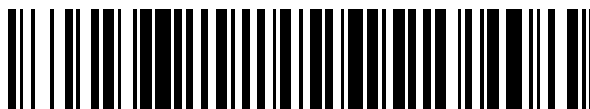


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 160**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61F 2/08 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006** **E 06762255 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013** **EP 1933767**

54 Título: **Injerto exento de células formado por matriz y suero**

30 Prioridad:

30.06.2005 DE 102005030614

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.08.2013

73 Titular/es:

BIOTISSUE AG (100.0%)

Seefeldstrasse 279 A

8008 Zürich, CH

72 Inventor/es:

SITTINGER, MICHAEL;

TÁNCZOS, ESZTER y

KAPS, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 419 160 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 exento de células formado por matriz y suero

La presente invención se refiere a un injerto exento de células para regeneración de tejido y particularmente para regeneración de cartílago, a un procedimiento para su fabricación y al uso del injerto para la regeneración de tejido.

5 Estado de la técnica

El cartílago es una forma de tejido mesodérmico derivado del tejido conectivo, que tiene su origen en células precursoras mesenquimatosas indiferenciadas y multipotentes. Se diferencian tres clases de cartílago, el cartílago hialino, el elástico y el fibroso. El cartílago hialino es la forma de cartílago más ampliamente extendida y se encuentra, por ejemplo, en las superficies articulares. Los defectos de cartílago a causa de desgaste o daño representan un problema médico ampliamente extendido. A causa del aislamiento del cartílago del sistema de inflamación y reparación clásico del cuerpo, tiene solo una baja capacidad de autocuración. Por consiguiente, se han desarrollado ya en el pasado, pero sobre todo los últimos años, procedimientos y técnicas para sustituir zonas condrales o también osteocondrales defectuosas en el cartílago articular. Así, se han usado como sustitutos de cartílago articular injertos osteocondrales de periostio o pericondrio alogénicos y autólogos, meniscos alogénicos o también prótesis de materiales artificiales.

En el trasplante autólogo de condrocitos, se multiplican en cultivo celular condrocitos extraídos del paciente y se devuelven al paciente. La realimentación puede realizarse en forma de distintos injertos. Son ejemplos de los mismos soluciones de inyección que se inyectan en la articulación, matrices inoculadas con células de cartílago y similares.

Por ejemplo, el documento WO 97/15655 describe tejidos artificiales compuestos de matrices extracelulares tridimensionales y células manipuladas mediante ingeniería genética, en los que las matrices pueden liberar factores inmunosupresores o diferenciadores celulares. Preferiblemente, se trata de matrices en forma de una napa polimérica en la que se extiende una suspensión celular, que puede suspenderse por ejemplo en una solución de fibrinógeno. Pueden añadirse a la matriz además factores o componentes de la correspondiente matriz extracelular que sean convenientes para el proceso de crecimiento y/o diferenciación. Para mantener las células en la matriz, la suspensión celular puede estabilizarse mediante la adición de trombina, para obtener el injerto listo.

El documento DE 4.431.598 describe un procedimiento para la fabricación de un injerto de cultivos celulares en el que en primer lugar se recubren estructuras de soporte tridimensionales en las que se depositan las células y se perfunden a continuación con una solución nutritiva. Se introducen en las estructuras de soporte microcuerpos absorbibles que con la absorción liberan factores que influyen en la formación de tejido.

El documento DE 4.306.661 describe una estructura de soporte tridimensional, preferiblemente de una napa polimérica, en la que se depositan las células. La estructura de soporte se perfunde a continuación con solución nutritiva para fomentar el crecimiento celular y la formación de una matriz extracelular por las células. Para impedir la migración o elución de las células, se recubre la estructura de soporte con agarosa.

Es además conocida por el documento DE 10.139.783 la provisión de células mesenquimatosas en líquido sinovial. Esta composición puede aplicarse también, si se desea, sobre un soporte como una napa o un plástico y usarse en esta forma como injerto. De otro modo, se inyecta la suspensión de células en líquido sinovial como tal en la articulación afectada.

Como alternativa, se sintetizan estructuras matriciales que no contienen células por sí mismas. Así, por ejemplo, el documento US 2003/0003153 describe membranas matriciales rígidas que contienen una o varias proteínas estructurantes que son adecuadas para el crecimiento celular. Son proteínas adecuadas, por ejemplo, colágeno. Las matrices obtenidas en forma de membrana pueden inocularse con células o transplantarse como tales. En este último caso, se supone que las células de los tejidos endógenos migran a la estructura matricial. Esto se aplica, por ejemplo, mediante perforación de Pridie convencional o microfracturación. En estas técnicas, se efectúan perforaciones o fracturas insignificantes en el hueso articular hasta la médula ósea. Por las perforaciones, aparece hemorragia en el defecto, con lo que se rellena el defecto con un coágulo sanguíneo. En el coágulo se encuentran células precursoras mesenquimatosas que mediante los correspondientes estímulos estimulan un tejido sustitutivo de tipo cartilaginoso que puede formar el denominado cartílago fibroso. Si se proporciona un material matricial por la perforación de Pridie, las células sanguíneas pueden migrar a este material matricial y asentarse allí.

Los documentos DE 19.957.388 y WO 2005/014027 aprovechan este efecto y lo refuerzan proporcionando a la estructura matricial factores de crecimiento y diferenciación (documento DE 1.9957.388) o quimiocinas (documento WO 2005/014027) como agentes de reclutamiento. Todos los factores deben conducir a reclutamiento reforzado de células precursoras mesenquimatosas formadoras de cartílago, con lo que por último debe conseguirse una regeneración más rápida del cartílago.

