se seleccionan entre el conjunto que se compone de:

- 40
- proteoglicanos,
  - una laminina;
  - una fibronectina;
  - una tenascina.

Preferiblemente, las células adaptadas para regenerar al tejido del núcleo discal se seleccionan entre el conjunto que se compone de:

- 45
- fibroblastos/fibroцитos;
  - condroblastos/condrocitos;
  - osteoblastos/osteocitos;
  - células notocordales;
  - células mesenquimales madres.

- 50
- La composición más arriba descrita tiene diferentes ventajas y, en particular, permite reducir al mínimo la invasividad del implante, con el fin de obtener exactamente la forma deseada del núcleo pulposo y de incorporar agentes inductores celulares específicos. Esta composición proporciona, además, la estructura tridimensional en la cual las células, apropiadamente seleccionadas, llevan a cabo la función de restaurar in situ las sustancias extracelulares típicas del núcleo pulposo y de producir luego unas sustancias fibrilares y amorfas particularmente ricas en proteoglicanos.

- 55
- Se da ahora un ejemplo que no limita la composición a todas las formas de realización dentro del presente invento.

**EJEMPLO**

5 A una mezcla que comprende 5 ml de una solución al 4 % de un alginato de sodio en un medio de cultivo (D-MEM) (composición 1) y 5 ml de una solución al 0,4 % de ácido hialurónico en un medio de cultivo (D-MEM) (composición 2), mediando suave agitación, se le añade una solución de 5 ml de una suspensión de 300 mg de micropartículas de gelatina (composición 3), preparada de acuerdo con el método descrito en un medio de cultivo (D-MEM).

Finalmente, a la composición final obtenida, se le añaden, agitando suavemente, 5 ml de una suspensión celular (fibroblastos dérmicos) ( $200 \cdot 10^5$  células/ml) en un medio de cultivo completo cargado con un FGF.

10 El procedimiento más arriba descrito se lleva a cabo a la temperatura ambiente en condiciones de esterilidad. El proceso para reticular el alginato, con una subsiguiente consecución de una matriz de hidrogel tridimensional en donde hay células vitales embebidas, comienza después de aproximadamente 15 minutos a partir de la adición de la composición 3.

Unas micropartículas biodegradables de la composición 3, usadas para conseguir una liberación controlada del agente de reticulación de alginato de sodio, se pueden preparar por ejemplo tal como se describe seguidamente.

1. Se prepara una fase acuosa ("W") disolviendo 0,2 g de una gelatina en 20 ml de agua destilada;
- 15 2. Se prepara una fase orgánica ("O") añadiendo 2 ml de Span 85 (agente tensioactivo de la fase orgánica) a 110 ml de iso octano.
3. Se prepara un baño de hielo en donde se sumerge un globo con una capacidad de 250 ml, en el que se prepara la emulsión;
- 20 4. La fase acuosa (W) se deja escurrir en la fase orgánica (O) agitando a 1.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos;
5. Se añaden 20 ml de Tween 85 (agente tensioactivo de la fase acuosa) mientras que continúa la agitación a 1.000 rpm durante otros 10 minutos;
6. Se dejan escurrir 5 ml de una solución acuosa al 25 % de glutaraldehído y 15 ml de agua destilada mientras que continúa la agitación a 1.000 rpm durante otros 15 minutos;
- 25 7. Se continúa la agitación a 500 rpm durante otros 35 minutos;
8. Se añaden 20 ml de glicina 0,1 M mezclando a 500 rpm durante otros 10 minutos,
9. Se hacen 4 lavados con agua, centrifugando cada vez a 3.000 rpm durante 5 minutos;
10. Se prepara un baño en 10 ml de acetona mediando agitación;
- 30 11. Se lleva a cabo un tratamiento con ultrasonidos en un baño con impulsos ultrasónicos durante 60 minutos con agitación periódica del recipiente que contiene las micropartículas y la acetona.
12. Se efectúa una etapa de desecación bajo una campana ventilada a una temperatura ambiente, obteniéndose como producto final unas micropartículas de gelatina en la forma de un polvo fino.
- 35 13. Se añaden 234 mg de las micropartículas obtenidas de esta manera a una solución acuosa de cloruro de calcio al 1,4 %. Después de haber incubado durante 4 horas mediando suave agitación, las micropartículas son separadas por centrifugación y luego secadas. Su peso después de haber cargado es de 300 mg.

A pesar de que en la descripción y en los ejemplos se ha hecho referencia solamente al hecho de reemplazar o regenerar el núcleo pulposo, queda claro que el invento se puede extender también a otros tejidos articulares, pero también a tejidos no articulares tales como tejidos óseos.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición biocompatible para reemplazar o regenerar tejidos, en particular tejidos articulares, tales como el núcleo pulposo de los discos intervertebrales, o también tejidos no articulares, tales como tejidos óseos, comprendiendo esta composición:
- una matriz de hidrogel que comprende unos polímeros naturales primero y segundo, en donde uno de dichos polímeros naturales primero y segundo es un alginato de sodio;
  - unas células adaptadas para regenerar a dichos tejidos;
  - un agente de reticulación adaptado para reticular por lo menos a uno de dichos polímeros naturales in situ, dando a la composición biocompatible por consiguiente una resistencia apropiada;
- caracterizada porque**  
dicho agente de reticulación está contenido en partículas poliméricas biodegradables con liberación controlada, liberando dichas partículas poliméricas biodegradables a dicho primer agente de reticulación de una manera controlada para efectuar selectivamente una acción reticulante sobre dicho alginato de sodio.
2. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se añaden unas moléculas que están adaptadas para estimular el crecimiento y/o la diferenciación de células, en donde dichas moléculas adaptadas para estimular el crecimiento y/o la diferenciación de células se seleccionan entre el conjunto que se compone de:
- factores de crecimiento;
  - moléculas de la matriz extracelular conjuntiva;
  - una insulina,
  - un ascorbato-2-fosfato.
3. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** se escoge una densidad de partida antes de que dicho agente de reticulación efectúe dicha acción reticulante sobre dicho alginato de sodio de manera tal que dicha composición sea inyectable.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho segundo polímero natural se selecciona entre el conjunto que se compone de:
- un polímero de naturaleza polisacarídica;
  - un polímero de naturaleza proteínica.
5. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho polímero de naturaleza polisacarídica se selecciona entre el conjunto que se compone de:
- ácido hialurónico;
  - ésteres del ácido hialurónico;
  - quitosano.
6. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho polímero de naturaleza proteínica se selecciona entre el conjunto que se compone de:
- un colágeno;
  - una gelatina;
  - una elastina.
7. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dichos factores de crecimiento se seleccionan entre el conjunto que se compone de las siguientes familias:
- un EGF, en particular, TGF-alfa;
  - un TGF, en particular TGF-beta;
  - un FGF;
  - un PDGF;
  - un IGF.
8. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 2, en la que las moléculas de la matriz extracelular conjuntiva se seleccionan entre el conjunto que se compone de:
- proteoglicanos,
  - una laminina;
  - una fibronectina;
  - una tenascina.
9. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas células adaptadas para regenerar a dichos tejidos se seleccionan entre el conjunto que se compone de:
- fibroblastos/fibrociitos;
  - condroblastos/condrocitos;
  - osteoblastos/osteocitos;

- células notocordales;
- células mesenquimales madres.