Finalmente, por el documento WO 02/00272 es conocida la posibilidad de fabricar los correspondientes injertos 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 contrae en la coagulación y por tanto cambia de forma. El polímero añadido evita este cambio de forma y permite por tanto una curación sin deformación. Para la fabricación del injerto, se mezcla un polímero con sangre o con un componente sanguíneo como eritrocitos, leucocitos, monocitos, plaquetas, fibrinógeno, trombina y plasma rico en plaquetas y se incorpora al defecto. Con el uso de un componente sanguíneo, es sin embargo la presencia de material coagulable un componente esencial para conseguir el efecto deseado.

Como alternativa, pueden usarse injertos de quitosano y condrocitos. Ya que aquí las células se incorporan como anteriormente desde el principio al defecto, puede evitarse la adición de atractores y/o factores de crecimiento y diferenciación.

El documento GB 1.052.589 da a conocer materiales matriciales de soporte para la regeneración de vasos sanguíneos que se fabrican a partir de una solución de gel, en los que el injerto resultante se impregna en otra etapa con suero sanguíneo natural.

En las tecnologías anteriormente descritas, existen las desventajas a ese respecto de que, cuando el injerto mismo contiene células, estas se dañan frecuentemente por la manipulación en su manejo, el injerto debe fabricarse con el uso de células, particularmente células autólogas, mediante un procedimiento de cultivo de larga duración y que requiere controles cuidadosos de contaminaciones y finalmente no tiene capacidad de almacenamiento. Paralelamente, se ha mostrado insuficiente el reclutamiento en injertos exentos de células de células mesenquimatosas a través de la perforación de Pridie con o sin atractores. El asentamiento es lento, parte de pocas células y es además inespecífico. Es decir, que a partir de la sangre extravasada por la perforación de Pridie se eluyen distintos tipos celulares al injerto y permanecen allí. Sin embargo, se desea únicamente el asentamiento mediante células precursoras mesenquimatosas que se diferencian en condrocitos. Sin embargo, esto no se garantiza en los injertos convencionales.

La presente invención tiene por tanto, entre otros, el objetivo de proporcionar un injerto que se fabrique fácilmente, se almacene bien y sea fácil de aplicar. Además, sería deseable conseguir elevar los índices de reclutamiento por el injerto, una mejor selectividad por la clase de células reclutadas o encontradas en el injerto y poder evitar en lo posible el uso de factores de crecimiento exógenos, dado el caso incluso recombinantes, que representan alérgenos potenciales.

Sumario de la invención

La presente invención resuelve estos y otros problemas del estado de la técnica. Para ello, proporciona un injerto exento de células según la reivindicación 1 que comprende (i) una matriz cohesiva estructurante con poros abiertos de material biológica y farmacéuticamente aceptable y (ii) suero sanguíneo. La matriz contiene adicionalmente un gel.

En un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento para la fabricación de dicho injerto exento de células en el que se ponen en contacto matriz y gel con el suero. Dado el caso, puede secarse el injerto con suero. Como alternativa, la matriz y el gel pueden presentarse en estado desecado antes de la puesta en contacto con el suero.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona finalmente el uso del injerto exento de células para la regeneración de tejido y particularmente para la regeneración de cartílago y/o hueso.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el efecto quimiotáctico de CDMP1, CDMP2, SDF1- α e IL8 sobre células madre mesenquimatosas humanas *in vitro*;

La Fig. 2 muestra el efecto quimiotáctico del suero de sangre humana sobre células madre mesenquimatosas humanas *in vitro*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, como se describe anteriormente, a un injerto exento de células según la reivindicación 1 que comprende (i) una matriz cohesiva estructurante con poros abiertos de material biológica y farmacéuticamente aceptable y (ii) suero sanguíneo. El uso de suero en el injerto exento de células según la invención permite sorprendentemente una elevación de la eficacia de reclutamiento de células precursoras mesenquimatosas de la médula ósea perfundida en varios órdenes de magnitud. Esta eficacia de reclutamiento sorprendentemente aumentada permite a su vez evitar la incorporación separada de células diferenciadas o células precursoras en el injerto mismo, lo que facilita el manejo, simplifica y acorta la fabricación del injerto y posibilita también su almacenamiento.

El suero sanguíneo se obtiene convencionalmente de forma sencilla. Preferiblemente, esto puede realizarse directamente durante el trasplante del paciente mismo. Puede reimplantarse entonces al paciente material autólogo, mientras que la adición de otros factores potencialmente alérgicos y/o inactivo no es necesaria.

La matriz del injerto exento de células según la invención es una matriz cohesiva estructurante con poros abiertos. Con la expresión “cohesiva”, se entiende aquí que la matriz permite el manejo del injerto sin degradarse en este sentido en sus partes individuales o constituyentes. No es necesario que todos los constituyentes de la matriz estén unidos entre sí por enlaces o interacciones químicos. Es suficiente una unión mecánica, por ejemplo, mediante tejido, apelmazamiento, torsión o similar.

Con la expresión “estructurante” se entiende aquí la propiedad de la matriz de funcionar como estructurante para las células migradas a la matriz de tejido elaborada. La matriz forma además un soporte o rejilla en el que las células pueden asentarse y encontrar apoyo para no retirarse por lavado de la matriz, por ejemplo, por fluido sinovial o sangre.

Se entiende por “poros abiertos” finalmente en el sentido de la invención que los espacios intermedios entre las estructuras de soporte de la matriz sean accesibles a un intercambio de sustancias y particularmente de fluidos con el entorno de la matriz. Preferiblemente, el tamaño de poro de los poros se dimensiona de modo que posibilite también la incorporación o la elución de las células. Sin embargo, se entiende también por poros abiertos en el sentido de la invención una estructura como se presenta en geles. Aquí se proporcionan mediante el esqueleto del gelificante las estructuras de soporte de la matriz. Entre estas se encuentran cubiertas de hidratación y fluido, en las que es posible la incorporación de células y con las que es posible un intercambio de fluido. Las correspondientes estructuras de gel se entienden por tanto también como matrices con poros abiertos en el sentido de la presente invención.

Las estructuras de soporte de poros abiertos se seleccionan de estructuras de napa y de fieltro, esponjas, algodón, lana, rejilla, haces de fibras ordenados y desordenados, así como combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la matriz muestra una estructura de napa o de fieltro. Son posibles combinaciones de distintas estructuras, por ejemplo en disposición en forma de capas, y en el campo de la presente invención.

La material matricial puede ser básicamente cualquier material biológica y farmacéuticamente aceptable adecuado. El material matricial que se usa en la matriz según la invención puede ser absorbible o no absorbible. Se prefieren los materiales absorbibles. Por ejemplo, la matriz comprende un material seleccionado del grupo compuesto por polímeros naturales y sintéticos como colágeno, ácido hialurónico, quitosano, quitina, polisacáridos, celulosas y sus derivados, proteínas, polipéptidos, poli(ácidos glicólicos), poli(ácidos lácticos) poli(glicolida, lactato), caprolactona; materiales cerámicos como óxidos, carburos, nitruros y carbonitruros de metales, particularmente óxido de silicio, óxido de titanio y óxido de calcio; minerales como halogenuros, particularmente fluoruros, hidróxidos, fosfatos o sulfatos de metales, preferiblemente metales fisiológicamente inocuos como fosfato de calcio, apatito, hidroxiapatito; metales como titanio, aluminio, oro, plata, acero inoxidable y mezclas de los mismos. Con muy especial preferencia, se trata de poli(ácidos glicólicos) (PGA), poli(ácidos lácticos), colágeno o ácido hialurónico.

Se usan como poli(ácidos glicólicos) preferiblemente poli(ácidos glicólicos) puros con pesos moleculares > 20.000, preferiblemente de 30.000 a 70.000 g/mol, lo más preferiblemente de aproximadamente 50.000 g/mol. Pueden usarse como material matricial, por ejemplo, una napa de poli(ácido glicólico) como se comercializa por Alpha Research Switzerland GmbH con la marca PGA-Soft Felt®. En este producto, el tiempo de absorción *in vivo* asciende a aprox. 40 a 60 días. Después de 7 días *in vitro*, la resistencia mecánica a causa de la hidrólisis asciende todavía a aprox. un 50 % del valor de partida.

El injerto exento de células comprende además de la matriz adicionalmente un gel. Este gel se aplica al menos a un lado de la matriz y/o atraviesa esta al menos parcialmente. Preferiblemente, el gel atraviesa totalmente la matriz. Preferiblemente, la matriz misma presenta otra estructura que la del gel. Se prefieren muy especialmente estructuras más rígidas como se citan explícitamente antes con excepción de geles. El gel tiene así preferiblemente una rigidez menor que la matriz. Lo más preferido son estructuras de napa y filetro en que se incorpora el gel.

El gen puede ser un hidrogel natural o sintético. Presenta preferiblemente una menor rigidez que la matriz. El gel puede seleccionarse, por ejemplo, de polisacáridos, polipéptidos, ácido hialurónico, fibrina, colágeno, alginato, agarosa y quitosano, así como sales, derivados y mezclas de los mismos. Son sales adecuadas, por ejemplo, sales alcalinas y alcalinotérreas de los geles citados. Lo más preferiblemente, se trata de ácido hialurónico o una sal de ácido hialurónico como hialuronato de sodio.

Como calidades de ácido hialurónico, pueden usarse calidades fabricadas por fermentación. Como alternativa, también es posible el uso de ácido hialurónico obtenido de animales. El peso molecular medio de las calidades usadas asciende habitualmente a entre 250 y 6.000 kDa, preferiblemente a 1.000 a 2.000 kDa, lo más preferiblemente a aproximadamente 1.200 kDa. Son productos de ácido hialurónico adecuados los obtenibles en el mercado. Es adecuada, por ejemplo, la calidad de ácido hialurónico comercializada por TRB Chemedika AG con la marca Marke Ostenil®. Este material está certificado en la CE y por tanto es adecuado con fines farmacéuticos.

Los geles pueden formarse mediante hinchamiento, precipitación o polimerización de un gelificante adecuado en una solución fisiológica adecuada. Son ejemplos de dichas soluciones adecuadas agua así como soluciones acuosas de sales (por ejemplo, halogenuros, carbonatos, fosfatos, citratos, acetatos alcalinos y alcalinotérreos (Cl, Br, I) y similares), ácidos orgánicos, sustancias tamponadoras y sus mezclas. Como alternativa, pueden usarse

soluciones más complejas como medio de cultivo o fluidos corporales o soluciones derivadas de los mismos como fluido sinovial o suero. La cantidad usada de gelificante se dimensiona de modo que proporcione una viscosidad conveniente del gel. Para el ácido hialurónico, se encuentra esta habitualmente en el intervalo de 0,5-50 mg/ml, preferiblemente de 0,5-20 mg/ml, lo más preferiblemente 10 mg/ml.

- 5 Lo más preferido es un injerto de un PGA de napa o fieltro como matriz en el que se incorpora el gel de ácido hialurónico.

Las medidas del injerto exento de células según la invención se ajustan generalmente a las medidas del defecto para tratar o al tamaño necesario del injerto. Las dimensiones han de adaptarse según la necesidad por el médico de tratamiento. Para lesiones en tejido cartilaginoso, particularmente en la articulación de la rodilla, estos tamaños se encuentran habitualmente en el intervalo de 10 a 50 mm de longitud, 10 a 50 mm de anchura y 0,5 a 3 mm de grosor, preferiblemente de 10 a 30 mm de longitud, 10 a 30 mm de anchura y 1 a 2 mm de grosor. Lo más preferible serían tamaños de 20 x 20 mm de anchura y longitud y 1,1 a 2 mm de grosor. Las correspondientes medidas son adaptables a formas no cuadráticas, por ejemplo rectangulares, redondas, ovales, poliédricas, etc.

15 La combinación de matriz y gel en el injerto exento de células de la presente invención tiene la ventaja de que el gel forma una barrera mecánica contra células distintas de las células precursoras mesenquimatosas de la sangre que penetra a través de la perforación de Pridie o fractura similar. En este sentido, se posibilita una migración selectiva de las células precursoras mesenquimatosas al injerto. Solo estas se implantan por tanto en la matriz y se diferencian en las células de tejidos deseados. No se realiza por tanto una sobreproliferación de las células formadoras de tejido deseadas por otras células o puede minimizarse considerablemente.

20 Al mismo tiempo, el gel potencia la retención de las células deseadas mediante esfuerzo mecánico antes de la formación de la biomatriz natural del cartílago por el mismo. Esto posibilita un esfuerzo mecánico temprano tras la recepción del injerto por el paciente.

El segundo constituyente necesario del injerto exento de células de la presente invención es el suero sanguíneo, habitualmente suero humano. Este puede ser autólogo, alógeno o heterólogo. Se entiende por suero según la invención la parte líquida de la sangre restante después de realizada la coagulación sanguínea. El suero no contiene células sanguíneas y, en contraposición al plasma sanguíneo, tampoco fibrinógeno. El resto de constituyentes del plasma sanguíneo se encuentra igualmente en el suero. Estos son grasa, ácidos grasos, glicerina, azúcar, sales, metales y proteínas plasmáticas. Las proteínas plasmáticas comprenden, por ejemplo, proteínas de transporte, enzimas, proenzimas, inhibidores enzimáticos, el sistema de complemento, inmunoproteínas, mediadores de la inflamación y similares.

El suero para usar según la invención puede modificarse mediante la adición de al menos un constituyente y/o la separación de al menos un componente sérico. En una forma de realización preferida, se trata de suero no modificado. Con muy especial preferencia, es suero autólogo. Este puede obtenerse mediante extracción de sangre del paciente y obtención del suero mediante procedimientos convencionales. El suero así obtenido puede ponerse en contacto entonces con la matriz y el gel, en caso de estar presente, e incorporarse por tanto al injerto o directamente al lugar del trasplante por el médico de tratamiento.

Como alternativa, se trata de suero modificado. Cuando la modificación se realiza mediante la adición de al menos un constituyente, este puede seleccionarse preferiblemente del grupo compuesto por factores de crecimiento, factores de diferenciación (véase para ello el documento DE 19957388), hormonas, citocinas, moléculas de adhesión celular, factores quimiotácticos incluyendo quimiocinas como se describen en el documento WO 2005/014027, enzimas, inhibidores enzimáticos, coenzimas, minerales, grasas, lípidos, sacáridos, medicamentos como antibióticos, analgésicos, inhibidores de la inflamación e inmunosupresores, sustancias tamponadoras, estabilizantes, particularmente crioestabilizantes, y vitaminas, preferiblemente hormonas, quimiocinas, factores de crecimiento y factores de diferenciación. Preferiblemente, las hormonas, quimiocinas, factores de crecimiento y diferenciación se seleccionan de insulina, PDGF, IGF, GMCSF, GDF5, GDF6, FGF, BMP2, BMP4, BMP7, IL8, SDF1- α y EGF. El más preferido es la insulina. Igualmente, la matriz y/o el gel pueden modificarse mediante la incorporación de los constituyentes anteriormente citados o mezclas de los mismos.

Como alternativa, pueden retirarse del suero determinados constituyentes como, por ejemplo, enzimas, inmunoproteínas, proenzimas, azúcares, etc. antes de la puesta en contacto con la matriz. Las proteínas o azúcares pueden retirarse selectivamente, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. El suero puede también diluirse. Para ello, se mezcla el suero con la cantidad deseada de líquido fisiológicamente aceptable como tampón citrato, PBS o similares.

El injerto exento de células anteriormente descrito puede fabricarse según un procedimiento en el que se pone en contacto la matriz y el gel con el suero. Esta puesta en contacto puede realizarse mediante goteo, empapado, impregnación o inmersión. Preferiblemente, se incorpora y/o se aplica en primer lugar el gel a la matriz, después de lo cual se realiza la puesta en contacto con el suero. Si el injerto exento de células contiene otros constituyentes, como se dan anteriormente, estos pueden incorporarse a uno o varios de matriz, gel y suero.

El procedimiento según la invención puede contener una etapa de secado. El uso de una etapa de secado tiene la ventaja de que el injerto es almacenable más tiempo en forma desecada. Si la matriz y el gel se secan antes de la puesta en contacto con el suero, esta estructura puede reconstituirse mediante la puesta en contacto con el suero, por ejemplo por inmersión o empapado, y transformarse en un estado listo para usar. Si como alternativa se seca la estructura de matriz, gel y suero, puede reconstituirse mediante inmersión o empapado con suero u otra solución farmacéutica y fisiológicamente aceptable adecuada, como se describe anteriormente para la formación de gel, por ejemplo solución salina fisiológica, y transformarse en un estado listo para usar. Cuando el injerto según la invención contiene constituyentes adicionales, estos pueden incorporarse también al injerto exento de células listo con la solución reconstituyente. Esto puede ser particularmente deseable entonces cuando se trata en los otros constituyentes de proteínas o cofactores lábiles.

Para las formas de realización preferidas citadas anteriormente de napa de poli(ácido glicólico) con gel de ácido hialurónico, se incorporan al material de tamaños de napa de 20 mm x 20 mm x 1,1 mm aprox. 400 µl de una solución de ácido hialurónico (10 mg/ml) en solución fisiológica adecuada o ya en suero. Con napas de 20 mm x 20 mm x 2 mm, se usan aprox. 730 µl de solución de ácido hialurónico. Si los injertos de estas dimensiones se secan, por ejemplo, por liofilización, pueden reconstituirse mediante inmersión en 1 a 2 ml de solución. En matrices desecadas sin suero, se reconstituyen preferiblemente con suero o suero diluido, en matrices desecadas con suero, preferiblemente con solución salina fisiológica.

Son concentraciones de suero adecuadas del 1 al 100 % en vol. del volumen de gel y fluido contenido en la matriz. Para reducir la concentración de suero a menos del 100 %, puede usarse suero diluido con solución salina fisiológica.

Para matrices con gel, se usan contenidos de suero de 0,01 a 50 % en vol., más preferiblemente del 0,5 al 20 % en vol. y lo más preferiblemente del 1 al 10 % en vol. de suero, referido al volumen total de gel, suero y dado el caso líquido farmacéuticamente aceptable.

El injerto exento de células según la invención puede usarse para la regeneración de tejido y particularmente para la regeneración de cartílago y/o hueso. Preferiblemente, se usa para la regeneración de tejido mesenquimatoso. Lo más preferido es el uso para regeneración de cartílago y/o hueso, particularmente después de perforación de Pridie o microfracturación. El injerto funciona como una cubierta inteligente que se incorpora después de la perforación de Pridie o microfracturación para la rehabilitación de las superficies articulares de los cartílagos con ajuste perfecto. El material matricial, preferiblemente material de fieltro, sirve para la estabilidad mecánica y funciona como estructura conductora que potencia la distribución tridimensional homogénea de las células del paciente que migran de la médula ósea o huesos esponjosos. El gel, como ácido hialurónico, actúa como barrera para impedir la migración de eritrocitos y leucocitos. El suero, preferiblemente suero autólogo, favorece la migración de células, especialmente células precursoras mesenquimatosas, al injerto y por tanto al defecto. La maduración o diferenciación de las células precursoras mesenquimatosas migradas al injerto hasta condrocitos, y por tanto la formación de un tejido regenerado cartilaginoso, se induce por el ácido hialurónico, el suero y el líquido sinovial presentes en la articulación. Sorprendentemente, se ha mostrado que el uso de suero posibilita unas cifras de reclutamiento claramente aumentadas.

Los siguientes ejemplos deben ilustrar únicamente la presente invención, pero sin limitarla.

Ejemplo 1

Reclutamiento de células madre mesenquimatosas humanas mediante factores de crecimiento y diferenciación, quimiocinas y suero humano *in vitro*

A. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimatosas humanas

Se describe el aislamiento de células madre mesenquimatosas humanas (CMM) de médula ósea [documento DE 10.333.901]. Se mezclan como máximo 3 ml de punción de médula ósea con 10 ml de PBS y se centrifugan durante 10 min a 310 g a temperatura ambiente. Se resuspende el sedimento celular y se lava de nuevo con PBS. Las células se recogen en 20 ml de medio DME (con 10-20 % de FBS, 2 % de HEPES, L-glutamina 4 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml). Cada 5 ml de esta suspensión celular se añaden a 20 ml de un gradiente de densidad de Percoll de densidad 1,073 g/ml. Se centrifugan las células a 900 g durante 32 min. Se transfiere la fase superior a un nuevo tubo de centrifuga. Después de añadir 2,5 veces su volumen de PBS, se realiza de nuevo la centrifugación a 310 g durante 6 minutos. Se recoge el sedimento celular en medio DME. Se añaden $1,5 \times 10^5$ - $3,5 \times 10^5$ células/cm² para cultivo a un matraz de cultivo y se incuban a 37 °C y 5 % CO₂. El primer cambio de medio se realiza después de 72 horas, y entonces cada 3-4 días. Las células así aisladas crecen confluentes después de 2-3 semanas y se transfieren entonces mediante tripsinación a una densidad celular de 6.000 células/cm² de superficie de cultivo en un nuevo recipiente de cultivo (paso 1). Después de aproximadamente una semana, se tripsinan de nuevo las células (paso 2). Se verifica la homogeneidad del cultivo presente de células madre mesenquimatosas humanas mediante análisis de FACS, detectándose los antígenos de superficie endoglina y AL-CAM y no detectándose los antígenos de superficie CD34, CD45 y CD14.

B. Ensayo de la actividad quimiotáctica de factores de crecimiento y diferenciación (CDMP1, CDMP2) y quimiocinas (SDF1- α , IL8) sobre células madre mesenquimatosas humanas *in vitro*

- Se describe el efecto quimiotáctico de factores de crecimiento y diferenciación como, por ejemplo, proteína morfogenética 1 derivada de cartílago (CDMP1, o factor de crecimiento y diferenciación 5, GDF5) y proteína morfogenética 2 derivada de cartílago (CDMP2 o factor de crecimiento y diferenciación 6, GDF6) sobre células madre y células precursoras mesenquimatosas [documento DE 19.957.388]. Se describe igualmente el efecto quimiotáctico o el uso de quimiocinas como, por ejemplo, factor 1 α derivado de estroma (SDP1- α) o interleucina 8 (IL-8) para el reclutamiento de células madre y células precursoras mesenquimatosas [documento DE 10.333.901].
- Se realiza el ensayo de actividad quimiotáctica en las denominadas placas de quimiotaxia de 96 pocillos (ChemoTx System, Neuroprobe, EE.UU.). El principio del ensayo prevé que la sustancia a ensayar se añade en solución de cantidad y concentración definida a una depresión (pocillo). La depresión se recubre después con una membrana dotada de poros (tamaño de poro aquí de 8 μ m), de modo que el lado inferior de la membrana se humedezca con la solución que contiene sustancia quimiotáctica.
- Sobre el lado superior de la membrana, se añade frente a la depresión una cantidad definida de suspensión celular que no contiene la sustancia de ensayo. Después de algunas horas, se forma desde la depresión inferior a través de la membrana hasta la suspensión celular un gradiente de concentración de la sustancia de ensayo. Si la sustancia de ensayo es quimiotácticamente activa, las células de la suspensión celular migran a través de los poros de la membrana hasta el lado inferior de la membrana o la depresión inferior. Las células migradas se colorean y se determina su número con ayuda de un microscopio.
- Para control, se equipan las depresiones inferiores con disolvente de la sustancia de ensayo, se cubren con la membrana y se recubren con la suspensión celular. Se realiza la determinación de las células migradas espontáneamente, sin estímulo por la sustancia quimiotáctica, mediante recuento microscópico de las células en el lado inferior de la membrana (superficie: 25 mm²) o en la depresión inferior. Para evaluar el número de células que se reclutaron mediante la sustancia quimiotáctica, se resta el número de células migradas espontáneamente.
- Antes del inicio del ensayo de factores de crecimiento y diferenciación y quimiocinas anteriormente citados, se mezclaron células madre mesenquimatosas humanas de médula ósea durante 24 horas con medio dietético (medio DME + 1 % de penicilina/estreptomicina + 0,5 % de seroalbúmina bovina, BSA). Se recogieron los factores de crecimiento y diferenciación y las quimiocinas en distintas cantidades en el medio dietético de modo que hubiera soluciones definidas respectivamente de 250 nM, 500 nM, 750 nM y 1000 nM de los factores. Se añadieron 36 μ l de las respectivas soluciones por triplicado a las depresiones inferiores de la placa de quimiotaxia de 96 pocillos y se cubrieron con la membrana, de modo que el lado inferior de la membrana se humedeciera con las soluciones. Sirvió como control el medio dietético.
- Se añadieron al lado superior de la membrana 40 μ l de medio dietético con 30.000 células madre mesenquimatosas humanas. Después de 20 horas de cultivo en incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂, se retiró la membrana y se añadió para fijación de las células durante 3 minutos etanol/acetona (1:1 v/v). Se limpió exhaustivamente el lado superior de la membrana mediante un bastoncillo de algodón de las células adheridas. Se colorearon las células del lado inferior de la membrana con solución de Hemacolor (Merck, Darmstadt). En la depresión inferior no pudieron detectarse células.
- Se realizó el recuento de las células encontradas en el lado inferior de la membrana mediante conteo al microscopio. Se determinó el número de células madre reclutadas por CDMP1, CDMP2, SDF1- α e IL8 a distintas concentraciones después de restar las células migradas en la preparación de control (sin factor quimiotáctico). Se representan los valores medios de los recuentos celulares con desviación estándar para los respectivos factores en la FIG. 1. Con CDMP1, pudo estimularse la migración de cómo máximo 156 CMM (CDMP1 750 nM) por 25 mm². El CDMP2 reclutó como máximo 38 CMM (CDMP2 500 nM) por 25 mm², SDF1- α como máximo 79 CMM (SDF1- α 750 nM) por 25 mm² e IL8 como máximo 814 CMM (IL8 500 nM) por 25 mm².

C. Ensayo de la actividad quimiotáctica de suero sanguíneo humano sobre células madre mesenquimatosas humanas *in vitro*.

- De la prueba de suero humano mediante el procedimiento de ensayo descrito en B, resultó sorprendentemente que el suero humano, en comparación con factores de crecimiento y diferenciación y quimiocinas, ejerce un efecto quimiotáctico claramente mayor sobre células madre y células precursoras mesenquimatosas humanas *in vitro*. Los recuentos celulares de los células madre y células precursoras mesenquimatosas humanas reclutadas por suero humano en distintas formulaciones (en medio dietético o en ácido hialurónico) se representan como media con las correspondientes desviaciones estándar en la FIG. 2. Según la formulación, podían reclutarse por suero humano como mínimo 2.135 (PGA - HA lyo. + HS) y como máximo 10.332 (medio HS-HA al 5 %) células madre y células precursoras mesenquimatosas humanas. El ensayo de ácido hialurónico sin suero humano en medio dietético como factor quimiotáctico daba como resultado de media 24 (medio HA) o de media 48 (PGA - Ha lyo. + NaCl) células madre y células precursoras mesenquimatosas humanas, que se reclutaban.

Las siguientes formulaciones distintas de suero humano se usaron en el procedimiento de ensayo descrito para reclutamiento de células madre y células precursoras mesenquimatosas humanas. Se obtuvo suero humano a partir de muestras de sangre completa (n= 5) sin anticoagulantes después de coagulación natural, se mezcló a partes iguales y se usó para la fabricación de las distintas formulaciones de suero. Para la fabricación de las preparaciones de “medio HS al 5 %” y “medio HS al 10 %” se mezcló medio dietético con suero humano, de modo que resultaran soluciones al 5 % o al 10 %. La preparación de “medio HA” está compuesta por medio dietético y ácido hialurónico obtenido por fermentación (Ostenil®, TRB Chemedica AG) con un peso molecular medio de 1.200 kDa a partes iguales. Las preparaciones de “medio HS-HA al 1 %”, “medio HS-HA al 5 %” y “medio HS-HA al 10 %” están compuestas por “medio HA” al que se ha añadido suero, de modo que resulten soluciones al 1 %, 5 % o 10 %.

Para la fabricación de la preparación de “PGA/HS-HA al 10 %, Iyo”, se mezclaron 270 µl de ácido hialurónico obtenido por fermentación (Ostenil®, TRB Chemedica AG) con 30 µl de suero humano y se incorporaron a una napa compuesta por poli(ácido glicólico) (PGA) (PGA-Soft Felt®, Alpha Research Switzerland GmbH) de medidas 20 mm x 15 mm x 1,1 mm. La napa empapada con la mezcla de ácido hialurónico-suero se congeló durante 1 hora a -20 °C y después se liofilizó durante 16 horas en liofilizador. Para la reconstitución, se añadió la napa liofilizada durante 10 minutos a 1 ml de solución salina fisiológica, para obtener a continuación mediante centrifugación durante 10 min a 2.000 rpm aprox. 80-100 µl de solución de ácido hialurónico-suero. Mediante la dilución de la solución con medio dietético a partes iguales, se preparó la formulación de “PGA/HS-HA al 10 %, Iyo” y se usó directamente para ensayar la actividad quimiotáctica.

Para la fabricación de la preparación de “PGA/HA, Iyo + HS”, se incorporaron 300 µl de ácido hialurónico obtenido por fermentación (Ostenil®, TRB Chemedica AG) a una napa compuesta por poli(ácido glicólico) (PGA) (PGA-Soft Felt®, Alpha Research Switzerland GmbH) de medidas 20 mm x 15 mm x 1,1 mm. La napa empapada con ácido hialurónico se congeló durante 1 hora a -20 °C y después se liofilizó durante 16 horas en liofilizador. Para la reconstitución, se añadió la napa liofilizada durante 10 minutos a 1 ml de suero humano, para obtener a continuación mediante centrifugación durante 10 min a 2.000 rpm aprox. 80-100 µl de solución de ácido hialurónico-suero. Mediante la dilución de la solución con medio dietético a partes iguales, se preparó la formulación de “PGA/HA, Iyo + HS” y se usó directamente para ensayar la actividad quimiotáctica.

Para la fabricación de la preparación de “PGA - HA, Iyo. + NaCl”, se incorporaron 300 µl de ácido hialurónico obtenido por fermentación (Ostenil®, TRB Chemedica AG) a una napa compuesta por poli(ácido glicólico) (PGA) (PGA-Soft Felt®, Alpha Research Switzerland GmbH) de medidas 20 mm x 15 mm x 1,1 mm. La napa empapada con ácido hialurónico se congeló durante 1 hora a -20 °C y después se liofilizó durante 16 horas en liofilizador. Para la reconstitución, se añadió la napa liofilizada durante 10 minutos a 1 ml de solución salina fisiológica, para obtener a continuación mediante centrifugación durante 10 min a 2.000 rpm aprox. 80-100 µl de solución de ácido hialurónico. Mediante la dilución de la solución con medio dietético a partes iguales, se preparó la formulación de “PGA/HA, Iyo + NaCl” y se usó directamente para ensayar la actividad quimiotáctica.

Ejemplo de realización 2

Se cortó una napa de poli(ácido glicólico) comercial comercializada en el mercado con la marca PDA-Soft Felt® de Alpha Research Switzerland GmbH a las dimensiones 20 mm x 15 mm x 1,1 mm. Se empapó el material como en el ejemplo 1 con una mezcla de ácido hialurónico que contenía suero al 10 % y a continuación se secó. El secado se realizó en primer lugar a -20 °C y a continuación durante 16 horas en liofilizador. La napa se reconstituyó mediante empapado con 1 a 2 ml de solución salina fisiológica durante 10 min.

En una preparación alternativa, se empapó la napa con ácido hialurónico puro disuelto a 10 mg/ml en solución salina fisiológica. Se secó como anteriormente el material así generado. Se realizó la reconstitución mediante empapado con 1 a 2 ml de suero durante 10 min. Ambas napa pueden usarse inmediatamente para el trasplante.

REIVINDICACIONES

1. Injerto exento de células que comprende (i) una matriz cohesiva estructurante con poros abiertos, de material biológica y farmacéuticamente aceptable seleccionado de estructuras de napa o fieltro, esponjas, algodón, lana, rejilla, haces de fibras ordenados y desordenados, así como combinaciones de los mismos; y (ii) suero sanguíneo, en donde el injerto exento de células presenta adicionalmente un gel que se aplica al menos a un lado de la matriz y/o que la atraviesa al menos parcialmente.
2. Injerto exento de células según la reivindicación 1, en el que el material matricial es reabsorbible o no reabsorbible.
3. Injerto exento de células según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz comprende un material seleccionado del grupo compuesto por polímeros naturales y sintéticos tales como colágeno, ácido hialurónico, quitosano, quitina, polisacáridos, celulosas y sus derivados, proteínas, polipéptidos, poli(ácidos glicólicos), poli(ácidos lácticos) poli(glicolida, lactato), caprolactona; materiales cerámicos tales como óxidos, carburos, nitruros y carbonitruros de metales; minerales tales como halogenuros, hidróxidos, fosfatos, sulfatos de metales tales como fosfato de calcio, apatito, hidroxiapatito; metales tales como titanio, aluminio, oro, plata, acero inoxidable y mezclas de los mismos.
4. Injerto exento de células según la reivindicación 1, en el que el gel es un hidrogel natural o sintético.
5. Injerto exento de células según la reivindicación 1 o 4, en el que el gel presenta una menor rigidez que la matriz.
6. Injerto exento de células según una de las reivindicaciones 1, 4 a 5, en el que el gel se selecciona de polisacáridos, polipéptidos, ácido hialurónico, fibrina, colágeno, alginato, agarosa y quitosán, así como mezclas de los mismos.
7. Injerto exento de células según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el suero sanguíneo es autólogo, alogénico o heterólogo y dado el caso se modifica mediante la adición de al menos un constituyente y/o la retirada de al menos un componente sérico.
8. Injerto exento de células según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene adicionalmente uno o más constituyentes seleccionados del grupo compuesto por factores de crecimiento, factores de diferenciación, hormonas, quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión celular, factores quimiotácticos, enzimas, inhibidores enzimáticos, coenzimas, minerales, grasas, lípidos, sacáridos, principios activos de medicamentos, sustancias tamponadoras, estabilizantes y vitaminas.
9. Injerto exento de células según la reivindicación 8, en el que las hormonas y los factores de crecimiento y diferenciación comprenden insulina, PDGF, IGF, GMCSF, GDF5, GDF6, FGF, BMP2, BMP4, BMP7, IL8, SDF1- α y EGF y combinaciones de los mismos.
10. Procedimiento para la fabricación de un injerto exento de células según una de las reivindicaciones anteriores, en el que se ponen en contacto la matriz y el gel con el suero sanguíneo.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la puesta en contacto se realiza mediante goteo, empapado, impregnación o inmersión.
12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, en el que se incorpora y/o se aplica en primer lugar el gel a la matriz y se realiza entonces la puesta en contacto con el suero sanguíneo.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10-12, en el que la combinación de gel y matriz, así como dado el caso otros constituyentes, se seca antes o después de la puesta en contacto.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el injerto se reconstituye a partir del estado seco.
15. Injerto exento de células según una de las reivindicaciones 1 a 9 para uso para la regeneración de tejido.
16. Injerto exento de células según la reivindicación 15 para uso para la regeneración de tejido mesenquimatoso, particularmente cartílago y/o hueso.

Figura 1

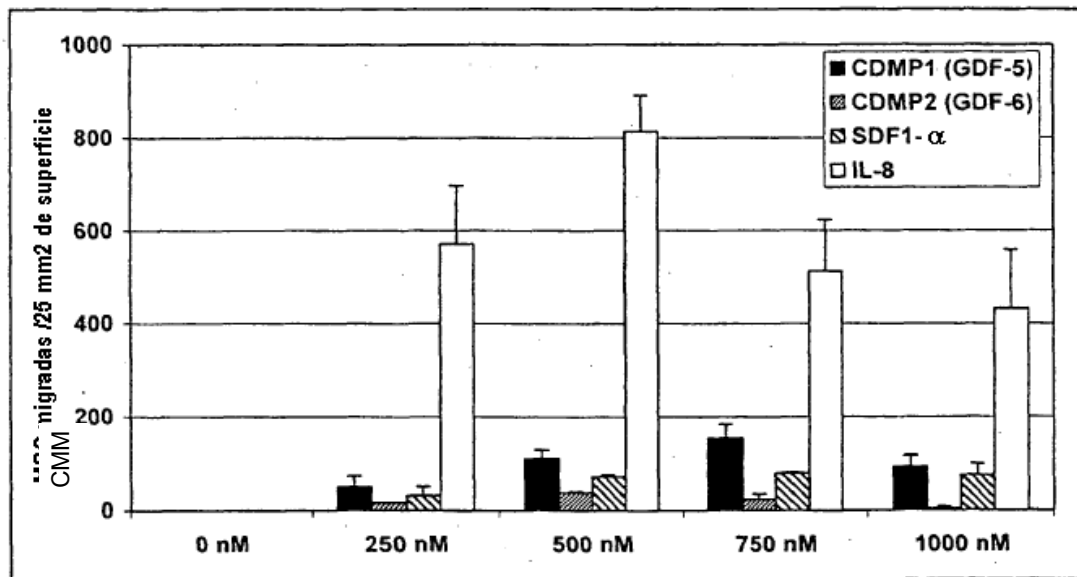


Figura 2

